

Umwelt-DNA als neue Methode zum Artnachweis in Gewässern

Benedikt R. Schmidt^{1, 2} & Sylvain Ursenbacher^{1, 3}

¹KARCH, Passage Maximilien-de-Meuron 6, CH-2000 Neuchâtel, Schweiz;

²Institut für Evolutionsbiologie und Umweltwissenschaften, Universität Zürich, Winterthurerstr. 190, CH-8057 Zürich, Schweiz, benedikt.schmidt@unine.ch; ³Department of Environmental Sciences, Section of Conservation Biology, University of Basel, St. Johannis-Vorstadt 10, CH-4056 Basel, Schweiz

Environmental DNA is a new method to detect species in aquatic environments

Environmental DNA (or eDNA) is a novel method to detect the presence of species in lentic and lotic aquatic environments. Small volumes of water (15 ml) can be sufficient to detect a species in a pond. In the laboratory, PCR is used to detect the DNA of the study species. Several studies compare detection probabilities of eDNA and methods commonly used by field herpetologists. Using the Crested newt (*Triturus cristatus*) as a model species, these studies showed that eDNA has higher detection probabilities than other methods. Environmental DNA is often cheaper than other methods when all costs of a survey are considered. Because there is a relationship between the concentration of eDNA and abundance, eDNA may in the future be used to estimate abundance.

Key words: Environmental DNA, eDNA, detection probability, survey, monitoring, amphibian, pond, stream, *Triturus cristatus*.

Zusammenfassung

Umwelt-DNA (oder kurz eDNA) ist eine neue Methode, um die Präsenz von Arten in Fließ- und Stillgewässern nachzuweisen. Kleine Wasserproben mit einem Volumen von nur 15 ml, die im Labor mittels PCR auf die DNA der gesuchten Arten untersucht werden, können ausreichen, um den Nachweis einer Art in einem Gewässer zu erbringen. Vergleichende Studien am Kammmolch (*Triturus cristatus*) zeigen, dass eDNA eine höhere Nachweiswahrscheinlichkeit hat als traditionelle feldherpetologische Methoden. Rechnet man alle Kosten ein, so ist eDNA oft die günstigere Methode. Verschiedene Studien haben einen Zusammenhang zwischen der eDNA-Konzentration und der Abundanz einer Art gezeigt. In Zukunft lässt sich mit eDNA vielleicht auch die Abundanz einer Art abschätzen.

Schlüsselbegriffe: Umwelt-DNA, eDNA, Artnachweis, Kartierung, Monitoring, Nachweiswahrscheinlichkeit, Amphibien, Weiher, Fließgewässer, *Triturus cristatus*.

Einleitung

Das Wissen, welche Arten wo vorkommen und wo nicht, ist die Grundlage der Ökologie und von zentraler Bedeutung für die Forschung, die Faunistik und den Arten- und Naturschutz. Jeder, der selber schon einmal Arten im Feld gesucht hat, weiß, dass

es manchmal nicht einfach ist, Arten zu finden und ihr Vorkommen an einem Ort sicher festzustellen. Um den Artnachweis zu erleichtern, haben Feldbiologen zahlreiche Methoden und technische Hilfsmittel entwickelt, wie Arten festgestellt werden können (Hachtel et al. 2009, Dodd 2010). Trotz kontinuierlicher Verbesserung der Methoden und Hilfsmittel werden manche Populationen oder Arten nicht gefunden (Kéry & Schmidt 2008).

Der rasante Fortschritt in den Methoden der Molekularbiologie hat es erlaubt, eine neue Methode zum Nachweis von Arten zu entwickeln, die für Feldherpetologen, die mit Amphibien arbeiten, sehr interessant ist und zukünftig sicher häufig eingesetzt werden wird. Neuerdings ist es möglich, Arten nachzuweisen, indem man Wasserproben auf die DNA der Arten untersucht (Bohmann et al. 2014, Rees et al. 2014, Kelly et al. 2014). Die Methode wird oft „Umwelt-DNA“ genannt. In der englischsprachigen Literatur ist „environmental DNA“ oder kurz eDNA üblich; wir verwenden hier den Begriff eDNA.

