



DNA-Barcoding – eine neue Möglichkeit für das Umweltmonitoring und den Gewässerschutz

Abschlussbericht

Impressum

DNA-Barcoding – eine neue Möglichkeit für das Umweltmanagement und den Gewässerschutz

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)

Bürgermeister-Ulrich-Straße 160

86179 Augsburg

Tel.: 0821 9071-0

E-Mail: poststelle@lfu.bayern.de

Internet: www.lfu.bayern.de/

Bearbeitung:

LfU, Dr. Margit Schade, Sabine Grüneberg, Stella Vielhaber

Bildnachweis

Bayerisches Landesamt für Umwelt

Stand:

Januar 2024

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

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die publizistische Verwertung der Veröffentlichung – auch von Teilen – wird jedoch ausdrücklich begrüßt. Bitte nehmen Sie Kontakt mit dem Herausgeber auf, der Sie – wenn möglich – mit digitalen Daten der Inhalte und bei der Beschaffung der Wiedergaberechte unterstützt.

Diese Publikation wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Tel. 0 89 12 22 20 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	5
1 Einleitung	7
2 Methodik	8
2.1 Probenahme	8
2.2 DNA-Extraktion	8
2.3 Amplifikation des Markergens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	9
2.4 Sequenzierung und Sequenz-Analyse	11
2.5 Datenbankanalyse	12
3 Ergebnisse und Diskussion	13
3.1 Vergleich verschiedener Primerkombinationen	13
3.2 Untersuchte Makrozoobenthos-Taxa	15
3.3 Genetische Bestimmung der Makrozoobenthos-Taxa mittels Sequenzanalyse	16
4 Fazit und Ausblick	19
5 Literatur	21
6 Anhang	22

Kurzfassung

In dem vorangegangenen Projekt „Genetische Artbestimmung – ein Beitrag zur Qualitätssicherung in der biologischen Analytik von Oberflächengewässern“ war die Analytik zur Bestimmung von Einzelorganismen des Makrozoobenthos (MZB) im Hinblick auf Probenkonservierung, DNA-Extraktion und Vervielfältigung des Markergens COI (Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase) erfolgreich etabliert worden. Nach absolvierter Testphase erwies sich die Methodik für die Artbestimmung von Gewässerorganismen als geeignet. Im Rahmen des vorliegenden Projekts „DNA-Barcoding - eine neue Möglichkeit für das Umweltmonitoring und den Gewässerschutz“ wurden die analytischen Verfahren weiterentwickelt und DNA-Barcoding als Instrument der Qualitätssicherung beim biologischen Fließgewässermonitoring eingesetzt.

Eine erfolgreiche genetische Artidentifizierung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören u.a. das gewählte Markergen, die Effizienz der eingesetzten Primer zur Vervielfältigung des Genabschnitts (Amplifikationseffizienz) und die Qualität der Referenzdatenbanken, die zur Auswertung der Sequenzdaten herangezogen werden. Daher wurden im Rahmen der Methodenentwicklung verschiedene Primerkombinationen zur Vervielfältigung des Markergens COI hinsichtlich ihrer Praxis-tauglichkeit verglichen. Die aufgrund einer hohen Amplifikationseffizienz zunächst sehr vielversprechende Primerkombination neo43f – y1w2r5 erwies sich jedoch als ungeeignet, da die Sequenz des PCR-Produkts – vermutlich aufgrund mangelhafter Datengrundlage in den Referenzbibliotheken – nur in 8 % der Fälle zu einem Ergebnis beim Datenbankabgleich führte. Am effektivsten im Hinblick auf Amplifikationseffizienz und erfolgreiche Sequenzanalyse erwiesen sich die Primerpaare BF3 – BR2 und neo21f – neo42r, deren Sequenzen in mehr als 95 % der Fälle ein Resultat beim Vergleich mit der Referenzdatenbank lieferten. Diese werden daher künftig standardmäßig für das DNA-Barcoding von Makrozoobenthos am LfU eingesetzt.

Insgesamt konnten 91 % der MZB-Proben mittels DNA-Barcoding genetisch identifiziert werden. Der überwiegende Anteil der untersuchten MZB-Organismen (ca. 80 %) gehörte den EPT-Taxa (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera), den Diptera und den Coleoptera an. Während bei den Ordnungen Ephemeroptera, Plecoptera und Coleoptera nahezu alle Proben genetisch bestimmt werden konnten, lag der Anteil bei den Trichoptera mit fast 20 % nicht identifizierter Organismen relativ hoch. Dies lag entweder an einer sehr schlechten Sequenzqualität (z.B. Mischsequenzen) oder daran, dass kein PCR-Produkt amplifiziert wurde. Bei den Diptera konnten 7 % der Organismen nicht identifiziert werden. Hier bestand die Ursache meist darin, dass die Sequenz trotz sehr guter Qualität beim Datenbankabgleich keinen Treffer lieferte.

Etwa die Hälfte der eingesandten MZB-Proben war morphologisch maximal bis auf Gattungsebene charakterisiert. Durch das Barcoding konnten mehr als die Hälfte dieser Proben bis auf Artniveau identifiziert werden. Allerdings war nicht bei allen Organismen eine genetische Bestimmung bis auf Spezies-Ebene möglich. Es gab Fälle, bei denen sich die DNA-Sequenzen des Markergens bei verschiedenen Arten einer Gattung nicht stark genug voneinander unterschieden, um eine eindeutige Zuordnung auf Spezies-Ebene vornehmen zu können. Hier müssen evtl. andere Gene herangezogen werden, die eine bessere Differenzierung ermöglichen.

In einigen Fällen kam es zu Abweichungen zwischen genetischer und morphologischer Bestimmung. Dann ist eine Plausibilitätsüberprüfung erforderlich. Liegen die Ergebnisse von morphologischer und genetischer Identifizierung so weit auseinander, dass ein Irrtum bei der morphologischen Bestimmung ausgeschlossen werden kann, ist dies relativ unproblematisch. Dabei kann es sich beispielsweise um Beifang handeln, der zusammen mit dem eigentlich zu bestimmenden Organismus eingesammelt wurde, oder Beutetiere aus dem Mageninhalt des Zielorganismus. In allen anderen Fällen muss eine eingehendere Betrachtung durch einen Fachexperten erfolgen, der dann entscheidet, ob das Ergebnis der morphologischen oder der genetischen Bestimmung verwendet wird.

In dem Projekt zeigte sich auch, dass die Referenzdatenbanken immer noch lückenhaft sind und die öffentlich zugänglichen Datenbanken – selbst wenn Qualitätssicherungsmaßnahmen durchlaufen werden – Fehler enthalten. Ziel sollte die Entwicklung einer Referenzdatenbank sein, die nur qualitätsgesicherte DNA-Barcodes enthält, und strengen Standards und Qualitätskontrollen unterliegt. Der Aufbau eines solchen „Gold Standards“ ist Inhalt des laufenden UBA-Projekts „dbDNA - Entwicklung einer Datenbank- und Analyseinfrastruktur für DNA-basiertes Monitoring im Gewässerschutz“ (Stand 2024).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die genetische Artbestimmung eine hilfreiche Unterstützung der Behörden im Rahmen des biologischen Fließgewässermonitoring darstellt. Bei etwa einem Drittel der untersuchten Organismen erlaubte das DNA-Barcoding eine genauere Identifizierung als die morphologische Charakterisierung. Dies stellt einen eindeutigen Mehrgewinn an Information dar und unterstreicht die Bedeutung von DNA-Barcoding als hilfreiches Instrument im Rahmen der biologischen Qualitätskontrolle.

1 Einleitung

DNA-Methoden bieten eine Vielzahl an neuen Möglichkeiten für das Umweltmonitoring und den Naturschutz. So können z.B. invasive Arten identifiziert oder Artengemeinschaften mittels eDNA-Analysen in Umweltproben bestimmt werden. Durch den raschen Fortschritt in der Methodenentwicklung ergeben sich zunehmend neue Möglichkeiten für den konkreten Einsatz in der Praxis.

Ein Beispiel hierfür ist die Artbestimmung von Organismen. Die konventionelle Bestimmung von Arten erfolgt anhand morphologischer Merkmale. Sind diese Merkmale nicht zweifelsfrei erkennbar oder werden sie nur zeitweise ausgebildet, kann eine genetische Identifizierung (DNA-Barcoding) weiterhelfen, einen Organismus exakt zu bestimmen. Dies ist z.B. wichtig bei der Einstufung des ökologischen Zustands von Oberflächengewässern, die auf der Bestimmung der vier „Biokomponenten“ Makrozoobenthos, Makrophyten/Phytobenthos, Phytoplankton und Fische basiert.

Beim DNA-Barcoding werden Arten mit Hilfe eines kurzen, standardisierten Genfragments identifiziert. Zur Bestimmung von Tieren ist ein Abschnitt des Gens für die Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase (COI) besonders geeignet. Die Bestimmung ist möglich, da sich die DNA-Sequenz dieses Genfragments bei fast allen Arten unterscheidet, während sie bei Populationen innerhalb einer Art identisch bleibt. Sie ist daher vor allem zur Unterscheidung von Taxa auf dem Niveau der Art oder Gattung geeignet.

Nachdem in dem vorangegangenen Projekt „Genetische Artbestimmung – ein Beitrag zur Qualitätssicherung in der biologischen Analytik von Oberflächengewässern“ die Methodenentwicklung zur genetischen Identifizierung von Makrozoobenthos-Organismen im Vordergrund stand, lag der Fokus in diesem Projekt neben einer Weiterentwicklung der Analytik vor allem auf dem Einsatz von DNA-Barcoding als Instrument der Qualitätssicherung beim biologischen Fließgewässermonitoring. Damit werden die Wasserwirtschaftsämter und die Regierungen bei der Untersuchung von Makrozoobenthos-Organismen, insbesondere von schwer bestimmbar Taxa, unterstützt. Dies hilft, Fehlbestimmungen zu vermeiden und gewährleistet so eine höhere Sicherheit bei der Bewertung des ökologischen Gewässerzustandes.

2 Methodik

In Abbildung 1 sind die Verfahrensschritte bei der genetischen Artbestimmung von Einzelorganismen dargestellt. Diese verschiedenen Arbeitsschritte werden im Folgenden ausführlich beschrieben.

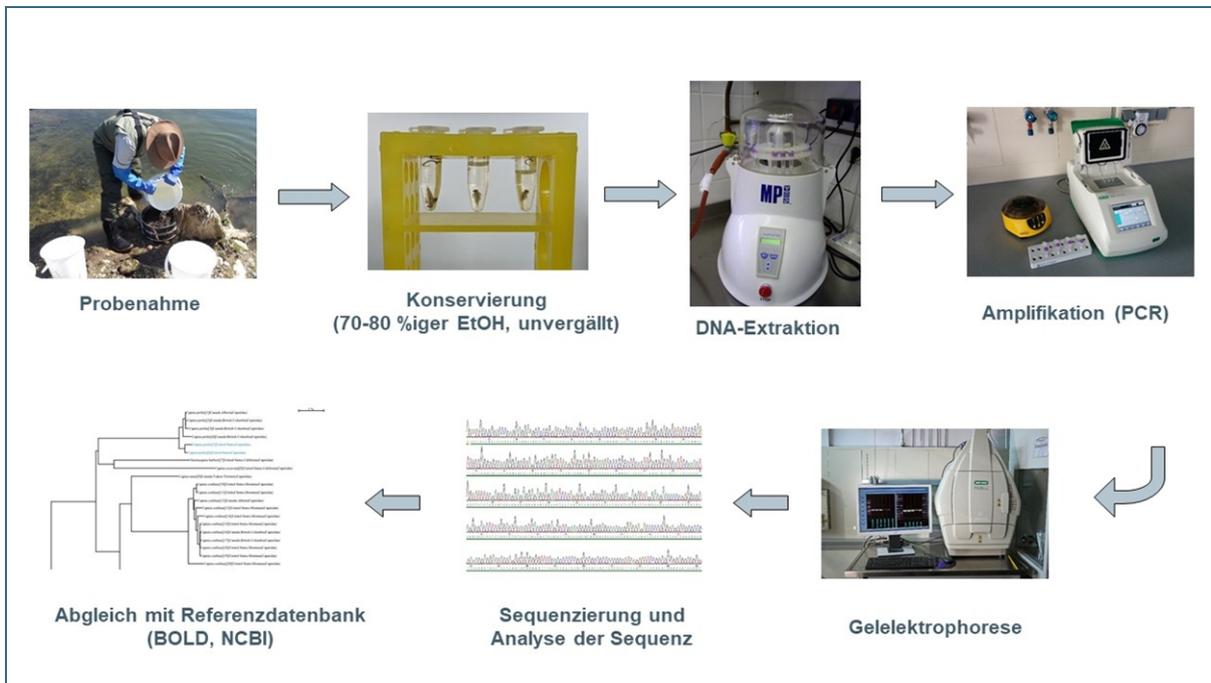


Abb. 1: DNA-Barcoding von Einzelorganismen: Arbeitsschritte

2.1 Probenahme

Die Probenahme der Makrozoobenthos (MZB)-Proben erfolgte durch die Regierungen bzw. Wasserwirtschaftsämter. Das Probenmaterial wurde in 70 – 80 %igem, unvergälltem Alkohol (EtOH) konserviert. Die Vorgehensweise zur Probenkonservierung ist im Handbuch tGewa Teil B 1.1 „Monitoring WRRL– Makrozoobenthosbeprobung in Fließgewässern“ in den Kapiteln 3.10 (Entnahme von Organismen) und 4.3 (Genetische Analysen) beschrieben. Es wird hier explizit darauf hingewiesen, dass eine genetische Analyse der konservierten Tiere nur dann durchgeführt werden kann, wenn dem Alkohol keine Vergällungsmittel zugesetzt worden sind.

