

2019

Pilotstudie zum Nachweis von Zerkarien-Dermatitis-Erregern
in OÖ Badeseen mittels DNA-Barcoding



NHM-Wien/ ABOL

19.12.2019



AUSTRIAN
BARCODE
OF LIFE



Projektendbericht

Pilotstudie zum Nachweis von Zerkarien-Dermatitis-Erregern in OÖ Badeseen mittels DNA-Barcoding

Naturhistorisches Museum Wien

Zentrale Forschungslaboratorien/ 3. Zoologische Abteilung/ ABOL

Burgring 7, 1010 Wien

Michael Duda, Elisabeth Haring, Christoph Hörweg, Luise Kruckenhauser, Susanne Reier,
Helmut Sattmann, Nikolaus Szucsich (alle NHM Wien)

Beauftragung: Amt der Oö. Landesregierung

Direktion Umwelt und Wasserwirtschaft

Abteilung Wasserwirtschaft

Gewässergüteaufsicht

Wien, 19.12.2019



Inhalt

1. Einleitung Hintergrund – Problem – Fragestellung	4
1.1. Parasitische Trematoden und Badedermatitis	4
1.2. DNA-Barcoding	5
1.3. DNA-Barcoding von Trematoden	5
1.4. Ziele der Studie	6
2. Methoden	7
2.1. Freilandarbeit - Sammeln	7
2.2. Zerkarien-Schlüpfversuche und taxonomische Bestimmung	9
2.3. Süßwassermollusken – Fixierung und Probennahme	10
2.4. DNA-Analyse – Erstellung von DNA-Barcodes von Trematoden und Mollusken	10
2.5. eDNA-Analyse von Trematoden und Mollusken – Probennahme	11
3. Ergebnisse	11
3.1. Trematoden	13
3.1.1. Museumsmaterial	13
3.1.2. Material aus Freilandaufsammlung	13
3.1.4. Dendrogramme und taxonomische Zuordnung	18
3.2. DNA-Barcode-Referenzsequenzen von Süßwassermollusken	21
3.3. eDNA-Ansatz zum Nachweis von Zerkarien	22
3.4. eDNA-Ansatz zum Nachweis von Mollusken	23
4. Diskussion/Interpretation	25
4.1. DNA-Barcode-Sequenzen und Primer-Design	25
4.1.1. Trematoden	25
4.1.2. Mollusken	25
4.2. Im Untersuchungsgebiet nachgewiesene Mollusken und Zerkarien	26
4.3. Stimmen die PCR-Ergebnisse aus Gewässerproben mit den Schlüpfversuchen überein?	27
Schlussbemerkungen	28

Team: Hubert Blatterer (Land OÖ), Florian Billinger (Uni Salzburg), Andreas Chovanec (BMNT), Michael Duda (NHM Wien), Christopher Gorofsky (Uni Wien), Hans-Peter Grasser (Land OÖ), Elisabeth Haring (NHM Wien), Wolfgang Heinisch (Land OÖ), Christoph Hörweg (NHM Wien), Luise Kruckenhauser (NHM Wien), Susanne Reier (NHM Wien), Helmut Sattmann (NHM Wien), Marcia Sittenthaler (NHM Wien), Nikolaus Szucsich (NHM Wien)

1. Einleitung Hintergrund – Problem – Fragestellung

1.1. Parasitische Trematoden und Badedermatitis

Digene Trematoden (Saugwürmer) sind als Parasiten von Wirbeltieren von ökologischer, medizinischer und wirtschaftlicher Bedeutung (Auer & Aspöck 2014). Sie haben alle einen komplexen Entwicklungszyklus, der eine Schnecke oder Muschel als obligaten ersten Zwischenwirt einschließt, wo eine ungeschlechtliche Fortpflanzung der Larvenstadien stattfindet. Aus den Schnecken schlüpfen Larven (Zerkarien), die weitere Wirte infizieren. Auf jeden Fall steht am Ende des Zyklus ein Wirbeltier. In diesem so genannten Endwirt findet die geschlechtliche Vermehrung statt. Die befruchteten Eier werden vom Endwirt ausgeschieden. Wenn sie in die Umwelt gelangen und die Erstlarven (Mirazidien) geeignete Mollusken als Zwischenwirte finden, erfolgt in diesen die ungeschlechtliche Fortpflanzung statt, die in der Regel eine Vervielfachung der daraus entstehenden Larvenstadien darstellt. Zwischen erstem Zwischenwirt und Endwirt können weitere Zwischenwirte (Wartewirte, Transportwirte) eingeschaltet sein, in denen aber keine Fortpflanzung stattfindet. Relativ einfach ist der Lebenskreislauf der Schistosomen, zu denen auch die medizinisch wohl bedeutendsten Saugwürmer zählen, die Erreger der Bilharziosen. Das sind Tropenkrankheiten, an denen jährlich mehrere hundert Millionen Menschen erkranken. Die Larven dieser Schistosomen, die aus den Schnecken schlüpfen, befallen direkt den Menschen und besiedeln Blutgefäße in Darm oder Harnblase (Kearn 1998; Sattmann & Hörweg 2019).

In Mitteleuropa kommen mit den Human-Schistosomen verwandte Arten als Parasiten von Vögeln vor, die sogenannten Vogelbilharzien. Die Larven (Zerkarien), die aus Süßwasserschnecken schlüpfen, befallen direkt die Endwirte, etwa Enten, indem sie mittels Saugnapf und Bohrdrüsen deren Haut durchdringen. Zur Wirtsfindung dienen ihnen chemische Rezeptoren, mit denen sie Fettsäuren der Wirte orten. Diese Wirtsfindung ist jedoch so unspezifisch, dass die Zerkarien auch „irrtümlich“ in andere Wirte eindringen. In solchen Fehlwirten sterben die Würmer nach dem Eindringen zwar ab, können jedoch eine lästige Hautentzündung (Dermatitis) hervorrufen. Das kommt auch bei Menschen vor und man spricht von Zerkarien-Dermatitis oder auch von Badedermatitis. Betroffen sind meist Menschen, die in Naturgewässern baden, aber auch Fischer, Freiland-Biologen und andere, die häufig Hautkontakt mit natürlichen stehenden Gewässern haben. In Österreich sind Nachweise von Schistosomatiden-Zerkarien seit etwa 50 Jahren belegt (Graefe et. al 1973; Auer & Aspöck 2002). Neben Arten der häufig gemeldeten Gattung *Trichobilharzia* könnten in Österreich auch solche der Gattungen *Orientobilharzia*, *Bilharziella* und *Gigantobilharzia* erwartet werden (Kolářová 2007, Horak & Kolářová 2011).

Beim Auftreten von Dermatitis nach dem Baden in Naturgewässern sind allerdings auch andere Verursacher für die Hautirritationen in Betracht zu ziehen, wie toxische Algen, Allergene, Insektenstiche und endogene Hauterkrankungen. Der klassische Nachweis der Zerkarien erfolgt durch Einsammeln von Wasserschnecken und die sogenannten Zerkarienschlüpfversuche. Dazu werden die Schnecken in Gläsern vereinzelt und bei Zimmertemperatur natürlichem (Fenster) oder künstlichem Licht (Lampen) ausgesetzt. Das Schlüpfen der Zerkarien wird durch Licht und Wärme induziert, sofern die Stadien schon reif zum Schlüpfen sind (Hörweg & Sattmann 2014). Verschiedene Schwierigkeiten mindern den Erfolg dieser Methode. Schon das Auffinden der Schnecken in einem Gewässer ist von den örtlichen und wetterbedingten Gegebenheiten beeinflusst. Diese können an verschiedenen Stellen und in unterschiedlichen Wassertiefen sitzen, unter Umständen nicht allzu nahe an den Badeplätzen, an denen Badedermatitis-Fälle registriert werden. Zum Nachweis ist eine repräsentative Zahl von Schnecken notwendig, da meist nur ein kleiner Prozentsatz mit den