Umwelt-DNA gibt es als Nachweismethode für aquatische Organismen schon einige Jahre. Zuerst haben Mikrobiologen, die Methode angewandt und Wasser auf Pathogene untersucht (Brinkman et al. 2003, Walker et al. 2007). Eine der ersten eDNA-Anwendungen an Amphibien war die Arbeit von Ficetola et al. (2008), die mittels eDNA den Amerikanischen Ochsenfrosch (*Lithobates catesbeianus*) nachweisen konnten. In einer späteren Arbeit konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass der Artnachweis mittels eDNA für den Amerikanischen Ochsenfrosch effizienter ist als der Nachweis mittels traditioneller feldherpetologischer Methoden (Dejean et al. 2012). So richtig das Interesse geweckt an der Methode hat aber die Arbeit von Thomsen et al. (2012a). Diese Autoren konnten zeigen, dass eine sehr kleine Wasserprobe (nur 15 ml) ausreicht, um diverse aquatische Arten (Kammolch, *Triturus cristatus*; Knoblauchkröte, *Pelobates fuscus*; Große Moosjungfer, *Leucorrhinia pectoralis*; Fischotter, *Lutra lutra*; Moorgrundel, *Misgurnus fossilis*; Schuppenschwanz, *Lepidurus apus*) in Stillgewässern nachzuweisen. Untersucht wurden elf Gewässer mit bekannten Vorkommen von Kammolchen und neun solche Gewässer mit Knoblauchkröten. Pro Gewässer wurden drei Wasserproben mit einem Volumen von 15 ml entnommen. Die Knoblauchkröte wurde in 100 % der Gewässer und der Kammolch in 91 % der Gewässer mittels eDNA nachgewiesen.

Das enorme Potenzial der eDNA-Methode lässt sich an einem Beispiel aus den USA gut illustrieren. Jerde et al. (2011) haben invasive Fischarten („bighead carp“ *Hypophthalmichthys nobilis*, „silver carp“ *H. molitrix*) in Gewässern um Chicago untersucht. Grund der Untersuchung war, dass man verhindern möchte, dass diese Fischarten aus dem Einzugsgebiet des Mississippi ins Einzugsgebiet der Großen Seen einwandern. In einem Flussabschnitt konnte der „silver carp“ mit eDNA nachgewiesen werden. Es brauchte anschließend 93 Personen-Tage an Elektrofischerei, um ein einziges Exemplar dieser Art zu fangen.

In diesem Übersichtsartikel möchten wir die eDNA-Methode vorstellen und einige Fallstudien mit Amphibien, vor allem *Triturus cristatus*, diskutieren. Besonderen Wert legen wir dabei weniger auf die molekularen Aspekte als vielmehr auf den Vergleich der neuen eDNA-Methode mit traditionellen feldherpetologischen Methoden des Artnachweises.

Die Methode eDNA

Im Wasser lebende Organismen sondern Kot, Urin und Körperzellen ab, in denen DNA vorhanden ist. Diese DNA gelangt ins Wasser und kann nachgewiesen werden. Die Messungen von Maruyama et al. (2014) zeigen, dass ein Individuum des Sonnenbarsches (*Lepomis macrochirus*) pro Stunde mehr als 10^7 Kopien DNA ins Wasser abgibt.

Mit Hilfe von Experimenten konnten Thomsen et al. (2012a) zeigen, dass die eDNA-Konzentration schnell anstieg und innerhalb weniger Tage im messbaren Bereich war, wenn man Amphibien in Mesokosmen einsetzte. In den Versuchen von Thomsen et al. (2012a) stieg die Konzentration aber während der gesamten Versuchsdauer von 60 Tagen weiter an. Es ist also unwahrscheinlich, dass eDNA eine Art nachweist, wenn diese nur vorübergehend kurz im Gewässer war. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass sich eDNA in Gewässern relativ rasch abbaut. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die eDNA nur 1–2 Wochen lang im Wasser nachweisbar bleibt, nachdem die Art entfernt wurde (Dejean et al. 2011, Thomsen et al. 2012a).

Für den Praktiker bedeutet dies, dass die Art aktuell im Gewässer vorkommt, wenn sie mittels eDNA nachgewiesen wurde; allenfalls ist sie vor wenigen Tagen abgewandert (z. B. Molche am Ende der Fortpflanzungssaison). Interessanterweise bleibt eDNA aber im Sediment viel länger erhalten als im Wasser selbst (Turner et al. 2015).

Das Sammeln von Proben für eDNA ist denkbar einfach. Man entnimmt dem Gewässer ein kleines Wasservolumen mit einem geeigneten Gefäß. Das zu entnehmende Volumen spielt nur eine untergeordnete Rolle, da bereits 15 ml ausreichend sein können, um eine Art nachzuweisen (Thomsen et al. 2012a). Wichtig sind dabei zwei Dinge. Erstens muss eine Kontamination der Wasserprobe vermieden werden. Sauberes Arbeiten ist deshalb essentiell und das Tragen von Laborhandschuhen notwendig. Zweitens darf beim Sammeln der Wasserproben kein Sediment aufgewirbelt und mit der Wasserprobe gesammelt werden. Typischerweise entnimmt man zum selben Zeitpunkt am selben Gewässer mehr als eine Wasserprobe. Ob Wasserproben zu mehreren Zeitpunkten entnommen werden sollen, hängt von der jeweiligen Fragestellung ab. Einheitliche Regeln gibt es (noch) keine, generell gilt, dass die Methoden durch die Fragestellung bestimmt werden und nicht umgekehrt.