2.2 DNA-Extraktion

Für das DNA-Barcoding wurde ausschließlich organismische DNA verwendet. Die Einzelorganismen wurden mit 70 %igem EtOH gespült, um Anhaftungen (wie z.B. andere Organismen des MZB) zu entfernen. Von jeder Probe wurde ein ca. 2-3 mm langes Gewebe-Stück für die Extraktion verwendet. Nach Vergleich verschiedener Extraktions-Methoden und kommerzieller Extraktions-Kits erwies sich der DNeasy Power Soil-Kit der Firma Qiagen als besonders gut geeignet.

Probleme traten auf, nachdem der DNeasy PowerSoil-Kit 2021 von der Firma Qiagen aus dem Programm genommen und durch den DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit ersetzt wurde. Beide Kits unterscheiden sich in den verwendeten Extraktionsröhrchen. Diese sog. „PowerBead Tubes“ enthalten eine Matrix an speziellen Kügelchen, die sich in Material (z.B. Glas, Keramik, Zirkoniumsilikat, Granat) und Durchmesser (0,1 mm – 6 mm) unterscheiden. Es hängt vom Probenmaterial ab, welches Material und welche Größe der Kügelchen die bestmögliche Homogenisierung und damit letztendlich auch größte DNA-Ausbeute liefert.

Die Extraktionsröhrchen des neuen DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kits enthalten eine Matrix aus feinen Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,1 mm, wohingegen sich die Matrix der Tubes des alten DNeasy PowerSoil-Kits aus wesentlich größeren Granat-Beads (0,7 mm) zusammensetzt. Offensichtlich wird das Insektenmaterial durch die feinen Glasperlen nicht hinreichend homogenisiert, was dazu führte, dass gar keine DNA extrahiert wurde oder die Ausbeute nur sehr gering war. Nach Recherche wurde ein Lieferant ausfindig gemacht, über den die „alten“ PowerBead Tubes mit Granat-Perlen bezogen werden können.

2.3 Amplifikation des Markergens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als Markergen (oder molekularer Marker) bezeichnet man in der Molekularbiologie eindeutig identifizierbare, kurze DNA-Abschnitte, deren Ort im Genom bekannt ist. Ein gutes Markergen zeichnet sich dadurch aus, dass es sowohl hoch konservierte als auch variable Bereiche besitzt. Die stark konservierten Bereiche sind für alle bzw. die meisten Organismen gleich und können daher gut als Primerbindungsstellen verwendet werden. Die variablen Bereiche hingegen eignen sich zur Unterscheidung der Organismen. Zur Artbestimmung von Tieren hat sich das mitochondriale Genom bewährt, welches in aktiven Zellen in hoher Kopienzahl vorliegt und maternal vererbt wird. Als besonders geeignet erwies sich das Gen für die Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase (COI; Elbrecht und Leese 2017a, 2017b), weil dieses Gen zwischen verschiedenen Arten stärkere Unterschiede aufweist als die anderen mitochondrialen Gene. Hier liegen auch die meisten Vergleichssequenzen in den Datenbanken vor. Das COI-Gen wird daher international standardmäßig für das DNA-Barcoding verwendet (siehe Abb. 2). Die Artbestimmung erfolgt anhand der DNA-Sequenz dieses Markergens. Bevor die DNA-Sequenz ermittelt werden kann, muss das Markergen zunächst mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt werden.

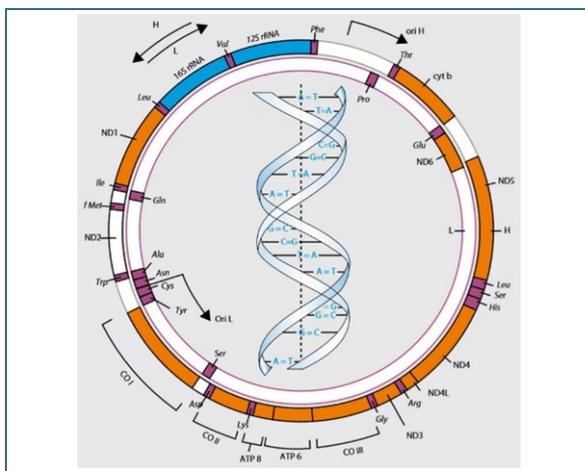


Abb. 2:
Mitochondriales Genom mit Gen für die Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase (aus: Russell 2005)

Ein häufig zur Vervielfältigung (Amplifikation) der 5'-Region des COI-Gens von Invertebraten beschriebenes Primerpaar ist LCO1490 - HCO2198, welches 1994 von Folmer et al. publiziert wurde (siehe Tab. 1 und Abb. 3). Dieses zeigt jedoch oft keinen ausreichenden Erfolg. Daher wurden in dem vorangegangenen Projekt eigene Primer entwickelt und getestet (Morawetz und Schade 2021). Dabei lieferte die Primerkombination neo21 – neo42 die besten Ergebnisse. Auch die Primerkombination TRI140 – neo 42 erwies sich als geeignet. Der forward primer TRI140 wurde speziell für MZB-Proben aus der Ordnung der Köcherfliegen (Trichoptera) entwickelt, da die PCR mit dem Primerpaar neo21 – neo42 für diese Organismen des Öfteren kein Produkt lieferte. Auch mittels Kombination der Primer neo43 – y1w2r5 war häufig eine erfolgreiche Amplifikation möglich.

In diesem Projekt wurden neben den genannten Primern auch in der Literatur publizierte Primerkombinationen getestet und hinsichtlich ihrer Praxistauglichkeit bewertet (siehe Tab. 1 und Abb. 3).

Tab. 1: Verwendete Primer und deren Sequenzen (F = forward primer; R = reverse primer)

Primer		Sequenz (5' → 3')	Referenz
LCO1490	F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. (1994)
HCO2198	R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. (1994)
neo21	F	TYTCHACWAAAYCAYAARGAYATYGG	Morawetz und Schade (2021)
neo42	R	ACTTCWGGRTGWCCAAARAATC	Morawetz und Schade (2021)
TRI140	F	CTATAATGTTCTAGTWACAGCHCATGC	Morawetz und Schade (2021)
neo43	F	TGATTTTTTGGTCAYCCTGAAGTTTA	Morawetz und Schade (2021)
y1w2r5	R	GCTCCYATAGAWARWACATARTGRAARTGRGC	Morawetz und Schade (2021)
BF3	F	CCHGAYATRGCHTTYCCHCG	Elbrecht et al. (2019)
BR2	R	TCDGGRTGNCCRAARAAYCA	Elbrecht und Leese (2017b)
fwhF2	F	GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC	Vamos et al. (2017)
fwhR2n	R	GTRATWGCHCCDGCTARWACWGG	Vamos et al. (2017)

Die Amplifikation des Markergens erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler der Firma Bio-Rad (iCycler). Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 30 µl) enthielt 15 µl Hot-Star Taq Master-Mix (Qiagen), je 833 nmol/l forward und revers Primer und 1 µl des DNA-Extrakts. Die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer (Annealing) wurde in Vorversuchen ermittelt und lag bei 40 °C. Folgendes Temperaturprotokoll wurde verwendet: 95 °C für 15 min (Aktivierung der Polymerase) und 40 Zyklen bei 95 °C für 30 s (Denaturierung), 40 °C für 30 s (Annealing) und 72 °C für 90 s (Elongation). Im Anschluss daran folgte ein finaler Elongationsschritt bei 72 °C für 7 min. Danach wurde die Temperatur bei 15 °C gehalten.

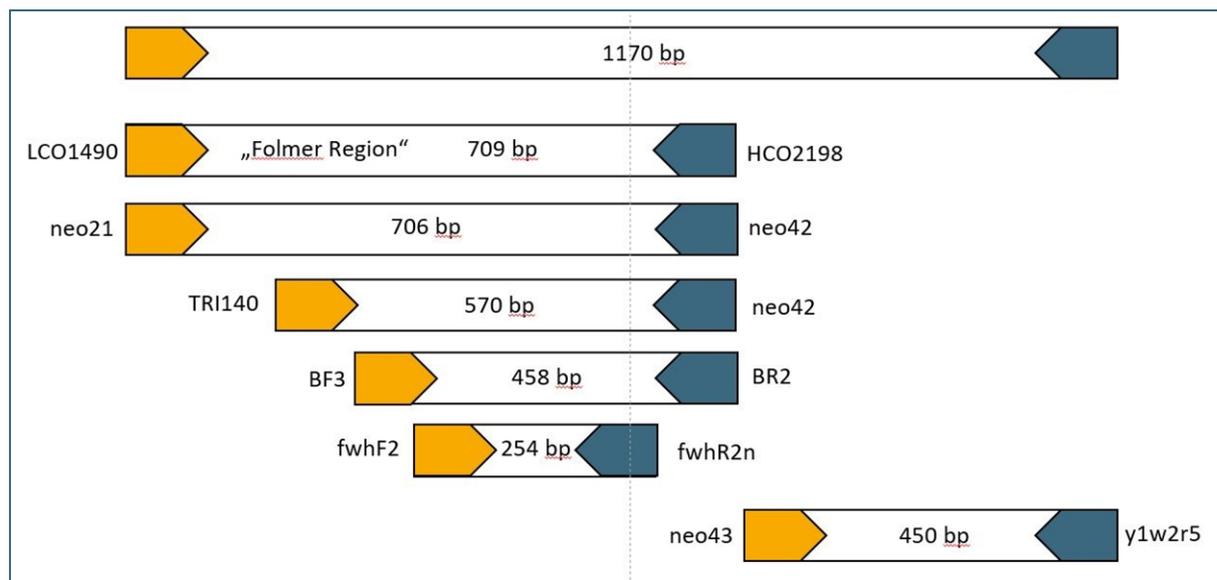


Abb. 3: Eingesetzte Primer zur Amplifikation von Genabschnitten der Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase (COI) und Länge der Amplifikate (bp: Basenpaare; orange: forward primer; grau: revers primer)

Zur Überprüfung von Menge und Qualität der amplifizierten Genabschnitte wurden je 7,5 µl der PCR-Produkte in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Um die Größe der Fragmente abschätzen zu können, wurde ein sog. DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen, der DNA-Fragmente mit bekannter Größe enthält. Durch Vergleich mit diesem Größenstandard kann die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Das Ergebnis wurde fotografisch dokumentiert.

Bevor die PCR-Produkte zur Sequenzierung verschickt werden, müssen diese aufgereinigt werden, um überschüssige, nicht-eingebaute Primer und Nukleotide abzutrennen. Dies erfolgte durch eine enzymatische Behandlung mit dem ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup-Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher). Dazu wurden je 5 µl des Exo/Sap-Reagenzes zu den PCR-Produkten gegeben und die Ansätze zunächst für 30 min bei 37 °C und danach für 30 min bei 85 °C inkubiert.

2.4 Sequenzierung und Sequenz-Analyse

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch die Firma Eurofins. Die Sequenzdaten können online auf der Homepage der Firma abgerufen werden. Die FASTA-Formate der Sequenzen wurden in Word eingelesen und anschließend mit Hilfe eines Makros bearbeitet, um Zeilenumbrüche zu entfernen. Zum Teil war eine manuelle Nachbearbeitung der Sequenzen notwendig, um unklare Nukleotide (sog. Wobble-Basen) eindeutig zuzuordnen. Hierzu wurden die Chromatogramme der Sequenzen herangezogen (siehe Abb. 4).

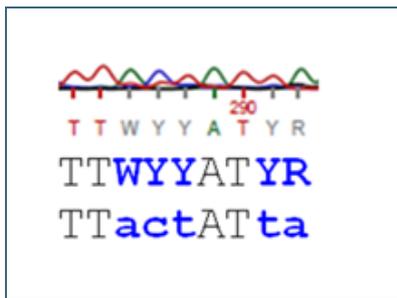


Abb. 4:

Manuelle Nachbearbeitung von Sequenzdaten mit Hilfe der Chromatogramme (grün = A; rot = T; schwarz = G; blau = C): Eindeutige Nukleotide (A, T, G, C) werden in Großbuchstaben in schwarzer Schrift dargestellt. Ist das Ergebnis der Rohdaten nicht eindeutig (sog. Wobble-Basen, z.B. W, Y, R etc.), wird der höhere Peak als relevant gewertet und die Wobble-Base durch die entsprechende „normale“ Base ersetzt. Diese Nukleotide werden als kleine Buchstaben in blauer Schrift gekennzeichnet. Falls nicht erkennbar ist, welcher Peak der höhere ist, wird die Wobble-Base belassen.