gesuchten Zerkarien befallen ist. Eine Entnahme von vielen Tieren ist aber aus naturschutzrechtlichen und ethischen Gründen bedenklich. Es ist zu betonen, dass man für geschützte Arten und in Schutzgebieten Genehmigungen der Naturschutzbehörde benötigt. Empfindliche Arten (etwa *Radix*-Arten) vertragen weder den Wasserwechsel (das Leitungswasser) noch die Haltung in kleinen Gläsern gut und sterben bisweilen, bevor sie Zerkarien ausgeschieden haben. Als Alternative bliebe die Sektion der Schnecken, was jedoch eine destruktive und sehr zeitaufwändige Methode ist. Bei den meisten Trematoden können weder die Larven in der Schnecke (Sporozysten, Redien), noch die Zerkarien auf Artniveau bestimmt werden, was durch die Merkmalsarmut dieser Entwicklungsstadien bedingt ist. Zudem kommen in den Schnecken auch viele andere Zerkarien vor, die keine Dermatitis-Erreger sind. Die Unterscheidung und Zuordnung kann aber nur von Experten getroffen werden.

Aus den genannten Gründen ist der Kenntnisstand bezüglich der in Österreich vorkommenden Arten gering (Dvorak et al. 1999, Konecny et al. 1999; Sattmann et. al. 2004, Hörweg et al. 2006).

1.2. DNA-Barcoding

DNA-Barcoding ist eine standardisierte Methode, zur Bestimmung von Organismen anhand eines bestimmten Abschnittes aus ihrem Erbgut (der DNA). Die DNA-Sequenzen (Abfolge der Bausteine im DNA-Molekül) bestimmter Gene werden dabei verwendet, um Arten zu unterscheiden. Diese sogenannten DNA-Barcodes werden zuerst von zuverlässig bestimmten Organismen ermittelt und in einer Referenzdatenbank gespeichert. Sie stehen sodann für Vergleiche zur Verfügung und können zur Bestimmung von unbekannten Proben herangezogen werden. Dazu wird der entsprechende DNA-Abschnitt des fraglichen Organismus bzw. einer unbestimmten Probe sequenziert und mit den Sequenzen in einer Referenzdatenbank verglichen. Auf diese Weise ist die Artbestimmung mittels DNA-Barcoding schnell und sicher möglich. Der Bestimmungserfolg hängt jedoch von der Qualität und von der Vollständigkeit der Referenzdatenbank ab. Weltweite Gen-Datenbanken (z.B. GenBank) enthalten eine riesige Anzahl von Sequenzen unzähliger Organismen und verschiedenster Gene, die in den meisten Fällen im Zuge wissenschaftlicher Projekte ermittelt worden sind, oft mit evolutionsgeschichtlichen oder phylogenetischen Fragestellungen. Daher stammen die verfügbaren Daten zwischen aber auch innerhalb der Organismengruppen von verschiedenen Genen. Ein großer Grad von Fehlbestimmungen und die fehlende Korrekturmöglichkeit, aufgrund fehlender Belegexemplare, macht diese Datenbanken nur beschränkt geeignet für genetische Bestimmungsversuche. Der DNA-Barcoding-Ansatz zielt hingegen darauf ab, möglichst wenige „Standard-Gene“ von möglichst vielen Organismen zu identifizieren und in öffentlichen Datenbanken zu speichern. Die internationale, eigens dafür entwickelte Datenbank ist die „Barcode of Life Database“ (BOLD) der International Barcode of Life Initiative (IBOL). DNA-Barcoding ist ein sammlungsbasierter Ansatz, Belegexemplare ermöglichen Überprüfungen und Korrekturen von Bestimmungen.

1.3. DNA-Barcoding von Trematoden

Für mehrere Arten von Trematoden gibt es in den öffentlichen Gen-Datenbanken Referenz-DNA-Barcodes oder andere Gen-Sequenzen, die für Vergleiche herangezogen werden könnten und somit eine molekulargenetische Bestimmung ermöglichen. Für einen Teil dieser verfügbaren Sequenzen ist allerdings die korrekte taxonomische Zuordnung fraglich. Daher ist DNA-Barcoding als umfassendes Bestimmungstool für Trematoden noch nicht einsetzbar. Der Ausbau der DNA-Barcode

Referenzdatenbank für parasitische Würmer ist ein wichtiges Ziel der österreichischen DNA-Barcoding-Initiative Austrian Barcode of Life (Führer et. al 2005).

Die meisten für das Projekt relevanten Molluskenarten wurden im Rahmen der Initiative Austrian Barcode of Life (Kruckenhauser et al. 2016) bereits bearbeitet, jedoch sind bisher nur einzelne Vertreter aus dem Untersuchungsgebiet analysiert worden. Um etwaige innerartliche genetische Variation im Untersuchungsgebiet zu erkennen, und die DNA-Barcode-Referenzdatenbank oberösterreichischer Süßwassermollusken zu vervollständigen, sollten daher zusätzliche Individuen der möglichen Zwischenwirte aus den untersuchten Gewässern gesammelt und mittels DNA-Barcoding erfasst werden.

Die komplexen Zusammenhänge zwischen Tieren und ihren Parasiten sind von großer Bedeutung, um die Komplexität von Ökosystemen und deren Biodiversität besser zu verstehen. Sie werden in Zukunft zunehmend in den Fokus der Forschung rücken. Das Detektieren von Erregern in Sammelproben oder in Umweltproben („environmental DNA“, eDNA) könnte einerseits eine präzisere Bestimmung der Erreger-Arten sowie einen sensibleren Nachweis der Erreger in Gewässern ermöglichen. Dem eDNA-Barcoding liegt zugrunde, dass die DNA von Organismen auch in ihrer unmittelbaren Umwelt nachweisbar ist. Lebewesen besitzen in jeder Zelle Kopien ihrer DNA. DNA kann beispielsweise aus Hautschuppen, Schleim oder Ausscheidungen oder auch beim Zerfall abgestorbener Individuen ins Gewässer gelangen und bleibt dort einige Zeit erhalten. So findet man in Gewässern DNA von darin lebenden Organismen. Bei Badeteichen könnte eDNA-Barcoding eingesetzt werden, um freie Zerkarien, bzw. deren DNA in Gewässern nachzuweisen. Die Methode könnte auch zur „Entwarnung“ angewandt werden, wenn die Phase der Zerkarienausscheidung der Schnecken beendet ist. Inwieweit DNA-Barcoding bzw. eDNA-Barcoding als Instrument für diese Anwendungen zum Einsatz kommen könnte, war bis dato noch nicht untersucht.

Sowohl Arten deren Zerkarien Dermatitis hervorrufen können, als auch andere Trematoden-Arten, die als Parasiten von Wild-und Haustieren und auch des Menschen von Interesse sind, die aber aufgrund der Merkmalsarmut der Larvenstadien schwer bestimmbar sind, könnten über den DNA-Ansatz zugeordnet werden. Damit kann der Kenntnisstand über Vorkommen und Häufigkeit der verschiedenen Arten erweitert werden (z.B. Schistosomatidae, Echinostomatidae; Gaub 2014, Hohensee 2016).