Umwelt-DNA kann auch als Methode zum Nachweis von Arten in Fließgewässern verwendet werden. In den USA wurde eDNA benutzt, um Amphibienarten wie *Cryptobranchus alleganiensis* oder *Ascaphus truei* nachzuweisen (Olson et al. 2012, Pilliod et al. 2013). In Fließgewässern werden oft größere Mengen von Wasser filtriert und dann das Filtrat auf DNA der gesuchten Art untersucht. Filtration größerer Wassermengen ist eine gute Methode, Nachweiswahrscheinlichkeiten zu erhöhen. Nach unserer Erfahrung kann Filtration in Weihern mit viel Phytoplankton und Schwebstoffen aber sehr schwierig sein (J. Barandun pers. Mitt.). In Fließgewässern könnte eDNA eine attraktive Methode sein, schwierig nachzuweisende Arten zu finden, wie etwa Bach bewohnende Kaulquappen der Geburtshelferkröte, *Alytes obstetricans* (Barandun 2007). In Fließgewässern ist eDNA allerdings nicht ganz so einfach nachzuweisen wie in stehenden Gewässern. Dies einerseits weil mehr Wasser gesammelt (d. h. filtriert) werden muss und andererseits weil eDNA in Fließgewässern große Distanzen von

mehreren Kilometern zurück legen kann. Der Ort der Probenentnahme ist nicht zwingend identisch mit dem Ort des Vorkommens der Art (Deiner & Altermatt 2014).

Die im Wasser enthaltene DNA ist oft von schlechter Qualität. Daher muss der Konservierung und Aufbewahrung der Wasserproben (oder Filter) große Beachtung geschenkt werden. Ficetola et al. (2008) beispielsweise haben die Wasserproben (15 ml Volumen) konserviert, indem sie 1,5 g 3M Natriumacetat und 33 ml Ethanol hinzugefügt haben. So wird die DNA erhalten und ausgefällt. Anschließend sollten die Wasserproben bei -20 °C gefroren aufbewahrt werden.

Es gibt verschiedene molekulare Methoden, um die DNA im Wasser nachzuweisen. Bisher wurden in allen Studien Fragmente der mitochondrialen DNA (mtDNA) untersucht. Ein Grund dafür ist, dass in einer Zelle nur zwei Kopien der nukleären DNA (nDNA) vorhanden sind, aber dass in jedem Mitochondrium eine Kopie der mtDNA vorhanden ist; jede Zelle enthält 1000–5000 Mitochondrien. Deswegen sind im Wasser viel mehr Kopien der mtDNA als der nDNA zu finden, was die Chancen erhöht, die DNA in den Wasserproben zu entdecken. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Struktur und Sequenz der mtDNA für viele Amphibienarten ganz oder teilweise bekannt ist. Daher ist es möglich, artspezifische molekulare Marker (Primer) zu entwickeln.

Die Konzentration der eDNA im Wasser ist sehr gering. Daher ist die Chance, die DNA zu entdecken und zu analysieren, recht gering. Um die Chancen zu erhöhen, wurden artspezifische Methoden der DNA-Extraktion entwickelt (Ficetola et al. 2008; Deiner & Altermatt 2014), die ein besonders empfindlicher Schritt in der Laboranalyse ist. Die meisten Studien haben bisher das Säulensystem von Qiagen (oder anderer Hersteller) verwendet. Der Grund dürfte sein, dass dieses Produkt besonders reine DNA liefert. Die relativ neu beschriebene alternative Methode mit Chlorophorm-Isoamyl-Alkohol (z. B. Deiner & Altermatt 2014) ist auch sehr vielversprechend, denn durch sie können größere DNA-Mengen extrahiert werden.