Die Qualität der Sequenz berechnet sich aus dem Anteil eindeutig bestimmbarer Nukleotide im Verhältnis zur Gesamtzahl der Nukleotide. Werte zwischen 98 und 100 % zeigen eine sehr gute Qualität der Sequenz an. Liegen die Werte unterhalb von 80 % bedeutet das entweder eine Kontamination der Probe oder eine ungenügende Ausbeute an PCR-Produkt zur Sequenzbestimmung.

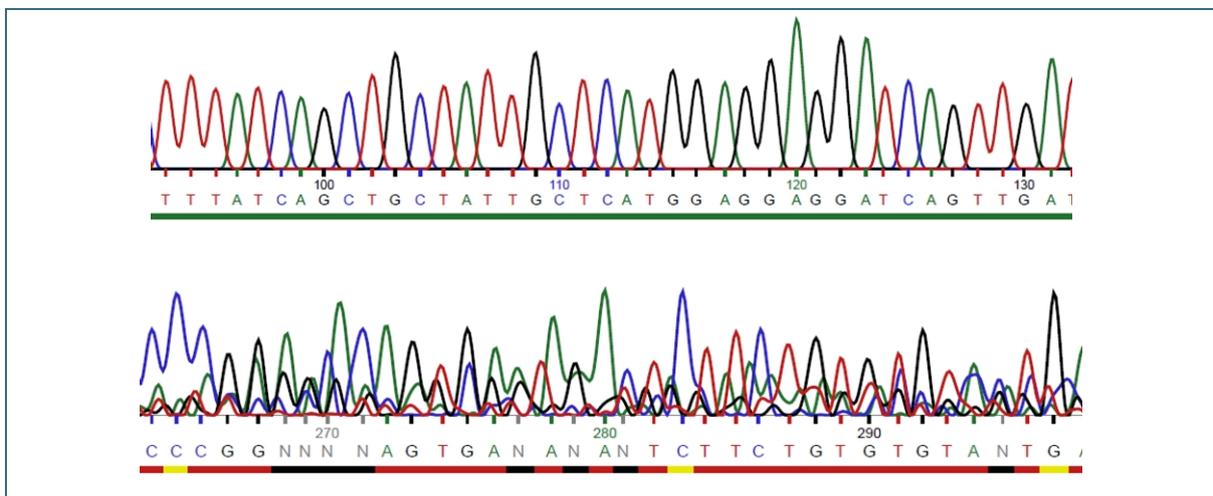


Abb. 5: Chromatogramm einer qualitativ guten Sequenz (oben) und einer Mischsequenz (unten)

Manchmal liefert die Sequenzierung eine Mischsequenz. Dies kann z.B. passieren, wenn in einem Probenahme-Gefäß Zellen verschiedener Organismen enthalten waren. Im Verlauf der PCR werden dann mehrere unterschiedliche Produkte amplifiziert (siehe Abb. 5). In diesem Fall kann keine Auswertung der Sequenzdaten erfolgen.

2.5 Datenbankanalyse

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mittels BLAST und BOLD.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ist das weltweit am meisten genutzte Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten. Die zu bestimmende Sequenz wird dabei mit bereits in der Datenbank vorhandenen Sequenzen verglichen. Das Programm liefert als Ergebnis eine Reihe von Alignments, in denen die Stücke der gesuchten Sequenz ähnlichen DNA-Abschnitten aus der Datenbank gegenübergestellt werden. Dabei wird angegeben, wie hoch die Übereinstimmung ist. Das Tool kann online unter https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome aufgerufen werden.

Das Datenbanksystem BOLD (Barcode of Life Data System) widmet sich speziell dem DNA-Barcoding und enthält DNA-Sequenzen der 5'-Region des COI-Gens. Die Plattform ist ebenfalls online öffentlich zugänglich (<https://www.boldsystems.org/>). Neben den DNA-Sequenzen enthält die Plattform auch Daten zum Fundort und weitere Informationen wie Taxonomie, Lagerungsort, Fotos, Verbreitungskarten etc.

Bei der Sequenzanalyse mit BLAST ist zu beachten, dass die in der Datenbank hinterlegten Sequenzen im Gegensatz zu BOLD keine Qualitätssicherungsmaßnahmen durchlaufen haben. BLAST kann somit Fehler enthalten. Dafür sind die in BOLD hinterlegten Daten weniger umfangreich.

Ist die Qualität der gesuchten Sequenz sehr viel besser als die Übereinstimmung mit der aufgeführten Spezies, handelt es sich bei der Probe wahrscheinlich um eine noch nicht sequenzierte oder in der Datenbank hinterlegte Art.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Vergleich verschiedener Primerkombinationen

Es wurden fünf Primerkombinationen getestet, die sich in der Lage innerhalb des COI-Gens und in der Länge des PCR-Produkts (bp = Basenpaare) unterscheiden (siehe auch Abb. 3).

neo21f – neo42r:	706 bp	(selbst entwickelt)
BF3 – BF2:	458 bp	(aus Literatur)
TRI140f – neo42r:	570 bp	(selbst entwickelt)
fwhF2 – fwhR2n:	254 bp	(aus Literatur)
neo43f – y1w2r5:	450 bp	(selbst entwickelt)

In Abb. 6 ist die Effektivität im Hinblick auf eine erfolgreiche Amplifikation (Vervielfältigung, PCR-Produkt) der jeweiligen Genabschnitte dargestellt. Diese war bei der Primerkombination neo43f – y1w2r5 mit fast 93 % am höchsten. Sehr effektiv war auch die Kombination BF3 – BR2, die bei 85 % der Proben ein PCR-Produkt lieferte. Die Kombinationen neo21f – neo42r und fwhF2 – fwhR2n lagen in ihrer Effektivität etwas niedriger (70 bzw. 76 %), am schlechtesten schnitt das Primerpaar TRI140f – neo42r ab (63 %). Bei Verwendung der Primer fwhF2 – fwhR2n fällt der mit fast 20 % relativ hohe Anteil an Mischsequenzen auf, der bei den anderen Kombinationen deutlich niedriger lag.

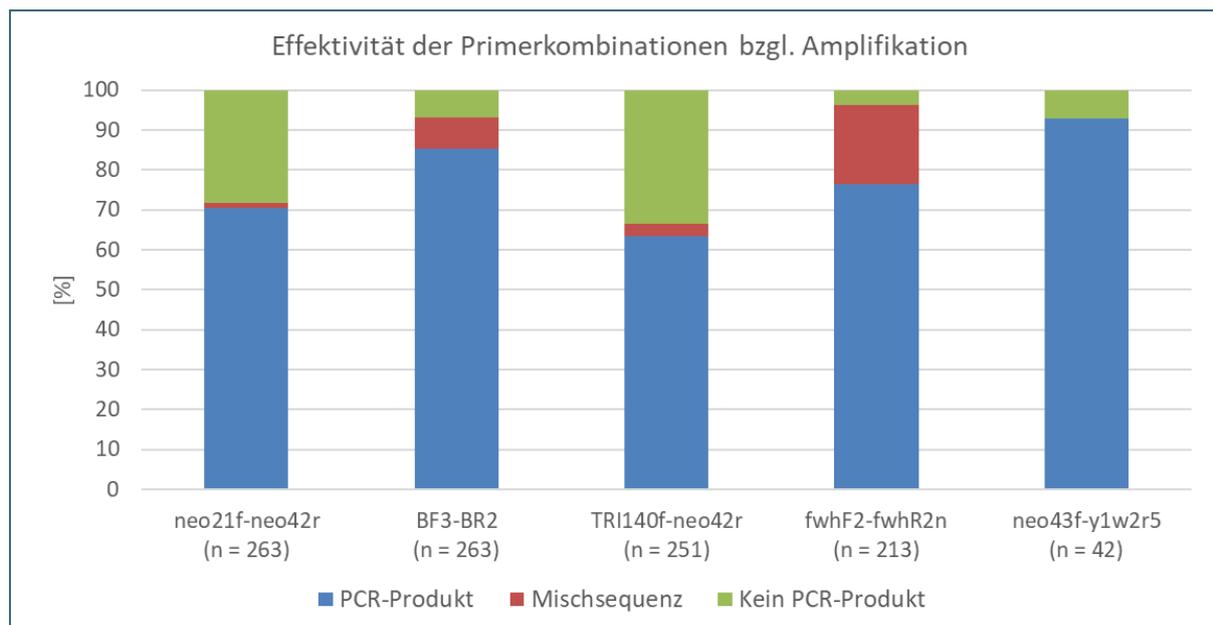


Abb. 6: Vergleich der Primerkombinationen im Hinblick auf eine erfolgreiche Amplifikation (Vervielfältigung) des Genabschnitts (n = Anzahl der untersuchten Proben)

Eine erfolgreiche Amplifikation der Genabschnitte ist eine Voraussetzung für die nachfolgende Sequenzanalyse. Entscheidend ist jedoch, ob die entsprechende DNA-Sequenz auch einen Treffer in der Datenbank liefert. Daher wurden die PCR-Produkte der verwendeten Primerkombinationen auch diesbezüglich miteinander verglichen (Abb. 7). Hier zeigte sich, dass die Kombination neo43f – y1w2r5 zwar bezüglich der Amplifikation am effektivsten war, jedoch nur bei knapp 8 % der untersuchten Proben ein valides Ergebnis nach der Sequenzanalyse lieferte. In mehr als 90 % der Fälle wurde kein plausibler Treffer beim Datenbankabgleich erzielt, entweder weil die Sequenz qualitativ unzureichend (2,5 %) oder nicht in der Datenbank enthalten war (~ 90 %). Letzteres liegt vermutlich daran, dass der entsprechende Sequenzabschnitt zwar innerhalb des COI-Gens, nicht jedoch innerhalb der sog. „Fol-

mer Region“ liegt (siehe Abb. 3). Die „Folmer Region“ ist ein Abschnitt des COI-Gens, für dessen Vielfältigkeit bereits 1994 ein Primerpaar entwickelt wurde (Folmer et al. 1994) und die seitdem als universelle DNA-Barcoding-Region Anwendung findet. Aufgrund dieser langen Geschichte liegen für diesen Genabschnitt auch die meisten Sequenzdaten vor. Für DNA-Abschnitte außerhalb dieses Bereichs ist die Datenlage in den Referenzdatenbanken offensichtlich noch unzureichend. Obwohl zunächst sehr vielversprechend, erwies sich die Kombination neo43f – y1w2r5 somit für das DNA-Barcoding der MZB-Organismen als ungeeignet und wurde daher im weiteren Verlauf nicht mehr eingesetzt.

Für alle anderen Primerpaare wurden sehr gute Trefferquoten erzielt. Das gilt insbesondere für die Kombinationen neo21f – neo42r und BF3 – BF2, deren PCR-Produkte in ca. 97 % der Fälle ein Ergebnis beim Datenbankabgleich lieferten. Die jeweiligen Sequenzabschnitte liegen alle in der o.g. „Folmer Region“, für die – wie bereits erwähnt – die Datengrundlage sehr umfangreich ist. Bezüglich der Kombination fwhF2 - fwhR2n fällt auf, dass die verwendbare DNA-Sequenz in ca. 10 % der Fälle zu kurz für einen Datenbankabgleich war. Dieser Anteil lag bei den anderen Kombinationen deutlich niedriger. Dazu muss man wissen, dass die Datenbank BOLD für einen Sequenzabgleich eine minimale Sequenzlänge von 80 Basenpaaren benötigt. Die Sequenzqualität eines PCR-Produkts ist jedoch nicht immer über seine gesamte Länge qualitativ für einen Datenbankabgleich geeignet und so kann es vorkommen, dass nur ein kleinerer Teil der Sequenz verwendbar ist. Da das PCR-Produkt von fwhF2 – fwhR2n mit 254 Basenpaaren wesentlich kürzer als die PCR-Produkte der anderen Primerpaare ist, kam es hier wesentlich häufiger vor, dass der verwendbare Teil der Sequenz die Mindestlänge von 80 Basenpaare unterschritt.