1.4. Ziele der Studie

Im Rahmen der Pilotstudie sollten die Grundlagen für einen genetischen Nachweis von Zerkarien-Dermatitis-Erregern mittels DNA-Barcoding geschaffen werden. Dazu wurden Untersuchungen an ausgewählten oberösterreichischen Gewässern durchgeführt, um folgende Ziele zu erreichen:

- (1) Ermittlung von DNA-Barcode-Sequenzen Dermatitis auslösender Trematoden und ihrer Zwischenwirte (Süßwassermollusken) in diesen Gewässern
- (2) Ermittlung von DNA-Barcode-Sequenzen möglichst vieler weiterer Plathelminthen-Arten, die in den gesammelten Mollusken detektiert wurden.
- (3) Ausbau der österreichischen und internationalen DNA-Barcode-Referenzdatenbanken als Grundlage für zukünftige Anwendungen
- (4) Erarbeiten der Grundlagen für einen eDNA-Ansatz zum Nachweis von in Österreich vorkommenden Arten der Gattungen *Trichobilharzia*, (und eventuell anderer Schistosomatidae) und ihrer Zwischenwirte.



Im Detail sollte folgenden Fragen nachgegangen werden, um den Kenntnisstand über parasitische Plathelminthen und ihrer Wirtsarten in Oberösterreich zu verbessern:

- Welche Zerkarien kommen in den Untersuchungsgebieten vor?
- Welche der detektierten Arten kommen als Erreger der Badedermatitis in Frage?
- Welche Schnecken kommen in den Untersuchungsgebieten vor?
- In welchen Schneckenarten entwickeln sich welche Zerkarien?
- Kann das Risikopotential von Badedermatitis auch am Vorkommen von bestimmten Schneckenarten festgemacht werden?

2. Methoden

2.1. Freilandarbeit - Sammeln

In ausgewählten oberösterreichischen Gewässern wurden Wasserschnecken gesammelt und mittels konventioneller Methoden auf Zerkarien untersucht (Schlüpfversuche und Sezieren der Schnecken). Insgesamt fanden fünf Exkursion statt, die von den Teams aus Wien und Oberösterreich gemeinsam durchgeführt wurden. Zusätzlich wurden vom oberösterreichischen Team eigene Aufsammlungen getätigt und das Material entweder selbst untersucht oder zur Untersuchung an das NHM übermittelt (Tabelle 1, Abbildung 1).

Tabelle 1. Übersicht der Exkursionen/Beprobungen. * = gemeinsame Exkursionen.

Datum	Standort	Standort-Nummer, Koordinaten
10.03.19	Unterer Inn, Mühlheimer Lacke	[1] 48.292094 13.220801
18.03.19*	Oedter See	[2] 48.212988 14.221546
27.03.19	Unterer Inn, Reichersberger Au	[3] 48.340399 13.360308
06.04.19	Pichlingersee	[4] 48.239618 14.383349
19.04.19	Pichlingersee	[4] 48.239618 14.383349
27.04.19	Ausee	[5] 48.248165 14.416243
07.05.19	Oedter See	[2] 48.212988 14.221546
08.05.19	Ausee	[5] 48.248165 14.416243
18.05.19	Oedter See	[2] 48.212988 14.221546
24.05.19	Pichlingersee	[4] 48.239618 14.383349
27.05.19*	Unterer Inn, Reichersberger Au	[3] 48.340399 13.360308
30.05.19	Ausee	[5] 48.248165 14.416243
01.06.19	Pichlingersee	[4] 48.239618 14.383349
02.06.19	Oedter See	[2] 48.212988 14.221546
04.06.19	Holzöstersee	[6] 48.058489 12.900272
08.06.19	Traunsee, Segelclub Altmünster	[7] 47.903094 13.772380
13.06.19*	Traunsee, Segelclub Altmünster	[7] 47.903094 13.772380
20.06.19	Pichlingersee	[4] 48.239618 14.383349
02.07.19	Seeleitensee	[8] 48.059220 12.967100
01.08.19*	Unterer Inn, Mühlheimer Lacke Seeleitensee	[1] 48.292094 13.220801 [8] 48.059220 12.967100
07.08.19	Ausee	[5] 48.248165 14.416243
19.08.19*	Unterer Inn, Hagenauer Bucht Badesee Wildenau	[9] 48.275545 13.092661 [10] 48.199358 13.324482
20.10.19	Unterer Inn, Hagenauer Bucht	[9] 48.275545 13.092661

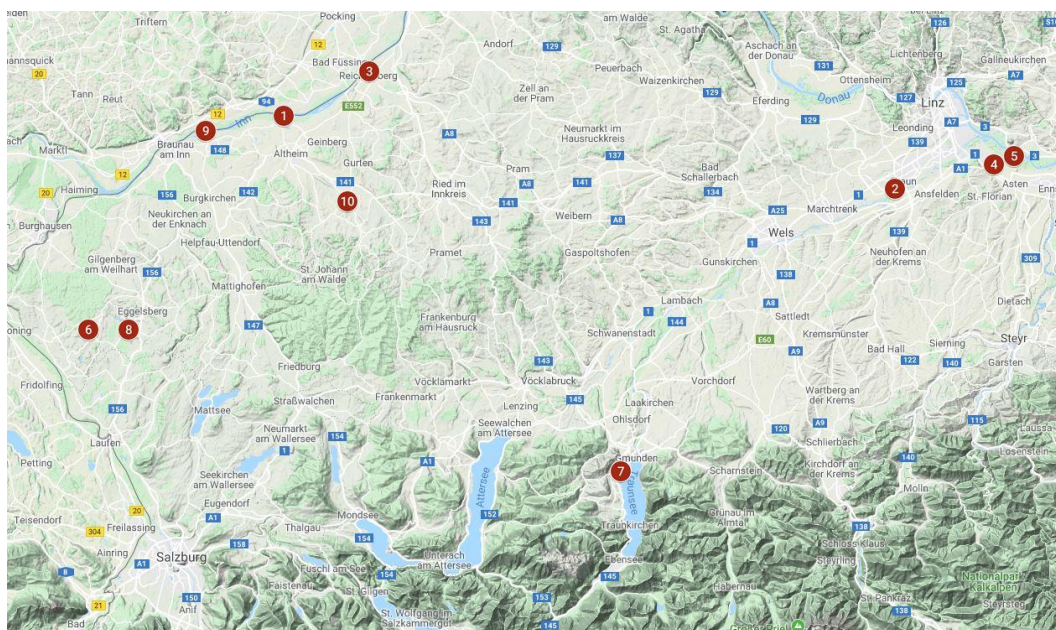


Abbildung 1. Lage der 10 Exkursionsziele in Oberösterreich. 1=Unterer Inn, Mühlheimer Lacke; 2=Oedter See; 3=Unterer Inn, Reichersberger Au; 4=Pichlingersee; 5=Ausee; 6=Holzöstersee; 7=Traunsee Segelclub Altmünster; 8=Seeleitensee; 9=Unterer Inn, Hagenauer Bucht; 10=Badesee Wildenau

2.2. Zerkarien-Schlüpfversuche und taxonomische Bestimmung

Die Schlüpfversuche wurden einerseits am NHM andererseits von der Abteilung für Oberflächengewässerrwirtschaft am Land der oberösterreichischen Landesregierung durchgeführt. Augenmerk sollte auf Schistosomatidae, Diplostomidae, Echinostomatidae, Fasciolidae, Paramphistomidae und etwaige andere interessante Gruppen gelegt werden. Für die Schlüpfversuche wurden die Schnecken vereinzelt in Gläser gesetzt und am Fensterbrett aufgestellt, da Licht das Entlassen der Zerkarien anregt (Abbildung 2). Entlassene Zerkarien wurden in 80% Ethanol überführt, ebenso die befallenen Schnecken für etwaige folgende Sektionen.

Für die morphologische Bestimmung wurden die Zerkarien in ein Glycerin-Ethanol-Gemisch (50:50) auf einen Objektträger überführt. Nach dem Verdampfen des Ethanols wurde ein Tropfen pures Glycerin hinzugefügt und das Präparat wurde mit einem Deckglas abgedeckt. Die Präparate wurden unter einem Durchlichtmikroskop morphologisch untersucht und es wurden Mikrofotografien erstellt. Die Präparate wurden in Form von Dauerpräparaten in die Sammlung des NHMW überführt.