Je nach Projekt und Studienzielen können zwei unterschiedliche Methoden der Analyse der DNA zur Anwendung gelangen: Entweder wird nur nach der DNA einer Zielart gesucht oder die gesamte Diversität der im Wasser enthaltenen DNA bestimmt. Der erste Ansatz hat das Ziel, das Vorkommen einer Art zu untersuchen. Dies kann eher qualitativ (Ficetola et al. 2008, Rees et al. 2014) oder quantitativ geschehen (indem die DNA-Konzentration bestimmt wird; Pilliod et al. 2013). Für diesen Ansatz müssen artspezifische genetische Marker entwickelt werden. Diese sollen nur die DNA der Zielart amplifizieren und dürfen nicht von der DNA anderer Arten beeinflusst werden. Es braucht also Pilotstudien, um die Artspezifität zu verifizieren. Ficetola et al. (2010) haben auf Computersimulationen basierte Methoden vorgestellt, die es ermöglichen, neue Marker zu entwickeln und zu testen. Für die DNA-Amplifikation wird die Anzahl Zyklen im PCR erhöht um einzelne Kopien der DNA zu amplifizieren. Für die Amplifizierung genügt die normale PCR. Das PCR-Produkt kann anschließend mit unterschiedlichen Methoden untersucht werden (Agarose-Gel wie bei Ficetola et al. (2008), QIAxcel-System wie bei Ficetola et al. (2010) oder Sequenzierung wie bei Goldberg et al. (2011)). Der quantitativere Ansatz („quantitative PCR“ (qPCR; oft auch „real-time (rt) PCR“ genannt) findet aber mehr und mehr Anwendung. Mit qPCR wird es möglich, nicht nur zu testen, ob in der Wasserprobe die DNA der gesuchten Art vorkommt, sondern man kann die Konzentration der DNA im Wasser bestimmen (Thomsen et al. 2012a).

Der methodische Ansatz, der in eDNA-Studien an Amphibien bisher kaum verwendet wurde, nutzt neu entwickelte Sequenzierungsmethoden (NGS = next generation sequencer) und ist eine Form des „barcoding“. Mit diesem Ansatz ist es möglich, gleichzeitig die DNA verschiedener Arten in der Wasserprobe nachzuweisen. Thomsen et al. (2012b) konnten mit dieser Methode beispielsweise fünfzehn verschiedene marine Fischarten im Hafen von Elsinore (Dänemark) nachweisen. Mit NGS benutzt man unspezifische Marker, um die DNA aller Arten einer Gruppe (beispielsweise alle Amphibien, alle Säugetiere oder alle Wirbeltiere) zu amplifizieren und zu sequenzieren. NGS erlaubt es also prinzipiell, alle in einem Gewässer vorkommenden Arten mit einer einzigen Wasserprobe nachzuweisen. NGS ist gegenwärtig noch sehr teuer, wird in Zukunft aber sicher vermehrt eingesetzt werden.

Umwelt-DNA scheint eine einfache und ideale Methode zu sein. Ein gewisser Vorbehalt ist aber notwendig, denn die Analysen müssen gut geplant und sehr sorgfältig durchgeführt werden. Das größte Risiko ist die Kontamination der Proben. Kontamination ist jederzeit möglich, von der Entnahme der Wasserproben bis zur Amplifikation der DNA. Es sind deshalb negative Kontrollen bei allen Schritten der Analyse notwendig. Idealerweise geschieht die Arbeit in einem Labor, das ausschließlich für diesen Typus Analyse genutzt wird. Ebenso ist es sinnvoll, wenn Extraktion und Amplifikation der DNA in unterschiedlichen Räumen statt finden.

Das Gegenstück zu Kontamination und den falsch positiven Nachweisen sind die falsch negativen Ergebnisse, wenn vorhandene DNA nicht amplifiziert wird. Um dies zu vermeiden, braucht es bei jedem Schritt der Analyse auch positive Kontrollen. Außerdem sind die von Taberlet et al. (1996) beschriebenen mehrfachen Prozeduren für die Amplifikation sehr zu empfehlen.

Die Labormethoden für eDNA-Analysen sind in Entwicklung. Zahlreiche Verbesserungen sind denkbar und in Entwicklung (z. B. Deiner et al. 2015, McKee et al. 2015, Thomsen & Willerslev 2015). Die Arbeiten von Rees et al. (2014) und Herder et al. (2014) erlauben einen Einstieg in die Fachliteratur. Wer immer eDNA anwenden möchte, dem sei geraten, sich mit der neuen Literatur vertraut zu machen.

Typischerweise hat man pro Gewässer mehrere Proben und in den meisten wissenschaftlichen Studien, aber wohl auch in zukünftigen Monitoring-Programmen, werden mehrere Gewässer gleichzeitig untersucht. Die Struktur der Daten eignet sich also für die Analyse mit sogenannten „site occupancy“-Modellen (Schmidt 2008). Der Vorteil dieser Modelle ist es, dass Fehlerraten (d. h. Nachweiswahrscheinlichkeiten) geschätzt werden können. Während die Nachweiswahrscheinlichkeiten bei eDNA sehr hoch sein können, so sind sie doch bei den meisten bisher publizierten Studien kleiner als 100 % (Schmidt et al. 2013).