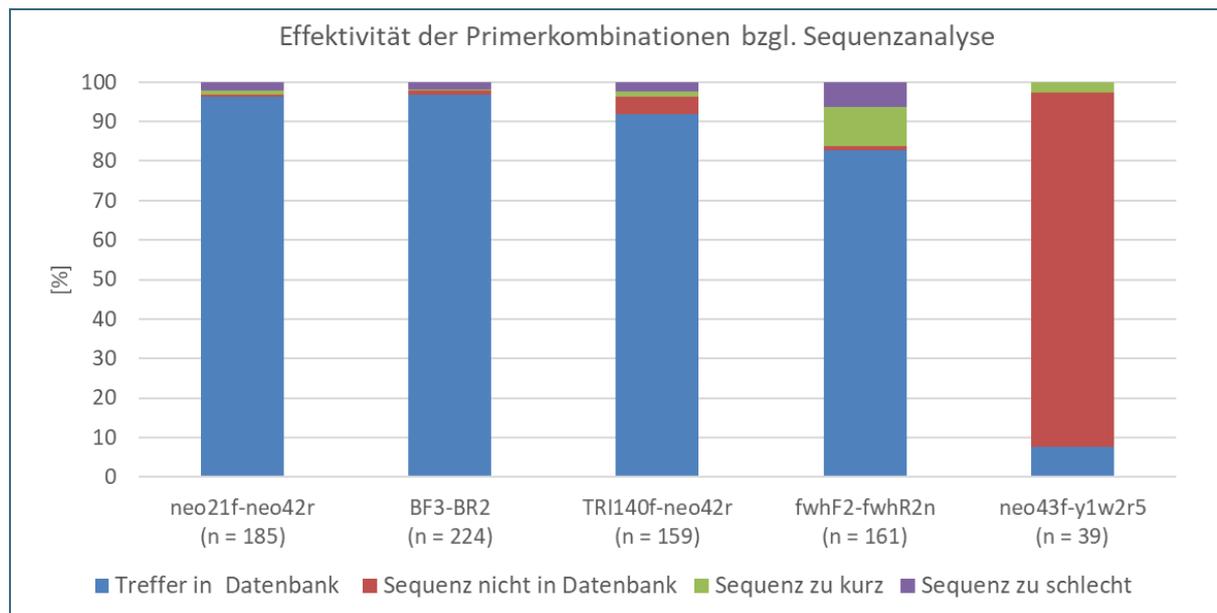


Abb. 7: Vergleich der Primerkombinationen im Hinblick auf eine erfolgreiche Sequenzanalyse des PCR-Produkts (n = Anzahl der untersuchten Proben)

Welche Primerkombination letztendlich für die Angabe des Ergebnisses ausgewählt wurde, ist in Abb. 8 dargestellt. Dabei wurde die Höhe der Übereinstimmung (Similarity) zwischen der zu bestimmenden DNA-Sequenz und den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen betrachtet. Bei einer Übereinstimmung von > 99 % wurde die Artbestimmung als gesichert betrachtet. In vielen Fällen wurde für alle Primerpaare dasselbe Ergebnis mit ähnlich hoher Übereinstimmung erzielt und folglich die Entscheidung zugunsten einer Kombination schwierig. Hier wurde dann als weiteres Kriterium die Qualität der DNA-Sequenz herangezogen. Letztendlich wurde für die Mehrzahl an Proben (60 %) das Ergebnis des Datenbankabgleichs des Sequenzabschnitts neo21f – neo42r ausgewählt.

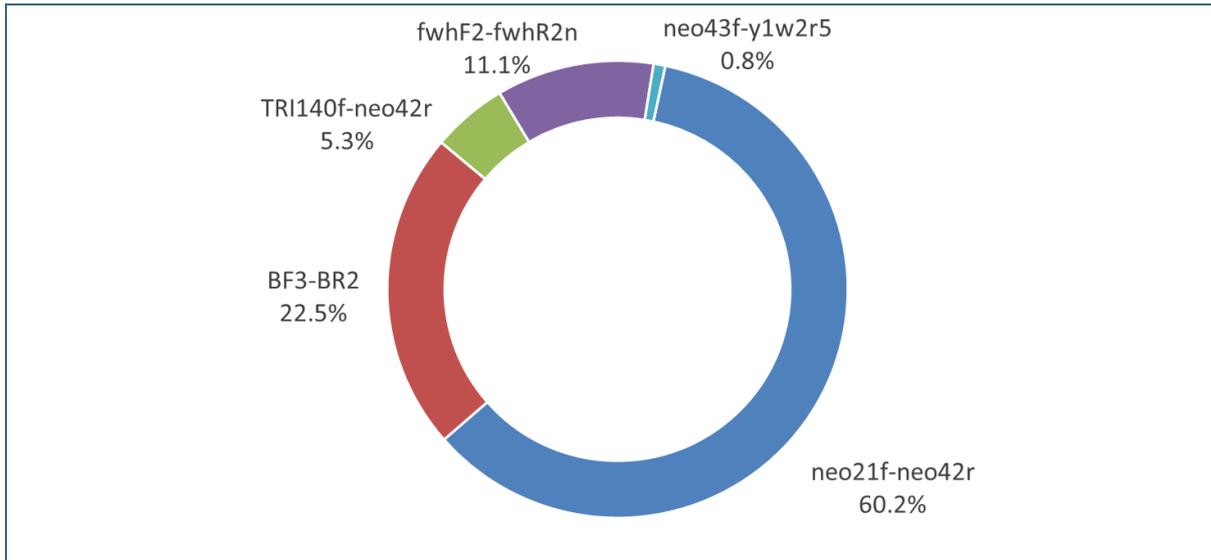


Abb. 8: Für Ergebnis-Angabe verwendete Primerkombinationen

3.2 Untersuchte Makrozoobenthos-Taxa

Die Mehrzahl der untersuchten Proben (knapp 50 %) gehörte den EPT-Taxa an (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera; siehe Abb. 9). Dabei war der Anteil an Köcherfliegen (Trichoptera) mit 28 % besonders groß. Die zweithäufigste Gruppe waren mit knapp 22 % Organismen aus der Ordnung der Zweiflügler (Diptera). Zu den weiteren untersuchten Taxa gehörten u.a. Coleoptera, Hirudinea, Gastropoda, Bivalvia, Crustacea und Arachnida.

Die Ergebnisse der genetischen Identifizierung wurden den Ämtern bzw. Regierungen nach erfolgter Sequenzanalyse mitgeteilt und dort von Experten noch einmal hinsichtlich Plausibilität überprüft.

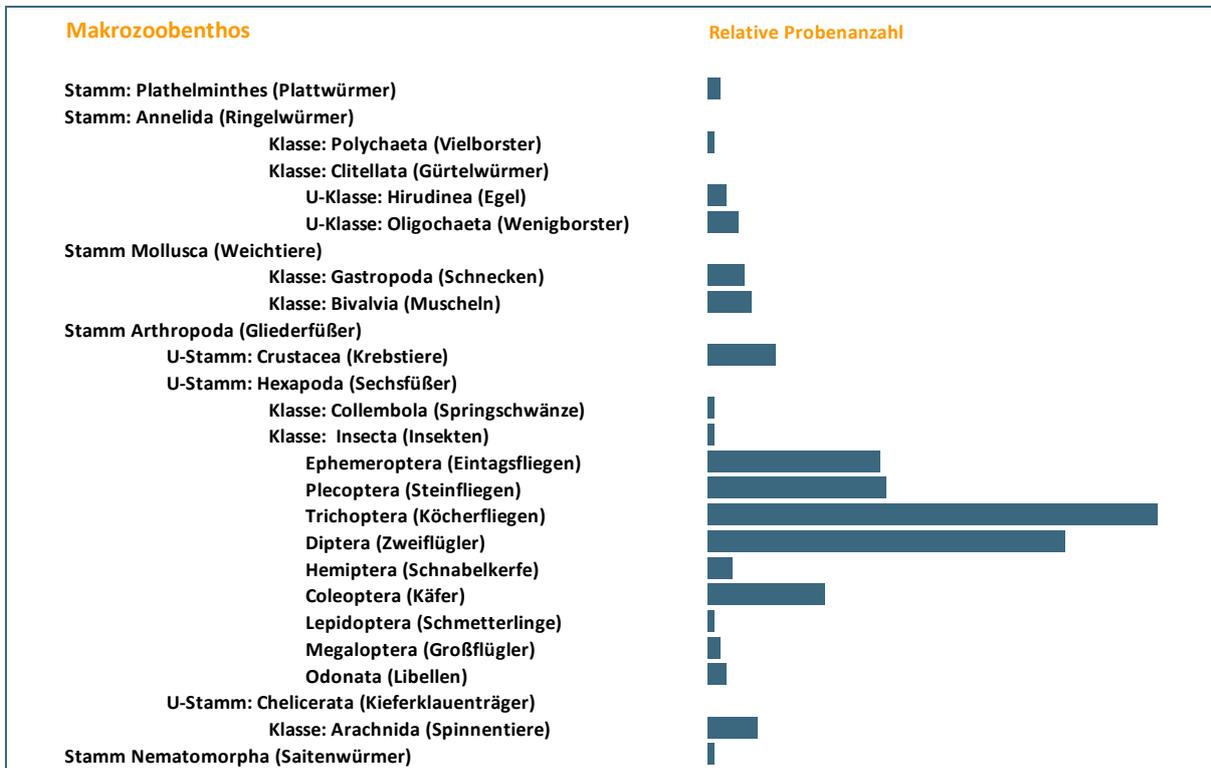


Abb. 9: Genetisch überprüfte Taxa

3.3 Genetische Bestimmung der Makrozoobenthos-Taxa mittels Sequenzanalyse

91 % der Proben konnten mittels DNA-Barcoding genetisch identifiziert werden (siehe Abb. 10). Bei 5 % der Proben lieferte die Sequenzanalyse kein Ergebnis, da die Sequenz entweder nicht in der Datenbank enthalten (2 %) oder die Qualität zu schlecht war (z.B. Mischsequenz, 3 %). 4 % der Proben wurden nicht bestimmt, da das Markergen mit keiner der verwendeten Primerpaare vervielfältigt werden konnte. Hier war die DNA der konservierten Probe möglicherweise bereits zu stark degradiert oder die verwendeten Primer waren nicht geeignet. Von den genetisch identifizierten Proben wurden 79 % bis auf Artniveau und 21 % bis zur Gattungsebene bestimmt.

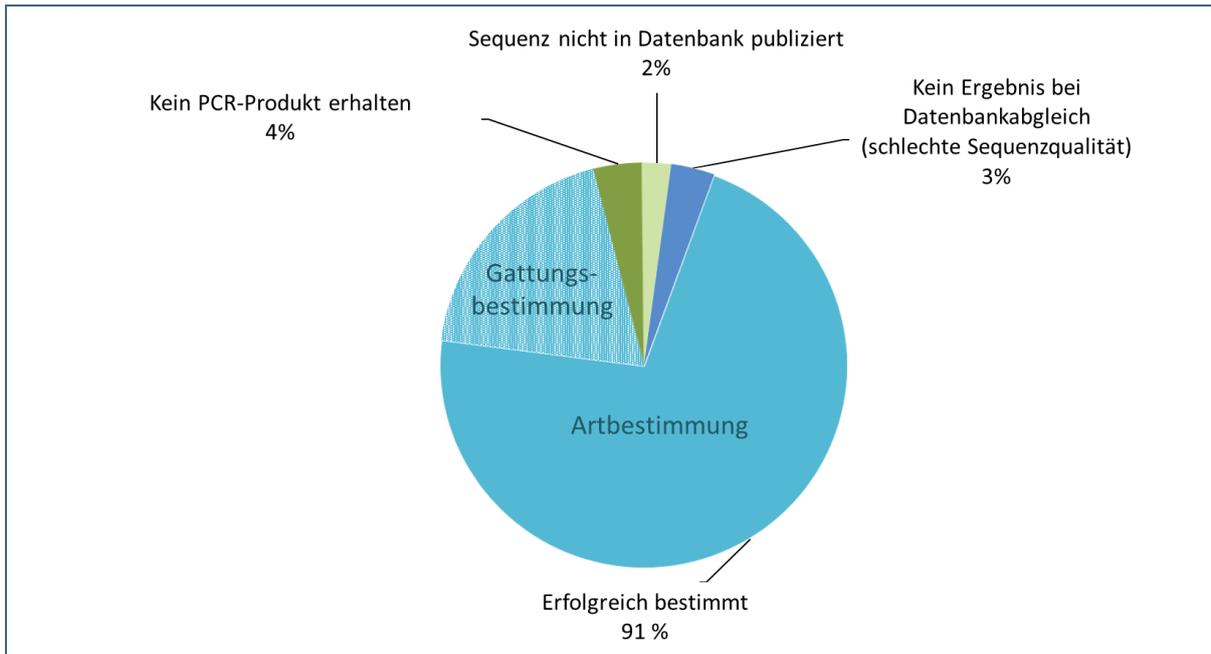


Abb. 10: DNA-Barcoding der Makrozoobenthos-Proben: Prozentuale Anteile an erfolgreich bestimmten bzw. nicht-bestimmbaren Proben

In Tabelle 2 ist detaillierter aufgeführt, wie hoch der Anteil erfolgreich bestimmter Organismen innerhalb verschiedener MZB-Taxa lag. Während bei den Ordnungen Ephemeroptera, Plecoptera und Coleoptera nahezu alle Proben genetisch bestimmt werden konnten, lag der Anteil bei den Trichoptera mit 19 % nicht identifizierter Organismen im Vergleich zu den anderen Taxa sehr hoch. Dies lag entweder an einer sehr schlechten Sequenzqualität (z.B. Mischsequenzen) oder daran, dass kein PCR-Produkt amplifiziert wurde. Im Gegensatz dazu bestand bei den Diptera die Ursache meist darin, dass die Sequenz trotz sehr guter Qualität beim Datenbankabgleich keinen Treffer lieferte. Hier ist vermutlich die Datengrundlage in der Referenzdatenbank noch unzureichend.