Abbildung 2. Sammelgläser mit vereinzelt Schnecken im Sonnenlicht.

Die Merkmalsarmut sowie die Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Trematodenarten erschweren die taxonomische Bestimmung mittels morphologischer Merkmale. Trotzdem konnten die meisten der gefundenen Trematoden (60 Individuen) zumindest auf Gattungsniveau bestimmt werden, bei 17 davon konnte auch die Art festgestellt werden (darunter *Trichobilharzia franki*). Bei einigen Exemplaren (21) war nur eine Bestimmung auf Familienniveau möglich und einige Individuen konnten aufgrund bereits fortgeschrittener Mazeration nicht morphologisch zugeordnet werden. Neben der morphologischen Bestimmung wurden die erstellten DNA-Barcodes herangezogen, um im Vergleich mit publizierten DNA-Sequenzen (so diese verfügbar waren) die Bestimmung zu bestätigen bzw. zu verfeinern. Von *T. franki* wurden, da es sich um einen Erstdnachweis in Österreich handelte, Messungen (Gesamtlänge, Länge Schwanz und Länge Schwanzfortsätze) durchgeführt.

2.3. Süßwassermollusken – Fixierung und Probennahme

Die für das DNA-Barcoding ausgewählten Mollusken wurden in Ethanol fixiert und nach taxonomischer Zuordnung fotografiert und eine Gewebeprobe (vom Fuß) genommen. Nach Eingabe aller Daten in die Datenbank wurden die Individuen in die Molluskensammlung des NHM überführt. Auch Schnecken, die für die Schlüpfversuche verwendet wurden, wurden in die Molluskensammlung überführt.

2.4. DNA-Analyse – Erstellung von DNA-Barcodes von Trematoden und Mollusken

Für die DNA-Analyse wurde DNA aus verschiedenen Organismen bzw. Wasserproben extrahiert, (1) einzelne Zerkarien aus Schlüpfversuchen, (2) einzelne Zerkarien aus der Sammlung des NHM, (3) Gewebeproben von Mollusken, (4) Filtrate aus Wasserproben.

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), wurden ausgewählte Genabschnitte vervielfältigt (amplifiziert) und anschließend sequenziert (Sanger-Sequenzierung). Folgende Gene wurden untersucht: Mitochondriale (mt) Gene: *Cytochrome-c-Oxidase* Untereinheit 1-Gen (*COI*), *NADH-Dehydrogenase* Untereinheit 1-Gen (*nd1*); Gene des Kerngenoms (nc): *18S* rRNA-Gen (*18S*).

COI, das am häufigsten verwendete DNA-Barcoding-Gen, wurde routinemäßig in allen Proben (Trematoden und Mollusken) untersucht. *Nd1* wurde als zusätzliches Gen für die Familie Echinostomatidae analysiert, da von diesem Gen für Echinostomatidae besonders viele Vergleichssequenzen in der GenBank vorliegen. Das *18S*-Gen ist nicht als DNA-Barcode einsetzbar (zu wenig variabel), wurde aber für Trematoden verwendet, um auf das Vorhandensein von amplifizierbarer DNA zu testen. Man geht davon aus, dass die universellen Primer für dieses Gen in allen Trematoden binden. Für die PCR-Amplifikation all dieser Markergene wurden einerseits bereits veröffentlichte PCR-Primer-Sequenzen verwendet, andererseits neue PCR-Primer entworfen, getestet und optimiert. Es ist zwischen artspezifischen und universellen Primern zu unterscheiden (für beide Typen gibt es verschiedene Anwendungsbereiche). Ein spezifischer PCR-Primer erlaubt die PCR-Amplifikation der DNA der Zielart(en), während andere Organismengruppen möglichst ausgeschlossen werden (in DNA anderer Arten bindet der PCR-Primer nicht oder so schlecht, dass keine Vervielfältigung des Genabschnittes stattfinden kann). Universelle Primer sind so konstruiert, dass sie ein möglichst breites Artenspektrum erfassen können, sie binden in sehr konservierten Genabschnitten. Für das Entwerfen von Primern („Primerdesign“) benötigt man Gensequenzen auch der nächstverwandten Arten, die wir zum Teil im Rahmen dieses Projektes generieren konnten. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Gene und die für die Amplifikation verwendeten PCR-Primer.

Neben der Entwicklung von PCR-Primern für die Zerkariendetektion wurde auch einer zum Nachweis möglicher Zwischenwirte (*L. stagnalis*, *Radix* sp., *Stagnicola* sp.) in eDNA-Proben entwickelt (ZDOE-Moll-fw; Tabelle 2). Die neu erstellten PCR-Primer wurden an Wasserproben, die nachweislich die jeweiligen Arten enthielten, getestet. Dies war (1) Wasser aus Aquarium, in denen die Arten gehalten wurden (Positivkontrollen) und (2) die im Freiland gewonnenen Wasserproben.

Tabelle 2. Liste aller im Projekt verwendeten Primer mit Sequenzen (5'-3'), Orientierung (Leserichtung; fwd = „forward primer“, rev = „reverse primer“), Ziel-Gen, Taxa, für die die Primer

konstruiert wurden, bzw. in denen die Primer binden. Quellenangaben; a= Lockyer et al. (2003); b= diese Studie; c= Duda et al. (2017); d=Hohensee et al. (2016); e= Georgieva et al. (2013).

Gen	Name	Orientierung	Taxa	In Kombination mit – Länge (bp)	Quelle
COI	Schisto-COI-5-Fw	fwd	Schistosomatidae, diverse Trematoda	Schisto-COI-3-Rv – ~1200	a
COI	Schisto-COI-3-Rv	rev	Schistosomatidae, diverse Trematoda	Schisto-COI-5-Fw – ~1200	a
COI	Echino1-Rv	rev	Trematoda	Schisto-COI-5-Fw – ~650	b
COI	ZDOE-COI-rv	rev	<i>Trichobilharzia</i>	Schisto-COI-5-Fw – ~800	b
COI	ZDOE-COI-fw	fwd	<i>Trichobilharzia</i> eDNA	Schisto-COI-3-Rv – 251	b
18S	Trem-18S-f	fwd	Trematoda	Trem-18S-r – ~430	d
18S	Trem-18S-r	rev	Trematoda	Trem-18S-f – ~430	d
nd1	NDJ11_fw	fwd	Echinostomatidae	NDJ2A_rv – 530	e
nd1	NDJ2A_rv	rev	Echinostomatidae	NDJ11_fw – 530	e
COI	LCO1490_ABOL_Moll_11	fwd	Mollusca	HCO2198_ABOL_Moll_1 – ~650	c
COI	HCO2198_ABOL_Moll_1	rev	Mollusca	LCO1490_ABOL_Moll_11 – ~650	c
COI	ZDOE-Moll-fw	fwd	Mollusca eDNA	HCO2198_ABOL_Moll_1 – 350	b

2.5. eDNA-Analyse von Trematoden und Mollusken – Probennahme

Von ausgewählten Gewässern wurden Wasserproben genommen und durch 45 µl Sterivex™ Filtereinheiten gefiltert und bei -80°C gelagert. Für die Probennahme wurde Wasser an den Besammlungsstellen durch die Filter gepresst und anschließend, bis zur Lagerung bei -80°C, gekühlt aufbewahrt. Als Positivkontrolle wurde Wasser aus einem Aquarium gefiltert, welches *L. stagnalis*, *R. balthica*, *Stagnicola* sp. (potentielle Zwischenwirte) und andere Wasserschnecken (*Bithynia tentaculata* und *Physella acuta*) sowie Zerkarien enthielt. Zusätzlich wurden vier Mal Wasserproben aus einem Aquarium direkt nach dem Schlüpfen der Zerkarien genommen.