Schmidt et al. (2013) haben die Fehlerrate der eDNA-Methode statistisch in zwei Fehler (oder Nachweiswahrscheinlichkeiten) aufgetrennt (mit Hilfe weiter entwickelter „site occupancy“-Modelle). Dabei zeigte sich, dass die Nachweiswahrscheinlichkeit bei der Laborarbeit selbst relativ hoch ist. Das PCR liefert hohe Nachweiswahrscheinlichkeiten von ca. 85 %. Bei den Wasserproben war die Nachweiswahrscheinlichkeit nur etwa 45 %. Dies bedeutet, dass es besser ist, mehr Wasserproben zu sammeln als die Anzahl PCR pro Wasserprobe zu erhöhen. Mit Hilfe dieser Modelle kann aber

nicht nur die Nachweiswahrscheinlichkeit geschätzt werden, sondern es ist auch möglich, die Wahrscheinlichkeit falscher positiver Nachweise zu schätzen (Miller et al. 2011, Ficetola et al. 2015).

Vergleichende Studien zur eDNA

Wie jede Methode zum Nachweis einer Art ist auch eDNA nicht perfekt. Ficetola et al. (2008) etwa haben sechs Gewässer untersucht, in denen der Amerikanische Ochsenfrosch (*Lithobates catesbeianus*) vorkommt. Umwelt-DNA konnte in 16 von 18 Wasserproben nachgewiesen werden. Pro Wasserprobe wurden meist drei PCR durchgeführt. Nur gerade 32 der 55 PCR zeigten die eDNA an.

Es stellt sich also die Frage, wie gut die Methode eDNA im Vergleich zu herkömmlichen feldherpetologischen Methoden ist. Wie oben beschrieben, zeigt die Arbeit von Thomsen et al. (2012a), dass Nachweiswahrscheinlichkeiten von Knoblauchkröte und Kammolch sehr hoch sind. Rees et al. (2014) und Biggs et al. (2015) haben solche Methodenvergleiche für den Kammolch angestellt.

Rees et al. (2014) haben neben eDNA (drei Wasserproben mit einem Volumen von 50 ml) versucht, den Kammolch mittels Ei-Suche, Keschern, Wasserfallen und Ableuchten des Gewässers zu finden. Der Einsatz dieser Methoden dauerte drei Stunden pro Weiher und Besuch am Gewässer. Die mit dem Einsatz dieser Methoden geschätzte Nachweiswahrscheinlichkeit war 74 % (95 %-Vertrauensintervall: 58–86 %). Die Vorkommenswahrscheinlichkeit war 50 % (95 %-Vertrauensintervall: 35–66 %). Mit eDNA war die Nachweiswahrscheinlichkeit 80 % (95 %-Vertrauensintervall: 66–89 %) und die Vorkommenswahrscheinlichkeit 45 % (95 %-Vertrauensintervall: 30–61 %). Rees et al. (2014) mussten allerdings die PCR-Methodik verbessern, denn mit dem normalen PCR war die Nachweiswahrscheinlichkeit nur 31 % (95 %-Vertrauensintervall: 15–54 %). In dieser Arbeit lieferten eDNA und traditionelle Methoden also vergleichbare Resultate. Rees et al. (2014) geben aber zu bedenken, dass die Erfassung des Kammolchs pro Fundort nach den in England geltenden Regeln und Preisen 12–18 Stunden dauert und Tausende von Pfund kosten würde. Umwelt-DNA hätte den Vorteil, dass Probensammlung und Laboranalyse nur ein paar Stunden dauern und wenige Hundert Pfund kosten.