MZB-Taxa	Gesamt	bestimmt
Ephemeroptera	28	27 (96 %)
Plecoptera	29	29 (100 %)
Trichoptera	73	59 (81 %)
Diptera	58	54 (93 %)
Coleoptera	19	19 (100 %)

Tab. 2: Anteil erfolgreich bestimmter Organismen innerhalb verschiedener MZB-Taxa

Für alle genetisch identifizierten Proben wurde ein Abgleich mit den Daten der morphologischen Bestimmung vorgenommen. Je nach Übereinstimmung zwischen genetischer und morphologischer Bestimmung wurden die Ergebnisse in sieben Kategorien eingeteilt (Abb. 11). Beispiele für die jeweiligen Kategorien sind in Tab. 3 aufgeführt.

Bei knapp 49 % der Proben – in Abb. 11 blau dargestellt – bestätigte das DNA-Barcoding die morphologisch identifizierte Art (35 %) bzw. Gattung (ca. 14 %). Zu den Letztgenannten, bei denen zwar die Gattung genetisch bestätigt, die Art jedoch nicht bestimmt werden konnte, gehörten Organismen der Gattungen *Dreissena*, *Leuctra*, *Rhithrogena*, *Sericostoma* und *Simulium*. Dabei waren nicht immer alle Arten einer Gattung betroffen. So war innerhalb der Gattung *Dreissena* die Bestimmung von *Dreissena polymorpha* eindeutig, wohingegen *D. bugensis* und *D. rostriformis* nicht unterschieden werden konnten. Auch innerhalb der Gattung *Leuctra* gab es Organismen, die eindeutige Treffer ergaben (*L. aurita* und *L. braueri*), andere hingegen nicht. *L. fusca* und *L. inermis* konnten genetisch nicht differenziert werden, ebenso wie *L. mayor* und *L. albida*. Weitere Details können der Ergebnis-Tabelle im Anhang entnommen werden.

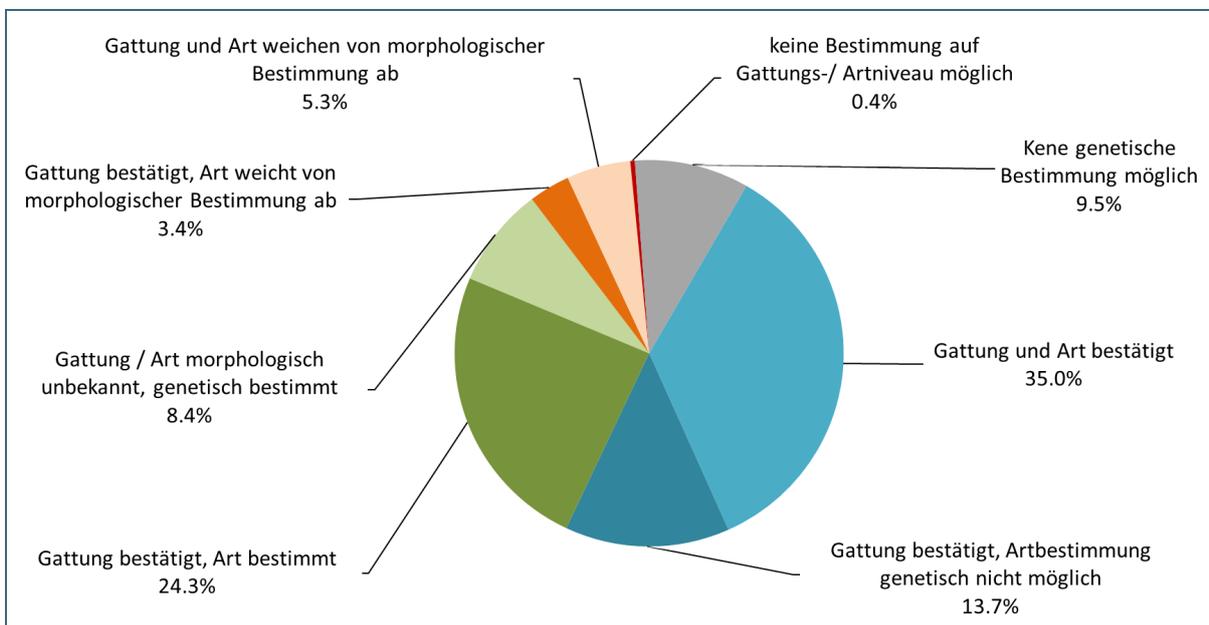


Abb. 11: Übereinstimmung zwischen genetischer und morphologischer Bestimmung aller untersuchten MZB.-Proben

Etwa 50 % der untersuchten Proben war morphologisch maximal bis auf Gattungsebene charakterisiert. Hier erhoffte man sich durch das DNA-Barcoding eine weiterführende Identifizierung. Dies war auch für zahlreiche Proben erfolgreich. Bei etwa der Hälfte dieser Proben konnte ein nur bis zur Gattung bestimmter Organismus bis auf Artniveau identifiziert werden (entspricht 24,3 % aller untersuchten Proben). Auch für Proben, bei denen weder Gattung noch Art bekannt waren, ermöglichte das Barcoding eine Artbestimmung (8,4 % aller untersuchten Proben). So wurde beispielsweise ein Organismus aus der Gruppe der Tanypodinae (Unterfamilie der Zuckmücken) als *Macropelopia nebulosa* identifiziert. Insgesamt lieferte das DNA-Barcoding für fast 33 % der untersuchten Proben einen Mehrerfolg an Information im Vergleich zur morphologischen Bestimmung (in Abb. 11 grün hinterlegt).

Zu Abweichungen zwischen morphologischer und genetischer Bestimmung kam es bei 8,7 % der Proben (in Abb. 11 rot markiert). Hier ist eine Plausibilitätsüberprüfung durch Taxonomie-Experten erforderlich. Diese Proben müssen noch einmal eingehend betrachtet und schließlich entschieden werden, ob das Ergebnis der morphologischen oder der genetischen Bestimmung verwendet wird. So wurde beispielsweise ein Organismus aus der Ordnung Lepidoptera (Schmetterlinge) morphologisch als

Cataclysta lemnata (Wasserlinsenzünsler) identifiziert, während die genetische Bestimmung *Epinotia tenerana* (Haselnuss-Kätzchenwickler) ergab. Hier wurde die genetische Bestimmung durch die Experten als fragwürdig erachtet, da es sich bei *Epinotia tenerana* um eine terrestrisch vorkommende Art handelt.

Es gab auch Fälle, in denen die Ergebnisse von morphologischer und genetischer Identifizierung so weit auseinanderlagen, dass ein Irrtum bei der morphologischen Bestimmung von vorne herein ausgeschlossen werden konnte. Hier lagen entweder Verunreinigungen der Probe vor oder es handelte sich um Beifang, der zusammen mit dem eigentlich zu bestimmenden Organismus eingesammelt wurde. Beispielsweise leben viele Zuckmückenlarven auf anderen im Wasser vorkommenden Insektenlarven, beispielsweise Steinfliegen, Köcherfliegen, Zweiflüglern (Burmeister und Reiss 2003). Möglich ist auch, dass es sich um Beutetiere des Zielorganismus handelt. Besonders bei Köcherfliegen ist bekannt, dass sie beim Konservieren in Alkohol ihren Mageninhalt erbrechen.

Tab. 3: Beispiele für die verschiedenen Kategorien der Übereinstimmung zwischen genetischer und morphologischer Bestimmung

Kategorie	Proben-ID (LfU)	Morphologische Bestimmung	Genetische Bestimmung (DNA-Barcoding)	Similarity [%]
Gattung und Art bestätigt	G21-011	<i>Agapetus ochripes</i>	<i>Agapetus ochripes</i>	100
Gattung bestätigt, Art weicht von morphologischer Bestimmung ab	G22-012	<i>Baetis vernus</i>	<i>Baetis nexus</i>	100
Gattung bestätigt, Artbestimmung genetisch möglich	G22-021	<i>Chaoborus</i> sp.	<i>Chaoborus flavicans</i>	100
	G21-082	<i>Leuctra</i> sp.	<i>Leuctra braueri</i>	99.68
Gattung bestätigt, Artbestimmung genetisch nicht möglich	G21-028	<i>Leuctra</i> sp.	<i>Leuctra fusca</i>	100
			<i>Leuctra inermis</i>	100
Gattung und Art weichen von morphologischer Bestimmung ab	G22-076	<i>Cataclysta lemnata</i>	<i>Epinotia tenerana</i>	100
	G21-045	Hydrachnida	<i>Lebertia porosa</i>	100
Morphologisch keine Bestimmung auf Gattungs-/ Artniveau; genetische Bestimmung möglich	G21-118	Tanypodinae	<i>Macropelopia nebulosa</i>	100
Morphologisch und genetisch keine Bestimmung auf Gattungs-/ Artniveau möglich	G21-130	Psychodidae	<i>Pneumia trivialis</i>	99.52
			<i>Pneumia nubila</i>	99.52
			<i>Satchelliella nubila</i>	99.52
			<i>Parajungiella longicornis</i>	99.19
			<i>Psychoda satchelli</i>	99.19

4 Fazit und Ausblick

Die genetische Bestimmung von Organismen ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören z.B. das gewählte Markergen, die Effizienz der eingesetzten Primer zur Vervielfältigung des Genabschnitts und die Qualität der Referenzdatenbanken, die zur Auswertung der Sequenzdaten herangezogen werden.

Im Rahmen des Projekts wurden verschiedene Primerkombinationen zur Vervielfältigung von Genabschnitten des Markergens COI von Organismen des Makrozoobenthos hinsichtlich ihrer Praxistauglichkeit verglichen und bewertet. Eine erfolgreiche Amplifikation der Genabschnitte ist zunächst einmal eine Voraussetzung für die nachfolgende Sequenzanalyse. Entscheidend ist jedoch, dass sich die entsprechende DNA-Sequenz auch erfolgreich mit der Referenz-Datenbank abgleichen lässt. Es hilft wenig, Primer für einen Gen-Abschnitt einzusetzen, für den die Datengrundlage in der Datenbank noch unzureichend ist. Anhand dieser Kriterien wurde ermittelt, welche Primerpaare zukünftig eingesetzt werden sollten, um das DNA-Barcoding der Makrozoobenthos-Organismen möglichst effizient zu gestalten. Die Primerkombinationen BF3 – BR2 und neo21f – neo42r lieferten für die meisten Proben ein PCR-Produkt und dieses ließ sich in über 95 % der Fälle erfolgreich mit den Referenzdatenbanken abgleichen. Alle MZB-Proben werden daher künftig standardmäßig zunächst einmal mit diesen beiden Primerkombinationen bearbeitet. Ergibt sich hier kein Resultat, wird in einem nächsten Schritt das Primerpaar fwhF2 – fwhR2n eingesetzt. Wie die vorliegende Untersuchung gezeigt hatte, war diese Kombination häufig dann erfolgreich, wenn alle anderen Primerkombinationen fehlgeschlagen waren.

Es gab eine Reihe an Proben, bei denen trotz effizienter Amplifikation des COI-Markergens und hoher Sequenzqualität des PCR-Produkts nur eine Bestimmung auf Gattungs-, nicht jedoch auf Artebene möglich war. Hier sind die genetischen Unterschiede auf dem entsprechenden Abschnitt des COI-Gens innerhalb verschiedener Arten der Gattung offensichtlich nicht groß genug für eine eindeutige Zuordnung auf Spezies-Ebene. Ist dies der Fall, müssen evtl. weitere Gene herangezogen werden, die eine bessere Differenzierung ermöglichen, sofern eine solche erforderlich ist (Schmid-Egger und Schmidt 2012).

In einigen Fällen kam es zu Abweichungen zwischen genetischer und morphologischer Bestimmung. Hier ist eine Plausibilitätsüberprüfung enorm wichtig. Liegen die Ergebnisse von morphologischer und genetischer Identifizierung so weit auseinander, dass ein Irrtum bei der morphologischen Bestimmung ausgeschlossen werden kann, ist dies relativ unproblematisch. Dabei kann es sich beispielsweise um Beifang handeln, der zusammen mit dem eigentlich zu bestimmenden Organismus eingesammelt wurde, oder Beutetiere aus dem Mageninhalt des Zielorganismus. In allen anderen Fällen muss eine eingehendere Betrachtung durch einen Fachexperten erfolgen, der dann entscheidet, ob das Ergebnis der morphologischen oder der genetischen Bestimmung verwendet wird.