3. Ergebnisse

In insgesamt 23 Exkursionen an 10 verschiedenen Standorten konnten 836 Wassermollusken (Schnecken und Muscheln) gesammelt werden. Nur an einem einzigen Standort, am Badensee Wildenau [Nr. 10], wurden keine Tiere gesichtet. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die gesammelten Wassermollusken und den Anteil der Individuen, die Zerkarien entließen. Insgesamt schlüpften aus 836 Individuen (von 23 Schnecken- und 7 Muschel-Arten) 125 Mal Zerkarien im Schlüpfglas. Das ergibt eine Gesamtbefallsrate (Gesamt-Prävalenz) von 14,95 %. Die genetisch untersuchten Zerkarien sind in Tabelle 4 (Museumsmaterial) und Tabelle 5 (im Rahmen des Projekts gesammeltes Material) zusammengefasst.

Tabelle 3 Übersicht über die gesammelten Wassermollusken. gelb hinterlegt = Exkursionen der OÖ; grün hinterlegt = gemeinsame Exkursionen. n= Zahl der gesammelten / gesichteten Schnecken; * = lebend gesichtet; x = Leerschale; inf. (infiziert) = Zahl der Schnecken, aus denen Zerkarien schlüpften; - = keine Zerkarienschlüpfversuche gemacht; Standorte: [1] = Unterer Inn, Mühlheimer Lacke; [2] Oedter See; [3] Unterer Inn, Reichersberger Au; [4] Pichlingersee; [5] Holzöstersee; [6] Traunsee Segelclub Altmünster; [7] Seeleitensee; [8] Ausee; [9] Unterer Inn, Hagenauer Bucht.

Exkursionsdatum	10.03.19		18.03.19		27.03.19		07.05.19		27.05.2019		01.06.19		02.06.19		04.06.19		08.06.19		13.06.19		02.07.19		01.08.19		01.08.19		07.08.19		19.08.19		20.10.19	
Standort	[1]		[2]		[3]		[2]		[3]		[4]		[2]		[5]		[6]		[6]		[7]		[1]		[7]		[8]		[9]		[9]	
Wassertemperatur	10°C		13°C		13,5°C		18°C		17,5°C		17°C		17°C																			
Schnecken (Gastropoda)	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.
<i>Acroloxus lacustris</i>									4	–																						
<i>Anisus vortex</i>									1	–													x									
<i>Aplexa hypnorum</i>									3	–																						
<i>Bithynia tentaculata</i>			4	0	18	0	7	0	112	0							10	0	x				2	0	3	0					1	0
<i>Galba truncatula</i>									*	–																						
<i>Gyraulus albus</i>			x						2	0																						
<i>Gyraulus laevis</i>																									13	–						
<i>Gyraulus</i> sp.																									x							
<i>Hippeutis complanatus</i>			x																						2	–						
<i>Lymnaea stagnalis</i>	6	0			2	1			28	2													16	0	8	0			28	9	3	1
<i>Physella acuta</i>					3	0			18	0											31	0	1	0	18	0			39	0		
<i>Planorbis carinatus</i>																			x				x		x							
<i>Planorbis planorbis</i>			3	0			15	0	15	0			4	0			5	0			2	0	x		x							
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>									*	–									x													
<i>Radix ampla</i>									*	–																						
<i>Radix auricularia</i>									10	1	2	0			4	1			x				9	1	10	1	1	1	18	3		
<i>Radix cf balthica</i>	5	0	30	0	6	0	33	0	4	0							43	0			5	0			1	0						
<i>Stagnicola cf. corvus</i>									8	3													2	0					180	101		
<i>Valvata cristata</i>			x						17	0															10	–						
<i>Valvata macrostoma</i>							1	0																								
<i>Valvata piscinalis</i>			x		3	0			1	–									x						6	–						
<i>Viviparus contectus</i>																									x							
<i>Viviparus</i> sp.									1	0																						
Muscheln (Bivalvia)																																
<i>Anodonta anatina</i>									*	–																						
<i>Anodonta cygnea</i>									*	–																						
<i>Corbicula fluminea</i>			1	–																												
<i>Dreissena polymorpha</i>			x																1	–			x									
<i>Musculium lacustre</i>									1	–															3	–						
<i>Pisidium</i> sp.			*	–					4	–									x						x							
<i>Unio pictorum</i>									*	–															x							
	11	0	38	0	32	1	56	0	229	6	2	0	4	0	4	1	58	0	1	0	38	0	30	1	74	1	1	1	265	113	4	1



3.1. Trematoden

3.1.1. Museumsmaterial

Die DNA-Sequenzanalyse aus Museumsmaterial (NHMW Sammlung ZOO-EV) aus Niederösterreich wurde aus zweierlei Gründen durchgeführt. Einerseits dienten sie dem Designen und Testen der Primer, andererseits lieferten sie Referenzsequenzen, die für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind. Das Material und die Ergebnisse sind in (Tabelle 4) aufgelistet. Von 29 der 33 Proben aus der NHM-Sammlung konnte der *COI*-Marker amplifiziert werden, 16 davon lieferten genügend PCR-Produkt für eine erfolgreiche Sequenzierung. Für den *nd1*-Marker wurden 10 Proben positiv amplifiziert und für den *18S* Marker 15 Proben. Die Vertreter folgender Familien wurden im analysierten Museumsmaterial mittels DNA-Barcode erfasst: Echinostomatidae (drei Clades), Paramphistomidae (eine Art), Plagiorchiidae, Strigeidae und Schistosomatidae (eine Art).

3.1.2. Material aus Freilandaufsammlung

Insgesamt wurden DNA Analysen von 100 Trematoden-Individuen, welche im Rahmen dieses Projektes in Oberösterreichischen Gewässern gesammelt wurden, durchgeführt (Tabelle 5). Der *COI* Marker konnte in 59 Individuen erfolgreich amplifiziert und sequenziert werden. Bei weiteren 7 Individuen war die PCR erfolgreich, die Sequenzen allerdings schwer lesbar (Tabelle 5). Das könnte daran liegen, dass Trematoden auch genetisch sehr variabel sind und die Primer deshalb schlecht und / oder nicht spezifisch binden. Der *nd1*-Marker wurde in 30 Individuen verwendet und erlaubte in 14 eine erfolgreiche Amplifizierung und Sequenzierung. Der Trematoden-spezifische *18S* Marker wurde in 54 Individuen verwendet und konnte in 43 erfolgreich amplifiziert werden. Aufgrund der Konserviertheit des Gens eignet er sich nicht als Barcoding-Marker und wurde daher nur bei einem Teil der untersuchten Proben testweise angewandt. Dieser Marker wurde vor allem verwendet, um das Vorhandensein von genügend amplifizierbarer DNA zu überprüfen. Die Primer sind universell und die Tests bestätigten die erfolgreiche Verwendbarkeit in allen Arten. Die Sequenzanalyse bestätigte das Vorhandensein brauchbarer DNA und die Zuordnung zu Trematoden (ohne weitere taxonomische Zuordnung).

Tabelle 4. Untersuchte Zerkarien aus der Sammlung des NHMW und Ergebnisse der PCR-Versuche. + = PCR-Produkt vorhanden und erfolgreich sequenziert; - = PCR verlief negativ; n.a. = dieses Markergen nicht analysiert; s = Sequenz des PCR-Produkts nicht lesbar. Die Farben entsprechen den Clades in den phylogenetischen Bäumen.