Biggs et al. (2015) haben ebenfalls eDNA und traditionelle feldherpetologische Methoden (nächtliches Ableuchten des Gewässers, Wasserfallen, Suche nach Eiern) am Beispiel des Kammolchs untersucht. Für eDNA wurden an zwanzig Stellen im Gewässer je 30 ml Wasser entnommen. Alle Proben wurden gemischt und davon sechs Proben mit je 15 ml Volumen entnommen. Pro Wasserprobe wurden sechs PCR durchgeführt. Der Aufwand für eDNA war in dieser Studie also deutlich größer als bei Thomsen et al. (2012a) oder Rees et al. (2014). Der Aufwand hat sich gelohnt: In Gewässern mit bekannten Kammolch-Vorkommen wurde die Art bei 139 von 140 Besuchen nachgewiesen. Wenn Freiwillige anstatt professionelle Herpetologen eingesetzt wurden, betrug die Nachweiswahrscheinlichkeit nur 91,3 %. Mit Suche nach Eiern, Wasserfallen oder Ableuchten des Gewässers waren die Nachweiswahrscheinlichkeiten (durch professionelle Biologen und pro Besuch am Gewässer) 44 %, 76 %



Abb. 1: Der Kammolch (*Triturus cristatus*) wurde zum Modellorganismus für die Erforschung der Möglichkeiten, Arten mittels eDNA aus Wasserproben nachzuweisen. Foto: A. Meyer.
The crested newt (*Triturus cristatus*) is a model organism in eDNA research.

und 75 %. Durch Kombinationen der Methoden (Ableuchten des Gewässers und Wasserfallen) ließ sich die Nachweiswahrscheinlichkeit auf 95 % steigern. Biggs et al. (2015) berechneten Kosten von 140,- € für den Nachweis des Kammolchs im Gewässer mittels eDNA (20,- € für Feldarbeit und 120,- € für die Laborarbeit) während der Nachweis mittels traditioneller Methoden 1450,- € kostete (dies u. a. deshalb, weil Nachtarbeit nicht alleine durchgeführt werden darf).

Wenn wir selber eDNA-Analysen durchführen, so betragen die Kosten für Material und Laborarbeiten etwa 30,- CHF pro Wasserprobe. Darin nicht eingerechnet ist die Arbeitszeit eines Laboranten.

Umwelt-DNA-Analysen werden auch von Firmen angeboten. Eine der bekanntesten auf diesem Gebiet ist das französische Unternehmen Spygen (<http://www.spygen.fr/en/>). Die eDNA-Analysen in der Arbeit von Biggs et al. (2015) wurden durch Spygen ausgeführt. Wenn man *Triturus cristatus* nachweisen will, empfiehlt Spygen das Protokoll von Biggs et al. (2015) und verlangt 120,- € pro Gewässer (bei einer großen Zahl Gewässer ist ein Rabatt möglich; Stand Januar 2015, T. Dejean pers. Mitt.). Dieser Preis enthält das Material für die Probenentnahme und die Kosten für die Laboranalyse.

Welche Amphibienarten können mittels eDNA bereits nachgewiesen werden? Von den in Deutschland, Österreich und der Schweiz vorkommenden Arten sind dies momentan *Triturus cristatus*, *T. carnifex* und *Pelobates fuscus*. Es ist heute aber möglich, neue artspezifische Marker zu entwickeln. Vor dem Einsatz im Feld sind aber Tests notwendig, um nachzuweisen, dass der Marker ausschließlich die DNA der gewünschten Art amplifiziert.

Diskussion

Umwelt-DNA ist eine neue, effiziente Methode zum Nachweis von Arten in Gewässern. Sie ist oft effizienter als traditionelle Methoden, wenngleich der Unterschied oft nicht groß ist. Der entscheidende Vorteil von eDNA ist, dass der Aufwand und somit die Kosten pro Artnachweis geringer sind. Ebenfalls zu beachten ist, dass die Feldarbeit tagsüber und ggf. auch von Nicht-Fachleuten ausgeführt werden kann. Biggs et al. (2015) kommen deshalb zu dem Schluss, dass ein England-weites Monitoring des Kammolchs mittels eDNA durch Freiwillige möglich ist, während es mit traditionellen Methoden kaum durchführbar wäre. Biggs et al. (2014) weisen aber auch darauf hin, dass die Motivation von Freiwilligen, Wasserproben zu sammeln, wohl geringer ist als die Motivation, die Molche selbst zu suchen. Ob man bei einer Kartierung oder in einem Monitoring-Programm eDNA als Methode einsetzen will, hängt letztlich von der Fragestellung ab (siehe Yoccoz et al. 2001). Davon müssen auch Details der Untersuchung abhängen, z. B. ob man den großen Aufwand von Biggs et al. (2015) oder den kleineren Aufwand von Rees et al. (2014) betreiben will (z. B. ob es für jeden Weiher eine sichere Aussage braucht, ob der Kammolch vorkommt).

Bisher wurde eDNA nur benutzt, um die Präsenz einer Art in einem Gewässer nachzuweisen. Zahlreiche Autoren (z. B. Thomsen et al. 2012a) haben darauf hingewiesen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Menge eDNA im Wasser und der Abundanz der Tiere gibt. Im Moment ist die methodenbedingte Variabilität noch zu hoch, um mittels eDNA zuverlässige Aussagen über die Abundanz zu machen. Es ist aber gut vorstellbar, dass die Methode dahingehend verbessert wird, dass wenigstens eine grobe Abschätzung der Häufigkeit möglich wird.