Das A und O der genetischen Bestimmung ist die Vollständigkeit sowie die Qualität der Referenzsequenzen in den verfügbaren Datenbanken. Die Ergebnisse zeigten aber, dass die Referenzdatenbanken noch lückenhaft sind und es einheimische Arten gibt, deren Barcoding-Region nicht publiziert ist. Außerdem können die öffentlich zugänglichen Datenbanken – selbst wenn Qualitätssicherungsmaßnahmen durchlaufen werden – Fehler enthalten. Dies können unzureichende Sequenzdaten sein wie beispielsweise eine schlechte Qualität der Sequenz, Kreuzkontaminationen oder Sequenzierfehler, aber auch eine fehlerhafte Zuordnung des hinterlegten Organismus (Weigand et al. 2019, Pentinsaari et al. 2020, Grant et al 2021). All das kann dazu führen, dass sich beim Abgleich mit den Referenzdatenbanken nicht plausible Ergebnisse ergeben. Dies verdeutlicht wie wichtig es ist, die Datenbanken nicht nur mit weiteren Sequenzdaten zu füllen, sondern diese Daten auch einer sorgfältigen Qualitätskontrolle zu unterziehen (Pawlowski et al. 2020). Der sog. „Gold-Standard“ einer Referenzdatenbank sollte nur qualitätsgesicherte DNA-Barcodes enthalten und fehlende Referenzcodes sollten – auch durch Kooperation mit Universitäten und Museen -- eingepflegt werden. Strikte Standards und Qualitätskontrollen sind notwendig, um eine hohe Qualität der Referenzdatenbank zu gewährleisten. Dies

ist eines der Ziele des aktuell laufenden UBA-Projektes „dbDNA - Entwicklung einer Datenbank- und Analyseinfrastruktur für DNA-basiertes Monitoring im Gewässerschutz“ (<https://www.gedna.de/dbdna/>). Die Erstellung einer Liste qualitätsgesicherter DNA-Barcodes soll auf Grundlage der Operationellen Taxaliste sowie der Bundestaxaliste erfolgen. Die qualitätsgesicherten Barcodes sollen in die freshwaterecology.info Datenbank eingebunden und verfügbar gemacht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt des Projekts war die Unterstützung von Behörden im Rahmen des biologischen Fließgewässermonitorings. Hier kann zusammenfassend festgestellt werden, dass für zahlreiche Proben das Ergebnis der morphologischen Bestimmung durch die genetische Identifizierung bestätigt wurde. Nur für einen geringen Teil der Proben wurden Abweichungen festgestellt, deren Gründe jeweils im Einzelfall geklärt werden müssen. Bei etwa einem Drittel der untersuchten Organismen erlaubte das DNA-Barcoding eine genauere Identifizierung als die morphologische Charakterisierung. Dies stellt einen eindeutigen Mehrgewinn an Information dar und unterstreicht die Bedeutung von DNA-Barcoding als hilfreiches Instrument im Rahmen der biologischen Qualitätskontrolle. Die Methode wurde in Teil B 1.1 „Monitoring WRRL Makrozoobenthos“ in Kap. 3.10 (Entnahme von Organismen) und Kap 4.3 (Genetische Analysen) des HB tGewA aufgenommen.

5 Literatur

Burmeister, E.-G., Reiss, F. (2003). *Rheotanytarsus reissi*, eine zweite tuffbildende Wasserinsektenart (Diptera, Chironomidae). *Lauterbornia* 48, 77-88.

Elbrecht, V., Leese, F. (2017a). PrimerMiner: an R package for development and in silico validation of DNA metabarcoding primers. *Methods Ecol. Evol.* 8 (5), 622-626

Elbrecht, V., Leese, F. (2017b). Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Front. Environ. Sci.* 5, Article 11

Elbrecht, V., Braukmann, T.W., Ivanova, N.V., Prosser, S.W., Hajibabaei, M., Wright, M., Zakharov, E.V., Hebert, P.D., Steinke, D., Pochon, X. (2019). Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. *PeerJ* 7, e7745.

Folmer, O., Black, M., Wr, H., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.

Grant, D.M., Brodnicke, O.B., Evankow, A.M., Ferreira, A.O., Fontes, J.T., Hansen, A.K., Jensen, M.R., Kalaycı, T.E., Leeper, A., Patil, S.K., Prati, S., Reunamo, A., Roberts, A.J., Shigdel, R., Tyukosova, V., Bendiksby, M., Blaaid, R., Costa, F.O., Hollingsworth, P.M., Stur, E., Ekrem, T. (2021). The Future of DNA Barcoding: Reflections from Early Career Researchers. *Diversity* 2021, 13, 313.

Morawetz, C., Schade, M. (2021). Genetische Artbestimmung – ein Beitrag zur Qualitätssicherung in der biologischen Analytik von Oberflächengewässern. Bayerisches Landesamt für Umwelt, Abschlussbericht (https://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/innovative_analysen/dna_verfahren/naturschutzfachliche_untersuchungen/doc/abschlussbericht_dna_tests.pdf)

Pawlowski J., Apothéloz-Perret-Gentil L., Mächler E., Altermatt F. (2020). Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen. Richtlinien. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Wissen Nr. 2010

Pentinsaari, M., Ratnasingham, S., Miller, S.E., Hebert, P.D.N. (2020). BOLD and GenBank revisited – Do identification errors arise in the lab or in the sequence libraries? *PLoS ONE* 15(4) : e0231814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231814>

Russell, P.J. (2005). *iGenetics. A molecular approach.* Pearson 2nd edition.

Schmid-Egger, C., Schmidt, S. (2012): DNA-Barcoding – Revolution in der Taxonomie? *Ampulex* 5, 19-35.

Vamos, E.E., Elbrecht, V., Leese, F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics* 1, e14625

Weigand, H., Beermann, A.J., Čiampor, F., Costa, F. O., Csabai, Z., Duarte, S., Geiger, M.F., Grabowski, M., Rimet, F., Rulik, B., Strand, M., Szucsich, N., Weigand, A. M., Willassen, E., Wyler, S.A., Bouchez, A., Borja, A., Čiamporová-Zatovičová, Z., Ferreira, S., Dijkstra, K.-D.B., Eisendle, U., Freyhof, J., Gadawski, P., Graf, W., Haegerbaeumer, A., van der Hoorn, B.B., Japoshvili, B., Keresztes, L., Keskin, E., Leese, F., Macher, J.N., Mamos, T., Paz, G., Pešić, V., Pfannkuchen, D.M., Pfannkuchen, M.A., Price, B.W., Rinkevich, B., Teixeira, M.A.L., Várbíró, G., Ekrem, T. (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Sci. Total Environ.* 678, 499 – 524

6 Anhang

Ergebnisse der morphologischen und genetischen Bestimmung der Makrozoobenthos-Proben:

Proben 2021

Proben-Nr LFU	Proben-ID Sammler	Morphologische Bestimmung	Gruppe	Genetische Bestimmung (BOLD)	
				Organismus	Similarity [%]
G21-002	ROB256	<i>Protonemura spec.</i>	Plecoptera	<i>Protonemura intricata</i>	100
G21-003	ROB257	<i>Nemoura spec.</i>	Plecoptera	<i>Nemoura rivorum</i> <i>Nemoura flexuosa</i>	100 100
G21-004	ROB258	Ecdyonurus venosus-Gruppe	Ephemeroptera	<i>Ecdyonurus torrentis</i>	99.84
G21-005	ROB259	Rhithrogena semicolorata-Gruppe	Ephemeroptera	<i>Rhithrogena semicolorata</i> <i>Rhithrogena carpatoalpina</i> <i>Rhithrogena picteti</i>	99.51 98.52 98.36
G21-006	ROB260	Rhithrogena semicolorata-Gruppe	Ephemeroptera	<i>Rhithrogena semicolorata</i> <i>Rhithrogena picteti</i>	99.33 98.5
G21-007	ROB261	Rhithrogena semicolorata-Gruppe	Ephemeroptera	<i>Rhithrogena semicolorata</i> <i>Rhithrogena picteti</i> <i>Rhithrogena carpatoalpina</i>	100 100 98.52
G21-008	ROB262	Baetis muticus	Ephemeroptera	<i>Baetis muticus</i> <i>Baetis muticus SK2</i> <i>Baetis sp.</i> <i>Alainites muticus</i>	99.82 99.8 99.45 98.58
G21-009	ROB263	Insecta	Insecta	<i>Tachyporus nitidulus</i>	100
G21-010	ROB264	Plectrocnemia geniculata	Trichoptera	<i>Plectrocnemia conspersa</i> <i>Plectrocnemia conjuncta</i> <i>Plectrocnemia geniculata</i>	100 100 100
G21-011	ROB265	Agapetus ochripes	Trichoptera	<i>Agapetus ochripes</i>	100
G21-012	ROB266	Agapetus ochripes	Trichoptera	<i>Agapetus ochripes</i>	99.55
G21-013	ROB267	Silo nigricornis	Trichoptera	<i>Silo nigricornis</i>	99.41
G21-014	ROB268	Silo nigricornis	Trichoptera	<i>Silo nigricornis</i>	99.78
G21-015	ROB269	Potamophylax cingulatus	Trichoptera	<i>Potamophylax cingulatus</i>	99.82
G21-016	ROB270	Sericostoma personatum	Trichoptera	<i>Sericostoma baeticum</i> <i>Sericostoma pyrenaicum</i> <i>Sericostoma flavicorne</i> <i>Sericostoma personatum</i>	99.84 99.84 99.84 99.84
G21-017	ROB271	Hydropsyche pellucidula-Gruppe	Trichoptera	<i>Hydropsyche instabilis</i>	98.1
G21-018	ROB272	Gammarus fossarum	Crustacea	<i>Gammarus fossarum</i>	97.22
G21-019	ROB273	Dugesia gonocephala	Platyhelminthes	<i>Allogamus auricollis</i>	99.61
G21-020	ROB274	Hydrachnida	Arachnida	<i>Hygrobates sp. AMUHyd037</i> <i>Hygrobates nigromaculatus</i> <i>Hygrobates setosus</i>	100 100 100
G21-021	ROB275	Lumbriculidae	Oligochaeta	<i>Stylodrilus heringianus</i>	99.34
G21-022	ROB276	Tipula s.l.	Diptera	<i>Tipula montium</i>	99.84
G21-023	ROB277	Prodiamesa olivacea	Diptera	<i>Prodiamesa olivacea</i>	100
G21-024	ROB278	Chironomidae Gen. Sp.	Diptera	<i>Potthastia longimanus</i>	99.3
G21-025	ROB279	Chironomidae Gen. Sp.	Diptera	<i>no match</i> <i>Chironomidae</i>	96.55
G21-026	ROB280	Lumbriculidae	Oligochaeta	<i>Stylodrilus heringianus</i>	99.43
G21-027	ROB281	Potamophylax cin/lat/lu	Trichoptera	<i>Potamophylax latipennis</i>	99.39
G21-028	ROB282	Leuctra spec.	Plecoptera	<i>Leuctra fusca</i> <i>Leuctra inermis</i>	100 100
G21-029	ROB283	Leuctra spec.	Plecoptera	<i>Leuctra fusca</i> <i>Leuctra inermis</i>	100 100
G21-030	ROB284	Amphinemura spec.	Plecoptera	<i>Amphinemura triangularis</i>	100