Lab-Code	Familie	Gattung /Art (tentativ)	Wirtsort	Fundort	COI	ND1	18S	Clade
RI1-1-001	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Radix labiata</i>	Fischteich, Rohrau, NÖ	+	+	-	E2
RI1-1-002	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Radix labiata</i>	Fischteich, Rohrau, NÖ	+	+	+	E2
RI2-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Radix labiata</i>	Fischteich, Rohrau, NÖ	s	+	s	Pa
Ls8-7-001	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	+	-	+	T2
Ls8-7-002	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	+	n.a.	-	T2
Ls8-7-003	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	s	n.a.	n.a.	T2
Ls8-7-004	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	s	n.a.	n.a.	T2
Ls8-7-005	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	s	n.a.	n.a.	T2
Ls8-7-006	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	+	n.a.	n.a.	T2
Ls8-7-007	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	s	n.a.	n.a.	T2
Ls10-12-001	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	s	-	-	T2
Ls10-12-002	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	-	n.a.	+	T2
Ls10-12-003	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	s	n.a.	n.a.	T2
Ls10-12-004	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	s	n.a.	n.a.	T2
Ls10-12-005	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Teich, Leitha, NÖ	s	n.a.	n.a.	T2
Ssp1-2-001	Strigeidae	<i>Australapatemon</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Donau, Fischamend, NÖ	+	-	+	S1
Ssp1-2-002	Strigeidae	<i>Australapatemon</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Donau, Fischamend, NÖ	-	n.a.	-	S1
Ssp2-2-001	Strigeidae	<i>Australapatemon</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Donau, Fischamend, NÖ	+	n.a.	+	S1
Ssp2-2-002	Strigeidae	<i>Australapatemon</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Donau, Fischamend, NÖ	s	n.a.	n.a.	S1
Ssp2-2-003	Strigeidae	<i>Australapatemon</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Donau, Fischamend, NÖ	s	n.a.	+	S1
RI3-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Radix labiata</i>		-	+	+	E3
RI3-002	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Radix labiata</i>		-	+	n.a.	E3
Ls9-001	Plagiorchiidae				+	+	+	P3
Ls4-2-001	Echinostomatidae	<i>Drepanocephalus</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Donau, Fischamend	+	-	+	E4
Gt1-001	Paramphistomidae	<i>Paramphistomum</i> sp.	<i>Galba trunculata</i>		+	n.a.	n.a.	Pa
Gt1-002	Paramphistomidae	<i>Paramphistomum</i> sp.	<i>Galba trunculata</i>		s	+	+	Pa
Ssp7-2-001	Strigeidae	<i>Australapatemon</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Donau, Fischamend, NÖ	+	-	+	S1
Ls5-2-001	Echinostomatidae	<i>Drepanocephalus</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Donau, Fischamend, NÖ	+	+	+	E4
Ls5-2-002	Echinostomatidae	<i>Drepanocephalus</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Donau, Fischamend, NÖ	+	n.a.	+	E4
Gt2-001	Paramphistomidae	<i>Paramphistomum</i> sp.	<i>Galba trunculata</i>		+	+	+	Pa
Gt2-002	Paramphistomidae	<i>Paramphistomum</i> sp.	<i>Galba trunculata</i>		s	n.a.	n.a.	Pa
Gt3-001	Paramphistomidae	<i>Paramphistomum</i> sp.	<i>Galba trunculata</i>		+	+	+	Pa
Gt3-002	Paramphistomidae	<i>Paramphistomum</i> sp.	<i>Galba trunculata</i>		+	n.a.	+	Pa

Tabelle 5. Genetisch untersuchte Zerkarien aus Oberösterreich (Exkursionen 2019) und Ergebnisse der PCR-Versuche. + = PCR-Produkt vorhanden und erfolgreich sequenziert; - = PCR verlief negativ; n.a. = dieses Markergen nicht analysiert; s = Sequenz des PCR-Produkts nicht lesbar. Die Farben entsprechen den Clades in den phylogenetischen Bäumen.

Lab-Code	Familie	Gattung /Art	Wirtsart	Fundort /Datum	COI	ND1	18S	Clade
Ls8-4-001	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.3.19	+	n.a.	+	P3
Ls8-4-002	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.3.19	+	-	+	P3
Ls8-4-003	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.3.19	+	n.a.	+	P3
Ls8-4-004	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.3.19	+	n.a.	+	P3
Ls8-4-005	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.3.19	+	n.a.	+	P3
Ls8-4-006	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.3.19	+	n.a.	+	P3
Ssp3-4-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	s	-	-	n.a.
Ssp4-4-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	-	+	E1
Ssp5-4-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	-	+	E1
Ssp5-4-002	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	+	E1
Ssp5-4-003	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	E1
Ssp6-4-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola</i> sp.	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	-	-	E1
Ssp8-4-001	Plagiorchiidae		<i>Stagnicola</i> sp.	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	-	+	P3
Ssp8-4-002	Plagiorchiidae		<i>Stagnicola</i> sp.	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	s	n.a.	-	n.a.
Ssp8-4-003	Plagiorchiidae		<i>Stagnicola</i> sp.	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	-	n.a.	-	n.a.
Ls6-4-001	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	-	+	P1
Ls6-4-002	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	P1
Ls6-4-003	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	P1
Ra2-4-001	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	-	+	T1
Ra2-4-002	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	-	T1
Ra2-4-003	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	+	T1
Ra2-4-004	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	+	T1
Ra2-4-005	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	+	T1
Ra2-4-006	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	T1
Ra2-4-007	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	T1
Ra2-4-008	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	T1
Ra2-4-009	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	T1
Ra2-4-010	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	T1
Ra2-4-011	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	T1
Ra2-4-012	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Reichersberger Au, OÖ, 27.5.19	+	n.a.	n.a.	T1
Ra4-6-001	Plagiorchiidae		<i>Radix auricularia</i>	Holzöstersee, OÖ, 4.6.2019	+	-	+	P2
Ra4-6-002	Plagiorchiidae		<i>Radix auricularia</i>	Holzöstersee, OÖ, 4.6.2019	+	n.a.	+	P2
Ra4-6-003	Plagiorchiidae		<i>Radix auricularia</i>	Holzöstersee, OÖ, 4.6.2019	+	n.a.	+	P2



Ra4-6-004	Plagiorchiidae		<i>Radix auricularia</i>	Holzöstersee, OÖ, 4.6.2019	+	n.a.	+	P2
Ra10-9-001	??		<i>Radix auricularia</i>	Seeleithensee, OÖ, 1.8.19	-	-	-	n.a.
Ra10-9-002	??		<i>Radix auricularia</i>	Seeleithensee, OÖ, 1.8.19	s	n.a.	-	n.a.
Ra10-9-003	??		<i>Radix auricularia</i>	Seeleithensee, OÖ, 1.8.19	s	n.a.	-	n.a.
Ls7-8-001	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	-	+	P1
Ls7-8-002	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	n.a.	+	P1
Ls1-8-001	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	+	D1
Ls1-8-002	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	-	+	D1
Ls1-8-003	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	n.a.	+	D1
Ls2-8-001	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	-	+	P1
Ls2-8-002	Plagiorchiidae		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	n.a.	+	P1
Ls3-8-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	+	+	P2
Ls3-8-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	+	+	P2
Ls11-8-001	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-002	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-003	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-004	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-006	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-007	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-008	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-009	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-010	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-011	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-9-012	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-013	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-014	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-015	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls11-8-015	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-001	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-002	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-003	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-004	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-005	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-006	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-007	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-008	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-009	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls12-8-010	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.
Ls13-8-001	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	n.a.	n.a.	n.a.