Als Fazit stellen wir fest, dass sich eDNA bei der Erfassung von Amphibien zu einer wertvollen neuen Methode entwickeln wird, aber dass eDNA traditionelle feldherpetologische Methoden kaum ersetzen kann. Diese Einschätzung könnte sich allerdings ändern, wenn die eDNA-Methodik so weiter entwickelt werden kann, dass verlässliche Schätzungen der Abundanz möglich werden. Bei anderen aquatischen Artengruppen sind wir der Ansicht, dass eDNA in Zukunft die Methode der Wahl sein wird. Dies dürfte beispielsweise für die schwer bestimmbaren, aber in der Gewässerökologie oft verwendeten Steinfliegen (Plecoptera), Eintagsfliegen (Ephemeroptera) und Köcherfliegen (Trichoptera) der Fall sein. Aber auch dort wird eDNA den Artenkenner nicht ersetzen. Artenkenntnis ist und bleibt wichtig – gerade dann, wenn durch eDNA mehr Daten in kürzerer Zeit generiert werden können.

Dank

Wir danken K. Weddelling und B. Thiesmeier für ihre konstruktiven Kommentare zum Manuskript und A. Meyer für das Foto.

Literatur

- Barandun, J. (2007): Geburtshelferkröten (*Alytes obstetricans*) und Gelbbauchunken (*Bombina variegata*) in Fließgewässern. – Zeitschrift für Feldherpetologie 14: 25–38.
- Biggs, J., N. Ewald, A. Valentini, C. Gaboriaud, R. A. Griffiths, J. Foster, J. Wilkinson, A. Arnett, P. Williams & F. Dunn (2014): Analytical and methodological development for improved surveillance of the great crested newt. – Defra Project WC1067, Oxford (Freshwater Habitats Trust).
- Biggs, J., N. Ewald, A. Valentini, C. Gaboriaud, T. Dejean, R. A. Griffiths, J. Foster, J. W. Wilkinson, A. Arnett, P. Brotherton, P. Williams & F. Dunn (2015): Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). – Biological Conservation 183: 19–28, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.029.
- Brinkman, N. E., R. A. Haugland, L. J. Wymer, M. Byappanahalli, R. L. Whitman & S. J. Vesper (2003): Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. – Applied and Environmental Microbiology 69: 1775–1782.
- Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. Y. Yu & M. De Bruyn (2014): Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring – Trends in Ecology and Evolution 29: 358–367.
- Deiner, K. & F. Altermatt (2014): Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. – PLoS ONE 6: e88786, doi: 10.1371/journal.pone.0088786.
- Deiner, K., J.-C. Walser, E. Mächler & F. Altermatt (2015): Choice of capture and extraction method affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. – Biological Conservation 183: 53–63, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.018.
- Dejean, T., A. Valentini, A. Duparc, S. Pellier-Cuit, F. Pompanon, P. Taberlet & C. Miaud (2011): Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. – PLoS ONE 6: e23398. doi:10.1371/journal.pone.0023398.
- Dejean, T., A. Valentini, C. Miquel, P. Taberlet, E. Bellemain & C. Miaud (2012): Improved detection of an invasive alien species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. – Journal of Applied Ecology 49: 953–959.
- Dodd, C. K. (Hrsg.) (2010): Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques. – Oxford (University Press).
- Ficetola, G. F., C. Miaud, F. Pompanon & P. Taberlet (2008): Species detection using environmental DNA from water samples. – Biology Letters 4: 423–425.
- Ficetola, G. F., E. Coissac, S. Zundel, T. Riaz, W. Shehzad, J. Bessiere, P. Taberlet & F. Pompanon (2010): An *in silico* approach for the evaluation of DNA barcodes. – BMC Genomics 11: 434.
- Ficetola, G. F., J. Pansu, A. Bonin, E. Coissac, C. Giguët-Covex, M. De Barba, L. Gielly, C. M. Lopes, F. Boyer, F. Pompanon, G. Rayé & P. Taberlet (2015): Replication levels, false presences, and the estimation of presence/absence from eDNA metabarcoding data. – Molecular Ecology Resources, im Druck, doi: 10.1111/1755-0998.12338.
- Goldberg, C. S., D. S. Pilliod, R. S. Arkle & L. P. Waits (2011) Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. – PLoS ONE 6:e22746. doi: 10.1371/journal.pone.0022746.
- Hachtel, M., M. Schlüpmann, B. Thiesmeier & K. Weddelling (Hrsg.) (2009): Methoden der Feldherpetologie. – Bielefeld (Laurenti).
- Herder, J. E., A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J. J. C. W. van Delft, P. F. Thomsen & P. Taberlet (2014): Environmental DNA – a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. – Stichting Ravon, Nijmegen. Report 2013–104. <http://www.environmental-dna.nl/Portals/7/Herder%20et%20al%202014%20-%20Environmental%20DNA%20review.pdf>
- Jerde, C. L., A. R. Mahon, W. L. Chadderton & D. M. Lodge (2014): „Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. – Conservation Letters 4: 150–157.
- Kelly, R. P., J. A. Port, K. M. Yamahara, R. G. Martone, N. Lowell, P. F. Thomsen, M. E. Mach, M. Bennett, E. Prahler, M. R. Caldwell & L. B. Crowder (2014): Harnessing DNA to improve environmental management. – Science 344: 1455–1456.