Proben-Nr LfU	Proben-ID Sammler	Morphologische Bestimmung	Gruppe	Genetische Bestimmung (BOLD)	
				Organismus	Similarity [%]
G21-031	ROB285	Isoperla spec.	Plecoptera	Isoperla obscura	100
G21-032	ROB286	Isoperla spec.	Plecoptera	Isoperla obscura	100
G21-033	ROB287	Brachyptera trifasciata	Plecoptera	Brachyptera trifasciata	99.83
G21-034	ROB288	Amphinemura spec.	Plecoptera	Amphinemura sulcicollis	100
G21-035	ROB289	Leuctra spec.	Plecoptera	Leuctra hippopus	99.74
G21-036	ROB290	Rhabdiopteryx neglecta	Plecoptera	Rhabdiopteryx neglecta	100
G21-037	ROB291	Capnia spec.	Plecoptera	Capnia nigra	100
G21-038	ROB292	Isoperla spec.	Plecoptera	Isoperla obscura	100
G21-039	ROB293	Ecdyonurus venosus-Gruppe	Ephemeroptera	Ecdyonurus venosus	98.63
G21-040	ROB294	Ecdyonurus venosus-Gruppe	Ephemeroptera	Ecdyonurus venosus	98.47
G21-041	ROB295	Baetis alpinus	Ephemeroptera	Baetis alpinus	100
G21-042	ROB296	Elmis rioloides	Coleoptera	Elmis rioloides	100
G21-043	ROB297	Radix balthica/labiata	Gastropoda	Radix balthica Radix ovata Radix 136m4	99.57 99.36 99.36
G21-044	ROB298	Ancylus fluviatilis	Gastropoda	Ancylus fluviatilis	99.44
G21-045	ROB299	Hydrachnidia	Arachnida	Lebertia porosa	100
G21-046	ROB300	Clinocerinae	Diptera	<i>Sequenz nicht in Datenbank</i>	
G21-047	ROB301	Tanytarsini	Diptera	Micropsectra sp.	99.69
G21-048	ROB302	Tipula spec.	Diptera	Tipula montium	100
G21-049	ROB303	Eloeophila spec.	Diptera	<i>Sequenz nicht in Datenbank</i>	
G21-050	ROB304	Dicranota spec.	Diptera	Dicranota sp.	99.84
G21-051	ROB305	Isoperla spec.	Plecoptera	Isoperla obscura	100
G21-052	ROB306	Leuctra spec.	Plecoptera	Leuctra inermis Leuctra fusca	99.84 99.83
G21-053	ROB307	Isoperla spec.	Plecoptera	Isoperla obscura	100
G21-054	ROB308	Isoperla spec.	Plecoptera	Isoperla grammatica	100
G21-055	ROB309	Capnia spec.	Plecoptera	Capnia nigra	98.98
G21-056	ROB310	Ecdyonurus venosus-Gruppe	Ephemeroptera	Ecdyonurus venosus	98.64
G21-057	ROB311	Ecdyonurus spec.	Ephemeroptera	Ecdyonurus venosus	98.66
G21-058	ROB312	Siphonurus spec.	Ephemeroptera	Siphonurus croaticus	99.48
G21-059	ROB313	Caenis spec.	Ephemeroptera	Caenis macrura	96.99
G21-060	ROB314	Rhyacophila spec.	Trichoptera	Rhyacophila dorsalis Rhyacophila meridionalis Rhyacophila dorsalis persimilis Rhyacophila nubila	100 100 100 98.82
G21-061	ROB315	Rhyacophila spec.	Trichoptera	<i>Sequenz nicht in Datenbank</i>	
G21-062	ROB316	Psychomyia pusilla	Trichoptera	Psychomyia pusilla	96.97
G21-063	ROB317	Hydropsyche guttata	Trichoptera	Hydropsyche guttata	100
G21-064	ROB318	Dicranota spec.	Diptera	Dicranota subflammatra Dicranota schistacea Dicranota auripontium	96.07 96.07 95.87
G21-065	ROB319	Dicranota spec.	Diptera	Dicranota gracilipes Dicranota cf. subtilis Dicranota cf. pavidata Dicranota pavidata	100 100 100 99.83
G21-066	ROB320	Clinocerinae	Diptera	<i>Sequenz nicht in Datenbank</i>	
G21-067	ROB321	Hexatoma spec.	Diptera	Eloeophila sp.	98.53
G21-068	ROB322	Hexatoma spec.	Diptera	Eloeophila sp.	97.61
G21-069	ROB323	Ibisia marginata	Diptera	Atherix marginata	99.83
G21-070	ROB324	Liponeura cordata	Diptera	Liponeura cordata	99.67
G21-071	ROB325	Liponeura spec.	Diptera	Liponeura decipiens	97.52
G21-072	ROB326	Prosimulium spec.	Diptera	Prosimulium hirtipes	98.25
G21-073	ROB327	Prosimulium spec.	Diptera	Prosimulium hirtipes	99.74
G21-074	ROB328	Leuctra spec.	Plecoptera	Leuctra aurita	100
G21-075	ROB329	Chloroperla spec.	Plecoptera	Chloroperla tripunctata Chloroperla susemicheli	99.34 98.84

Proben-Nr LfU	Proben-ID Sammler	Morphologische Bestimmung	Gruppe	Genetische Bestimmung (BOLD)	
				Organismus	Similarity [%]
G21-076	ROB330	Chloroperla spec.	Plecoptera	Chloroperla tripunctata Chloroperla susemicheli	100 99
G21-077	ROB331	Leuctra spec.	Plecoptera	Leuctra albida Leuctra major	99.83 99.83
G21-078	ROB332	Protonemura spec.	Plecoptera	Protonemura intricata	100
G21-079	ROB333	Amphinemura spec.	Plecoptera	Amphinemura sulcicollis	99.83
G21-080	ROB334	Nemoura spec.	Plecoptera	Nemoura cinerea	99.68
G21-081	ROB335	Capnia spec.	Plecoptera	Capnioneura nemuroides	100
G21-082	ROB336	Leuctra spec.	Plecoptera	Leuctra braueri	99.68
G21-083	ROB337	Habroleptoides auberti	Ephemeroptera	Habroleptoides auberti Habroleptoides confusa	99.68 99.68
G21-084	ROB338	Habroleptoides confusa	Ephemeroptera	Habroleptoides confusa	98.88
G21-085	ROB339	Rhithrogena hybrida-Gr.	Ephemeroptera	Rhithrogena hybrida	100
G21-086	ROB340	Rhithrogena hybrida-Gr.	Ephemeroptera	Rhithrogena puthzi Rhithrogena hybrida	99.36 99.84
G21-087	ROB341	Rhithrogena alpestris-Gr	Ephemeroptera	Rhithrogena puthzi Rhithrogena landai	99.2 100
G21-088	ROB342	Ecdyonurus venosus	Ephemeroptera	Ecdyonurus venosus	99.84
G21-089	ROB343	Rhithrogena alpestris-Gr	Ephemeroptera	Rhithrogena landai	100
G21-090	ROB344	Rhithrogena semicolorata-Gruppe	Ephemeroptera	Rhithrogena semicolorata	100
G21-091	ROB345	Limnius perrisi	Coleoptera	Limnius perrisi	100
G21-092	ROB346	Riolus subviolaceus	Coleoptera	Riolus subviolaceus	100
G21-093	ROB347	Oreodytes sanmarkii	Coleoptera	Nectoporus sanmarkii	99.84
G21-094	ROB348	Hydraena truncata	Coleoptera	Hydraena truncata	100
G21-095	ROB349	Stylodrilus heringianus	Oligochaeta	Stylodrilus heringianus	99.52
G21-096	ROB350	Haplotaxis gordioides	Oligochaeta	Haplotaxis gordioides	84.7
G21-097	ROB351	Crenobia alpina	Platyhelminthes	Prosimulium hirtipes	99.36
G21-098	ROB352	Glossosoma conformis	Trichoptera	Glossosoma conformis	100
G21-099	ROB353	Tinodes spec.	Trichoptera	Tinodes dives	100
G21-100	ROB354	Plectrocnemia spec.	Trichoptera	Polycentropus excisus	100
G21-101	ROB355	Micrasema minimum	Trichoptera	Micrasema minimum	100
G21-102	ROB356	Simulium spec.	Diptera	Simulium argyreatum Simulium variegatum Simulium monticola	99.68 99.67 99.67
G21-103	ROB357	Simulium (Nevermannia) lundstromi	Diptera	Simulium lundstromi Simulium angustitarse	100 100
G21-104	ROB358	Anodonta spec.	Bivalvia	Mischsequenz	
G21-105	ROB359	Notidobia ciliaris	Trichoptera	Notidobia ciliaris	100
G21-106	ROB360	Potamophylax rotundipennis	Trichoptera	Potamophylax rotundipennis	99.19
G21-107	ROB361	Glyptotaelius pellucidus	Trichoptera	Glyptotaelius pellucidus	100
G21-108	ROB362	Anabolia nervosa	Trichoptera	Anabolia nervosa	100
G21-109	ROB363	Platambus maculatus	Coleoptera	Platambus maculatus	100
G21-110	ROB364	Potamophylax rotundipennis	Trichoptera	Potamophylax rotundipennis	99.36
G21-111	ROB365	Tipula s.l	Diptera	Tipula montium	99.37
G21-112	ROB366	Ceratopogonidae	Diptera	Palpomyia flavipes	99.11
G21-113	ROB367	Acari/Anactinotrichida	Arachnida	Lebertia fimbriata	98.28
G21-114	ROB368	Antocha spec.	Diptera	Antocha vitripennis	100
G21-115	ROB369	Nematomorpha (Stamm)	Nematomorpha	Mischsequenz	
G21-116	ROB370	Eloeophila spec.	Diptera	Eloeophila maculata	100
G21-117	ROB371	Chironomini	Diptera	Chironomus riparius	100
G21-118	ROB372	Tanypodinae	Diptera	Macropelopia nebulosa	100
G21-119	ROB373	Chironomini	Diptera	Chironomus riparius	100
G21-120	ROB374	Piscicola spec.	Hirudinea	Cystobranchus	99.68
G21-121	ROB375	Goera pilosa	Trichoptera	Goera pilosa	99.78
G21-122	ROB376	Hydropsyche bulbifera	Trichoptera	Hydropsyche bulbifera	100

Proben-Nr LFU	Proben-ID Sammler	Morphologische Bestimmung	Gruppe	Genetische Bestimmung (BOLD)	
				Organismus	Similarity [%]
G21-123	ROB377	Hydropsyche siltalai	Trichoptera	Hydropsyche siltalai	99.75
				Hydropsyche exocellata	99.75
				Hydropsyche infernalis	99.49
				Hydropsyche pictetorum	99.24
G21-124	ROB378	Anopheles spec.	Diptera	Anopheles daviger	99.84
G21-125	ROB379	Anopheles spec.	Diptera	Anopheles daviger	99.84
G21-126	ROB380	Tabanidae	Diptera	Tabanus cordiger	100
				Tabanus unifasciatus	99.84
G21-127	ROB381	Tabanidae	Diptera	Tabanus cordiger	100
				Tabanus unifasciatus	99.84
G21-128	ROB382	Ptychoptera spec.	Diptera	Ptychoptera paludosa	100
G21-129	ROB383	Gammarus roeselii	Crustacea	Gammarus roeselii	100
G21-130	ROB384	Psychodidae	Diptera	Pneumia trivialis	99.52
				Pneumia nubila	99.52
				Satchellia nubila	99.52
				Parajungia longicornis	99.19
				Psychoda satchellii	99.19
G21-131	ROB385	Simulium (Nevermannia) lundstromi	Diptera	Simulium lundstromi	99.68
				Simulium angustitarse	99.68
G21-132	ROB386	Simulium ornatum	Diptera	Simulium trifasciatum	100
				Simulium ornatum	100
				Simulium kirishenkoi	99.18
				Simulium aureum	98.79
				Simulium ornatum	98.79
G21-133	ROB387	Pilaria spec.	Diptera	Pilaria discollis	99.73
G21-134	ROB388	Oxycera spec.	Diptera	Oxycera morrisii	100
G21-135	ROB389	Elodes spec.	Coleoptera	Elodes minuta	100
				Elodes pseudominuta	99.68
				Elodes marginata	99.08
G21-136	ROB390	Hydrometra stagnorum	Hemiptera	Hydrometra stagnorum	100
G21-137	ROB391	Helophorus avernicus	Coleoptera	Helophorus avernicus	99.82
G21-138	ROB392	Laccobius spec.	Coleoptera	Laccobius bipunctatus	99.63
G21-139	ROB393	Nemoura spec.	Plecoptera	Nemoura cinerea	100
G21-140	ROB394	Stenophylax permistus	Trichoptera	Stenophylax permistus	100
				Stenophylax vibex	100
				Stenophylax meridionalis	99.48
G21-141	ROB395	Limnephilus extricatus	Trichoptera	Limnephilus extricatus	100
G21-142	ROB396	Silo nigricornis	Trichoptera	Silo nigricornis	100
G21-143	ROB397	Lithax niger	Trichoptera	Silo nigricornis	99.73
G21-144	ROB398	Lithax niger	Trichoptera	Silo nigricornis	97.75