Ls13-8-002	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	+	n.a.	E2
Ls13-8-003	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	+	n.a.	E2
Ls13-8-004	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	+	n.a.	E2
Ra1-8-001	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Radix auricularia</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	+	+	E2
Ra1-8-002	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Radix auricularia</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	+	-	E2
Ra1-8-003	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Radix auricularia</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	+	-	E2
Ra3-8-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Radix auricularia</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	s	+	+	E3
Ra3-8-002	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Radix auricularia</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	s	+	+	E3
Ra3-8-003	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Radix auricularia</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	+	+	E3
Sc1-8-003	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	-	+	E1
Sc1-8-002	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	n.a.	+	E1
Sc1-8-003	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	n.a.	+	E1
Sc2-8-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	-	+	E1
Sc2-8-002	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	n.a.	+	E1
Sc2-8-003	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	n.a.	-	E1
Sc9-8-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	-	-	+	E1
Sc9-8-002	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	+	+	E1
Sc9-8-003	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	+	+	E1
Sc10-8-001	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	s	+	+	E2
Sc10-8-002	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	n.a.	+	E2
Sc10-8-003	Echinostomatidae	<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Stagnicola corvus</i>	Hagenauer Bucht, 19.8.19	+	n.a.	+	E2
Ls14-8-001	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 20.10.19	+	n.a.	n.a.	D1
Ls14-8-002	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 20.10.19	+	n.a.	n.a.	D1
Ls14-8-003	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 20.10.19	+	n.a.	n.a.	D1
Ls14-8-004	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 20.10.19	+	n.a.	n.a.	D1
Ls14-8-005	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 20.10.19	+	n.a.	n.a.	D1
Ls14-8-006	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 20.10.19	+	n.a.	n.a.	D1
Ls14-8-007	Diplostomidae	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Hagenauer Bucht, 20.10.19	+	n.a.	n.a.	D1

Im Untersuchungsgebiet konnten zwei *Trichobilharzia*-Arten nachgewiesen werden, *T. franki* und *T. szidati* wobei letztere nur aufgrund der Morphologie und der Wirtsart (*Lymnaea stagnalis*) taxonomisch zugeordnet wurde. Die PCR aus diesen Proben gelang trotz einiger Wiederholungen nicht. Dies betrifft auch die Zerkarien der Diplostomidae und der Echinostomatidae aus diesem Schlüpfversuch (Hagenauer Bucht 18.9.19), was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Fixierung dieser Zerkarien entweder nicht optimal verlaufen ist oder die Zerkarien bereits vor der Fixierung mazeriert waren. *T. szidati* konnte jedoch aus dem Material der NHM-Sammlung morphologisch bestätigt und genetisch analysiert werden. Auch für die im Freiland gesammelten *T. franki* (Erstnachweis für Österreich) konnten morphologische sowie genetische Daten erhoben

werden. *Bilharziella* spp. wurde nicht nachgewiesen, was daran liegen könnte, dass die Zahl der gefundenen Schnecken der Familie Planorbidae relativ gering war.

3.1.4. Dendrogramme und taxonomische Zuordnung

Die im Zuge des Projekts generierten DNA-Sequenzen wurden zur Erstellung von phylogenetischen Dendrogrammen verwendet. Abbildung 3 gibt einen Überblick. Die farblich markierten Gruppen (Clades) entsprechen größtenteils taxonomischen Gruppen (Familien, Gattungen) und werden im Folgenden besprochen.

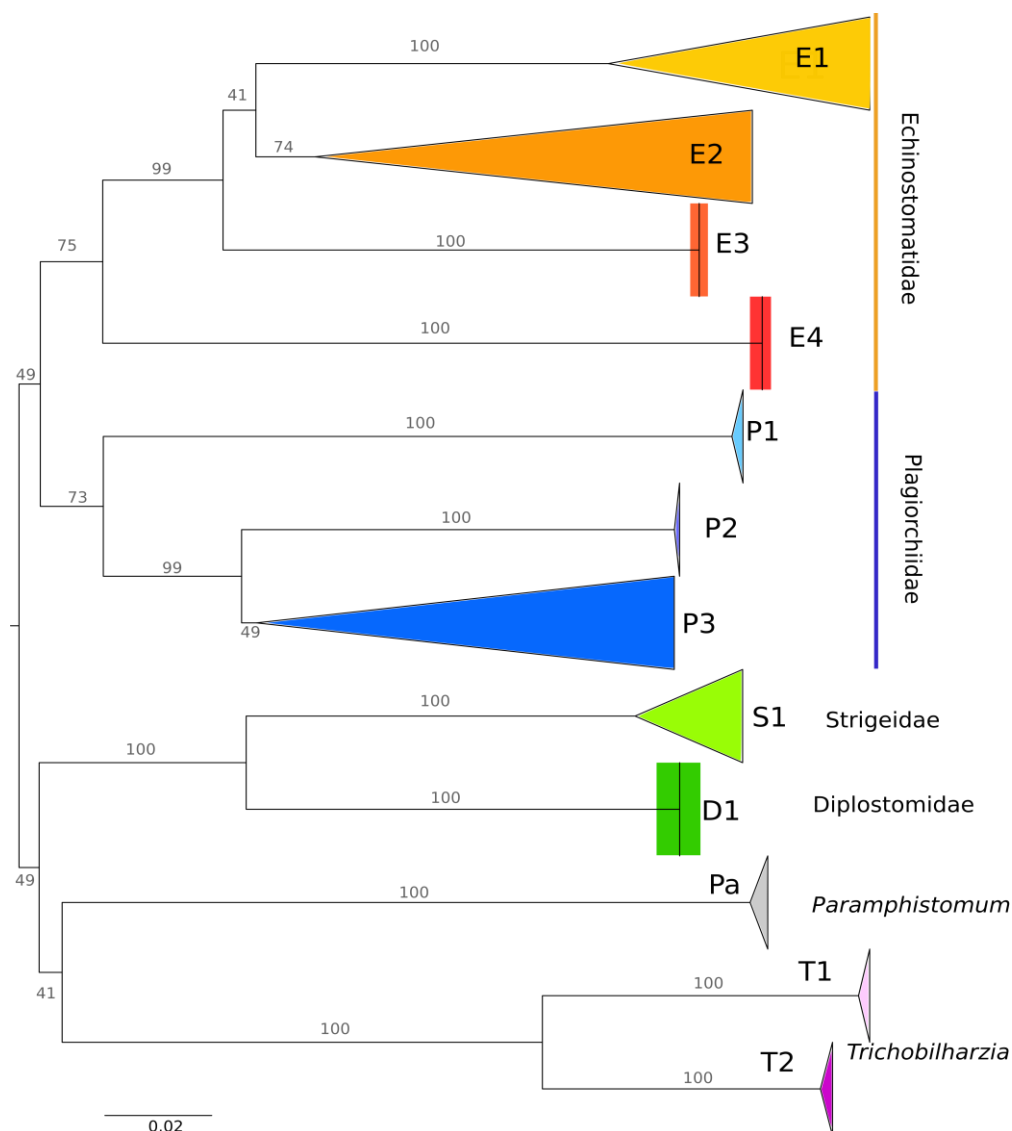


Abbildung 3. Phylogenetischer Baum (Neighbour-Joining-Baum) basierend auf *COI*-Gensequenzen aller im Untersuchungsgebiet nachgewiesenen Trematodenarten. Die Familie der Echinostomatidae ist in vier Clades unterteilt (E1, E2, E3 & E4, eingefärbt in orange), die Familie der Plagiorchiidae in drei Clades (E1, E2 & E3, blau), die Familien Diplostomidae (D1, dunkelgrün) und Strigeidae (S1, hellgrün) und die Gattung *Paramphistomum* (Pa, grau) sind jeweils mit einem Clade vertreten und die

Gattung *Trichobilharzia* mit zwei Clades (T1 & T2, pink). Zahlen an den Verzweigungsknoten sind Bootstrap-Werte.

Schistosomatidae: Die Gattung *Trichobilharzia* ist mit zwei Arten vertreten, welche auch bestimmt werden konnten: *Trichobilharzia franki* (Clade T1) und *T. szidati* (Clade T2 - Museumsmaterial). Für *T. franki* ist dies somit der erste Nachweis für Österreich. *T. szidati* wurde einerseits aus Museumsmaterial (aus Niederösterreich) morphologisch und molekular bestätigt, sowie aus einem oberösterreichischen Fund morphologisch zugeordnet.