- Kéry, M., & B. R. Schmidt (2008): Imperfect detection and its consequences for monitoring for conservation. – *Community Ecology* 9: 207–216.
- Maruyama, A., K. Nakamura, H. Yamanaka, M. Kondoh & T. Minamoto (2014): The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. – *PLoS ONE* 9: e114639. doi:10.1371/journal.pone.0114639.
- McKee, A. M., S. F. Spear & T. W. Pierson (2015): The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. – *Biological Conservation* 183: 70–76, doi: 10.1371/journal.pone.0022746.
- Miller, D. A., J. D. Nichols, B. T. McClintock, E. H. C. Grant, L. L. Bailey & L. A. Weir (2011): Improving occupancy estimation when two types of observational error occur: non-detection and species misidentification. – *Ecology* 92: 1422–1428.
- Olson Z. H., J. T. Briggler & R. N. Williams (2012): An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. – *Wildlife Research* 39: 629–636.
- Pilliod, D. S., C. S. Goldberg, R. S. Arkle & L. P. Waits (2013): Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. – *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 70: 1123–1130.
- Rees, H. C., B. C. Maddison, D. J. Middleditch, J. R. M. Patmore & K. C. Gough (2014): The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. – *Journal of Applied Ecology* 51: 1450–1459.
- Rees, H. C., K. Bishop, D. J. Middleditch, J. R. M. Patmore, B. C. Maddison & K. C. Gough (2014): The application of eDNA for monitoring of the Great Crested Newt in the UK. – *Ecology and Evolution* 4: 4023–4032.
- Schmidt, B. R. (2008): Neue statistische Verfahren zur Analyse von Monitoring- und Verbreitungsdaten von Amphibien und Reptilien. – *Zeitschrift für Feldherpetologie* 15: 1–14.
- Schmidt, B. R., M. Kéry, S. Ursenbacher, O. J. Hyman & J. P. Collins (2013): Site occupancy models in the analysis of environmental DNA presence/absence surveys: a case study of an emerging amphibian pathogen. – *Methods in Ecology and Evolution* 4: 646–653.
- Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits & J. Bouvet (1996): Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. – *Nucleic Acids Research* 24: 3189–3194.
- Takahara, T., T. Minamoto & H. Doi (2015): Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the common carp (*Cyprinus carpio*). – *Biological Conservation* 183: 64–69, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.014.
- Thomsen, P. F., J. Kielgast, L. L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M. T. P. Gilbert, L. Orlando & E. Willerslev (2012a): Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. – *Molecular Ecology* 21: 2565–2573.
- Thomsen, P. F., J. Kielgast, L. L. Iversen, P. R. Møller, M. Rasmussen & E. Willerslev (2012b) Detection of a diverse marine fish using environmental DNA from seawater samples. – *PLoS ONE* 7:e41732. doi: 10.1371/journal.pone.0041732.
- Thomsen, P. F. & E. Willerslev (2015): Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. – *Biological Conservation* 183: 4–18, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.019.
- Turner, C. R., K. L. Uy & R. C. Everhart (2015): Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. – *Biological Conservation* 183: 93–102, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.017.
- Walker, S. F., M. B. Salas, D. Jenkins, T. W. J. Garner, A. A. Cunningham, A. D. Hyatt, J. Bosch & M. C. Fisher (2007): Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. – *Diseases of Aquatic Organisms* 77: 105–112.
- Yoccoz, N. G., J. D. Nichols & T. Boulinier (2001): Monitoring of biological diversity in space and time. – *Trends in Ecology & Evolution* 16: 446–453.