Proben 2022

Proben-Nr LfU	Proben-ID Sammler	Morphologische Bestimmung	Gruppe	Genetische Bestimmung (BOLD)	
				Organismus	Similarity [%]
G22-001	ROB399	<i>Gammarus fossarum</i>	Crustacea	<i>Gammarus pulex</i>	99.84
G22-002	ROB400	<i>Gammarus pulex</i>	Crustacea	<i>Gammarus pulex</i>	100
G22-003	ROB401	<i>Velia spec.</i>	Hemiptera	<i>Velia caprai</i>	99.84
G22-004	ROB402	Acari	Arachnida	<i>Sperchon setiger</i>	100
				<i>Sperchon insignis</i>	99.74
G22-005	ROB403	Acari	Arachnida	<i>Lebertia rivulorum</i>	100
G22-006	ROB404	<i>Collembola (Springschwanz)</i>	Collembola	<i>Isotomaviridis</i>	98.17
G22-007	ROB405	<i>Chrysopilus spec.</i>	Diptera	<i>Chrysopilus cristatus</i>	99.66
				<i>Chrysopilus auratus</i>	99.49
G22-008	ROB406	<i>Tinodes spec.</i>	Trichoptera	<i>Tinodes pallidulus</i>	97.77
G22-009	ROB407	<i>Limnephilus extricatus</i>	Trichoptera	<i>Limnephilus extricatus</i>	99.83
G22-010	ROB408	<i>Micropterna nycterobia</i>	Trichoptera	<i>Stenophylax vibex</i>	99.52
				<i>Micropterna nycterobia</i>	99.52
				<i>Stenophylax nycterobius</i>	99.52
G22-011	ROB409	<i>Helophorus grandis</i>	Coleoptera	<i>Helophorus aquaticus</i>	100
G22-012	ROB410	<i>Baetis vernus</i>	Ephemeroptera	<i>Baetis nexus</i>	100
G22-013	ROB411	<i>Baetis nexus</i>	Ephemeroptera	<i>Baetis nexus</i>	100
G22-014	ROB412	<i>Baetis vernus</i>	Ephemeroptera	<i>Baetis nexus</i>	100
G22-015	ROB413	Ceratopogonidae	Diptera	<i>Culicoides sp.</i>	97.26
G22-016	ROB414	Ceratopogonidae	Diptera	<i>Culicoides sp.</i>	97.64
G22-017	ROB415	<i>Hydrometra stagnorum</i>	Hemiptera	<i>Hydrometra stagnorum</i>	100
G22-018	ROB416	<i>Radix balthica/labiata</i>	Gastropoda	<i>Radix balthica</i>	99.68
G22-019	ROB417	<i>Simulium erythrocephalum</i>	Diptera	<i>Simulium erythrocephalum</i>	100
G22-020	ROB418	<i>Simulium (Nevermannia) costatum</i>	Diptera	<i>Simulium angustipes</i>	99.52
G22-021	ROB419	<i>Chaoborus spec.</i>	Diptera	<i>Chaoborus flavicans</i>	100
G22-022	ROB420	<i>Ilybius spec.</i>	Coleoptera	<i>Agabus sturmii</i>	100
G22-023	ROB421	Coleoptera (terrestrisch?)	Coleoptera	<i>Brassicogethes aeneus</i>	100
G22-024	ROB422	<i>Hydropsyche angustipennis</i>	Trichoptera	<i>Hydropsyche angustipennis</i>	100
G22-025	ROB423	<i>Potamophilus acuminatus</i>	Coleoptera	<i>Potamophilus acuminatus</i>	99.84
G22-026	ROB424	<i>Helobdella stagnalis</i>	Hirudinea	<i>Helobdella stagnalis</i>	99.84
G22-027	ROB425	<i>Velia caprai</i>	Hemiptera	<i>Velia caprai</i>	99.84
G22-028	ROB426	Acari	Arachnida	<i>Lebertia rivulorum</i>	99.84
G22-029	ROB427	<i>Limnophila spec.</i>	Diptera	<i>Limnophila pictipennis</i>	100
G22-030	ROB428	<i>Gammarus fossarum</i>	Crustacea	<i>Gammarus pulex</i>	98.88
G22-031	ROB429	<i>Pilaria spec.</i>	Diptera	<i>Pilaria discollis</i>	99.68
G22-032	ROB430	<i>Haliphus lineatocollis</i>	Coleoptera	<i>Haliphus lineatocollis</i>	100
G22-033	ROB431	<i>Anacaena limbata</i>	Coleoptera	<i>Anacaena limbata</i>	100
G22-034	ROB432	<i>Helophorus arvernicus</i>	Coleoptera	<i>Helophorus arvernicus</i>	100
G22-035	ROB433	<i>Glossiphonia complanata</i>	Hirudinea	<i>Glossiphonia complanata</i>	99.68
G22-036	ROB434	<i>Eiseniella tetraedra</i>	Oligochaeta	<i>Lumbricus terrestris</i>	100
G22-037	ROB435	Acari	Arachnida	<i>Hygrobates prosiliens</i>	100
				<i>Hygrobates longipalpis</i>	99.02
G22-038	ROB436	Acari	Arachnida	<i>Lebertia gibbosa</i>	99.84
				<i>Lebertia longiseta</i>	99.84
				<i>Lebertia porosa</i>	99.84
				<i>Lebertia inaequalis</i>	99.52
G22-039	ROB437	<i>Antocha spec.</i>	Diptera	<i>Antocha vitripennis</i>	99.84
G22-040	ROB438	<i>Planorbis planorbis</i>	Gastropoda	<i>Planorbis carinatus</i>	99.48
G22-041	ROB439	<i>Anisus vortex</i>	Gastropoda	<i>Anisus vortex</i>	99.67
G22-042	ROB440	<i>Sialis lutaria</i>	Megaloptera	<i>Sialis lutaria</i>	100
G22-043	ROB441	<i>Atrichops crassipes</i>	Diptera	<i>Atrichops crassipes</i>	99.67
G22-044	ROB442	Coenagrionidae	Odonata	<i>Ischnura saharensis</i>	100
				<i>Ischnura graellsii</i>	100
				<i>Ischnura elegans</i>	100

Proben-Nr LfU	Proben-ID Sammler	Morphologische Bestimmung	Gruppe	Genetische Bestimmung (BOLD)	
				Organismus	Similarity [%]
G22-045	SQ_2022_040_001	Halesus digitatus	Trichoptera	Halesus tessellatus Halesus radiatus Halesus digitatus	94.02 93.15 92.88
G22-046	SQ_2022_040_002	Halesus digitatus	Trichoptera	Mischsequenz	
G22-047	SQ_2022_040_003	Halesus digitatus	Trichoptera	Halesus digitatus	100
G22-048	SQ_2022_040_004	Halesus digitatus	Trichoptera	Halesus radiatus	100
G22-049	SQ_2022_040_005	Halesus radiatus	Trichoptera	Mischsequenz	
G22-050	SQ_2022_040_006	Halesus radiatus	Trichoptera	Mischsequenz	
G22-051	SQ_2022_040_007	Halesus radiatus	Trichoptera	Mischsequenz	
G22-052	SQ_2022_040_008	Halesus tessellatus	Trichoptera	Mischsequenz	
G22-053	SQ_2022_040_009	Agapetus nimbulus	Trichoptera	Mischsequenz	
G22-054	SQ_2022_040_010	Glossosoma cf. boltoni	Trichoptera	Mischsequenz	
G22-055	SQ_2022_040_011	Anabolia cf. brevipennis	Trichoptera	Anabolia nervosa	100
G22-056	SQ_2022_040_012	Glyphotaelius pellucidus	Trichoptera	Glyphotaelius pellucidus	100
G22-057	SQ_2022_040_013	Limnephelidae	Trichoptera	Potamophylax cingulatus	99.73
G22-058	SQ_2022_040_014	Limnephelidae	Trichoptera	Potamophylax rotundipennis	99.48
G22-059	SQ_2022_040_015	Halesus tessellatus	Trichoptera	Halesus digitatus	98.06
G22-060	SQ_2022_040_041	Pneumia spp.	Diptera	Pericoma nielseni Pericoma fallax	100 99.22
G22-061	SQ_2022_040_042	Sericostoma spp.	Trichoptera	Sericostoma flavicome Sericostoma personatum Sericostoma baeticum Sericostoma vittatum Sericostoma pyrenaicum	99.79 99.79 99.79 99.79 99.79
G22-062	SQ_2022_040_043	Elmis maugetii	Coleoptera	Elmis maugetii	100
G22-063	SQ_2022_040_044	Elmis rioloides	Coleoptera	Elmis rioloides	99.39
G22-064	SQ_2022_040_045	Limnephilus spp.	Trichoptera	Limnephilus lunatus	95.91
G22-065	ROB443	Hydroptila spec.	Trichoptera	Hydroptila sparsa	98.01
G22-066	ROB444	Lype phaeopa	Trichoptera	Lype phaeopa	100
G22-067	ROB445	Hydroptila spec.	Trichoptera	Hydroptila sparsa	93.24
G22-068	ROB446	Polycntropus irroratus	Trichoptera	kein PCR-Produkt	
G22-069	ROB447	Athripsodes spec.	Trichoptera	Athripsodes cinereus	100
G22-070	ROB448	Oecetis testacea	Trichoptera	Oecetis tsudai Oecetis testacea Oecetis testacea kumanski	100 100 100
G22-071	ROB449	Mystacides azureus	Trichoptera	kein PCR-Produkt	
G22-072	ROB450	Caenis horaria	Ephemeroptera	Caenis horaria	100
G22-073	ROB451	Heptagenia flava	Ephemeroptera	kein PCR-Produkt	
G22-074	ROB452	Athripsodes albifrons	Trichoptera	Athripsodes albifrons	99.3
G22-075	ROB453	Sialis fuliginosa	Megaloptera	Sialis fuliginosa	99.68
G22-076	ROB454	Catadysta lemnata	Lepidoptera	Epinotia tenerana	100
G22-077	ROB455	Lipsothrix spec.	Diptera	Lipsothrix nobilis	92
G22-078	ROB456	Hemerodromia spec.	Diptera	Hemerodromia adulatoria	96.47
G22-079	ROB457	Chrysops spec.	Diptera	Chrysops caecutiens	100
G22-080	ROB458	Chrysops spec.	Diptera	Chrysops caecutiens	100
G22-081	ROB459	Peripsychoda spec.	Diptera	Peripsychoda auriculata	99.42
G22-082	ROB460	Neolimnomyia spec.	Diptera	Neolimnomyia batava	97.44
G22-083	ROB461	Platambus maculatus	Coleoptera	Platambus maculatus	99.58
G22-084	ROB462	Szaboiella spec.	Diptera	kein PCR-Produkt	
G22-085	ROB463	Nemurella pictetii	Plecoptera	Nemurella pictetii	100
G22-086	ROB464	Hydropsyche instabilis	Trichoptera	Hydropsyche instabilis	100
G22-087	ROB465	Plectrocnemia spec.	Trichoptera	kein PCR-Produkt	
G22-088	ROB466	Plectrocnemia spec.	Trichoptera	Plectrocnemia conspersa Plectrocnemia geniculata	98.89 98.6
G22-089	ROB467	Agapetus fuscipes	Trichoptera	kein PCR-Produkt	
G22-090	ROB468	Tinodes spec.	Trichoptera	kein PCR-Produkt	
G22-091	ROB469	Melampophylax mucosus	Trichoptera	kein PCR-Produkt	

Proben-Nr LFU	Proben-ID Sammler	Morphologische Bestimmung	Gruppe	Genetische Bestimmung (BOLD)	
				Organismus	Similarity [%]
G22-092	ROB470	Chaetopteryx spec.	Trichoptera	Chaetopteryx villosa x fusca	100
G22-093	ROB471	Chelicorophium robustum	Crustacea	Chelicorophium robustum	100
G22-094	ROB472	Dikerogammarus villosus	Crustacea	Dikerogammarus villosus	100
G22-095	ROB473	Dikerogammarus haemobaphes	Crustacea	Dikerogammarus haemobaphes	99.84
G22-096	ROB474	Dikerogammarus haemobaphes	Crustacea	Dikerogammarus haemobaphes	100
G22-097	ROB475	Chelicorophium curvispinum	Crustacea	Chelicorophium curvispinum	100
G22-098	ROB476	Hypania invalida	Polychaeta	Hypania invalida	100
G22-099	ROB477	Rhyacophila spec.	Trichoptera	Rhyacophila dorsalis	99.59
G22-100	ROB478	Psychomyia pusilla	Trichoptera	Psychomyia pusilla	100
G22-101	ROB479	Psychomyia pusilla	Trichoptera	Psychomyia pusilla	99.16
G22-102	ROB480	Hydropsyche contubernalis	Trichoptera	Hydropsyche contubernalis	100
G22-103	ROB481	Hydropsyche incognita	Trichoptera	Hydropsyche incognita	99.43
G22-104	ROB482	Corbicula fluminea	Bivalvia	Corbicula fluminea	100
G22-105	ROB483	Sphaerium spec.	Bivalvia	Corbicula fluminea Corbicula leana	99.73 99.73
G22-106	ROB484	Jaera sarsi	Crustacea	kein PCR-Produkt	
G22-107	ROB485	Antocha spec.	Diptera	Antocha vitripennis	100
G22-108	ROB486	Antocha spec.	Diptera	Antocha vitripennis	99.84
G22-109	ROB487	Potamopyrgus antipodarum	Gastropoda	Potamopyrgus antipodarum	100
G22-110	RvM_001	Sinanodonta woodiana	Bivalvia	Sinanodonta woodiana	100
G22-111	RvM_002	Dreissena polymorpha	Bivalvia	Dreissena polymorpha	100
G22-112	RvM_003	Dreissena bugensis/rostriformis	Bivalvia	Dreissena bugensis Dreissena polymorpha Dreissena rostriformis bugensis Dreissena rostriformis	100 100 100 100
G22-113#1	RvM_004	Dreissena polymorpha	Bivalvia	Dreissena polymorpha	100
G22-114	RvM_005	Onychogomphus fordipatus	Odonata	Onychogomphus forcipatus	99.7
G22-115	RvM_006	Onychogomphus fordipatus	Odonata	kein PCR-Produkt	
G22-116	RvM_007	Hydropsyche instabilis	Trichoptera	Hydropsyche instabilis Hydropsyche incognita Hydropsyche pellucidula	100 99.74 99.45
G22-117	RvM_008	Hydropsyche saxonica	Trichoptera	Hydropsyche saxonica	100
G22-118	RvM_009	Ecdyonurus torrentis	Ephemeroptera	Ecdyonurus torrentis	99.84
G22-119	RvM_010	Rhithrogena semicolorata	Ephemeroptera	Rhithrogena semicolorata Rhithrogena sp.	100 100
G22-120	RvM_011	Ephemerella notata	Ephemeroptera	Ephemerella notata	99.84