Paramphistomidae: Die Gattung *Paramphistomum* (Clade Pa) konnte in *Radix* spp. und *Galba truncatula* nachgewiesen werden, allerdings nur aufgrund von Museumsmaterial. Im Untersuchungsgebiet dieser Studie kam die Gattung nicht vor.

Strigeidae: Clade S1 repräsentiert die Familie Strigeidae. Zerkarien aus Clade S1 wurden tentativ der Gattung *Australapatemon* zugeordnet. Sie wurden nur in *Stagnicola* sp. nachgewiesen und dieser Nachweis beruht auf Museumsmaterial. In Oberösterreich wurden Vertreter dieser Familie im Rahmen dieser Studie nicht nachgewiesen.

Diplostomidae: Zerkarien aus Clade D1 hingegen wurden in *L. stagnalis* aus der Hagenauer Bucht gefunden. Sie wurden der Gattung *Diplostomum* zugeordnet. Die Zerkarien wurden bei Schlüpfversuchen im August und nochmals im Oktober nachgewiesen.

Plagiorchiidae: In *L. stagnalis* wurden Zerkarien aus drei genetisch weit entfernt verwandten Clades innerhalb der Plagiorchiidae nachgewiesen (Clades P1, P2, P3). Aus *Radix* spp. konnte hingegen nur Zerkarien des Clade P2 und aus *Stagnicola* sp. nur solche aus Clade P3 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis gibt Hinweise auf die Wirtsspezifität der Arten/Clades.

Echinostomatidae: Innerhalb der Echinostomatidae wurden vier Clades unterschieden, welche teilweise eine unterschiedliche Wirtsspezifität aufweisen: Während Clade E2 (vermutlich *Echinoparyphium*) in allen drei Zwischenwirtsarten (*L. stagnalis*, *Radix* spp. und *Stagnicola* sp.) nachgewiesen wurde, war Clade E4 nur in *L. stagnalis*, Clade E3 (vermutlich *Echinostoma*) nur in *Radix* spp. und Clade E1 nur in *Stagnicola* sp. zu finden. Clade 4 wurde nur in Museumsmaterial gefunden, während die anderen drei Clades sowohl Sequenzen aus frisch gesammeltem als auch aus Museumsmaterial enthalten.

Abbildung 4 zeigt die Zwischenwirte (*Lymnaea stagnalis*, *Radix* spp., *Stagnicola* sp. und *Galba truncatula*) und die in ihnen gefundenen Zerkarien.

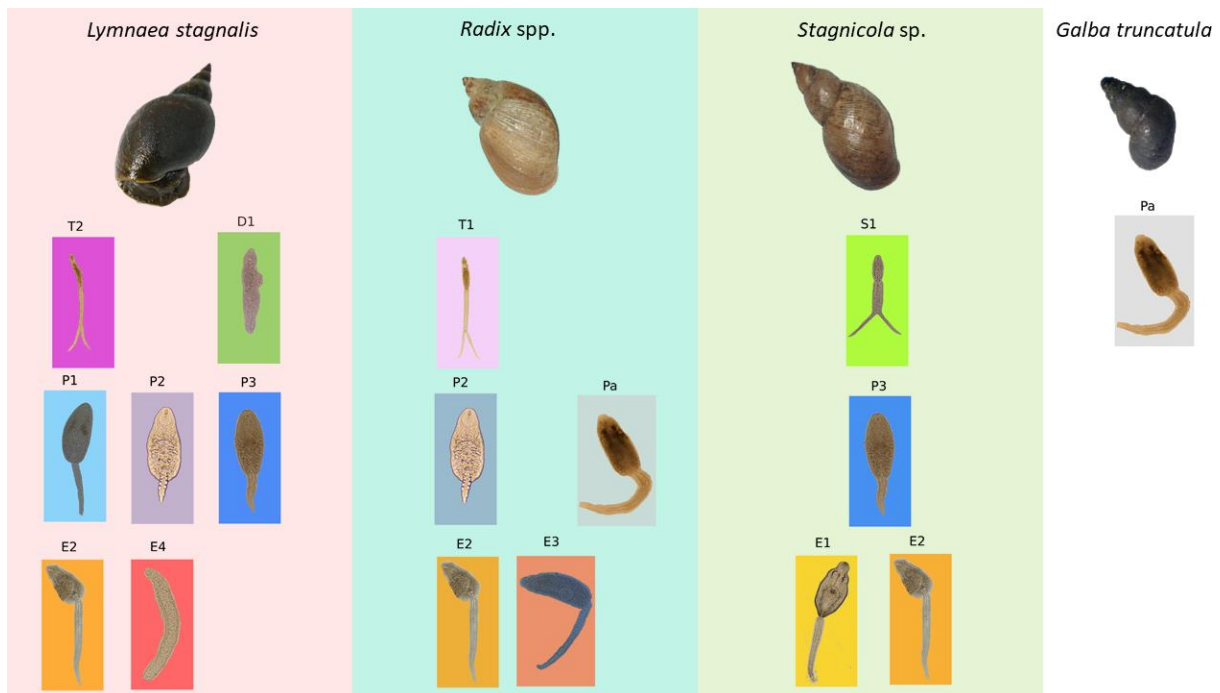


Abbildung 4. Zwischenwirte (*Lymnaea stagnalis*, *Radix* spp., *Stagnicola* sp. und *Galba truncatula*) und die in ihnen gefundenen Zerkarien mit den entsprechenden Clades. Zerkarien-Proben aus *G. truncatula* standen nur als Museumsmaterial zur Verfügung und wurden für das vorliegende Projekt nicht gesammelt.

In der Analyse des *nd1*-Markers konnten fünf der im *COI*-Baum dargestellten Clades dargestellt werden (Abbildung 5). Dieses Markergen wurde eingesetzt, um die taxonomische Zuordnung zu verbessern, da es hier weit mehr Sequenzen in der GenBank gibt. Die Familie Echinostomatidae ist im *nd1*-Baum mit drei Clades (E2, E3 und E4) vertreten, während aus Vertretern von Clade E1 keine *nd1*-Sequenz amplifiziert werden konnte. Aufgrund von bereits publizierten Referenzsequenzen wurde versucht, eine tentative Gattungszuordnung vorzunehmen. Hohe Ähnlichkeitswerte (>95%) mit den Vergleichssequenzen in der GenBank wurden dabei als relevant eingestuft. Die Vergleiche legen nahe, dass Clade E2 der Gattung *Echinoparyphium* entspricht und Clade E3 der Gattung *Echinostoma*. Allerdings gab es innerhalb von Clade E3 ebenfalls Sequenzen mit Übereinstimmungen mit der Gattung *Echinoparyphium*, was erneut aufzeigt, wie schwierig diese Taxa zu bestimmen sind und wie unverlässlich manche der derzeit in der GenBank vorhandenen Daten noch sind. Für die einzelne *nd1*-Sequenz aus Clade E4 konnte keine Gattungszuordnung getroffen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass das auf Echinostomatidae zugeschnittene *nd1*-Primerpaar in den meisten aber nicht allen Vertretern dieser Familie erfolgreich einsetzbar ist, während es in Vertretern anderer Familien erfolgreich amplifizierte. Für Clade E4 sowie auch für Clade P1 der Familie Plagiorchiidae konnte jeweils nur eine Sequenz generiert werden. *Paramphistomum* (Pa) ist mit *COI*-Baum sowie auch im *nd1*-Baum mit einem einzelnen Clade vertreten. Umfassendere morphologische Untersuchungen gekoppelt mit genetischen Analysen sind notwendig, um eine eindeutige (morphologische und genetische) Zuordnung dieser schlecht untersuchten Gruppe zu ermöglichen.

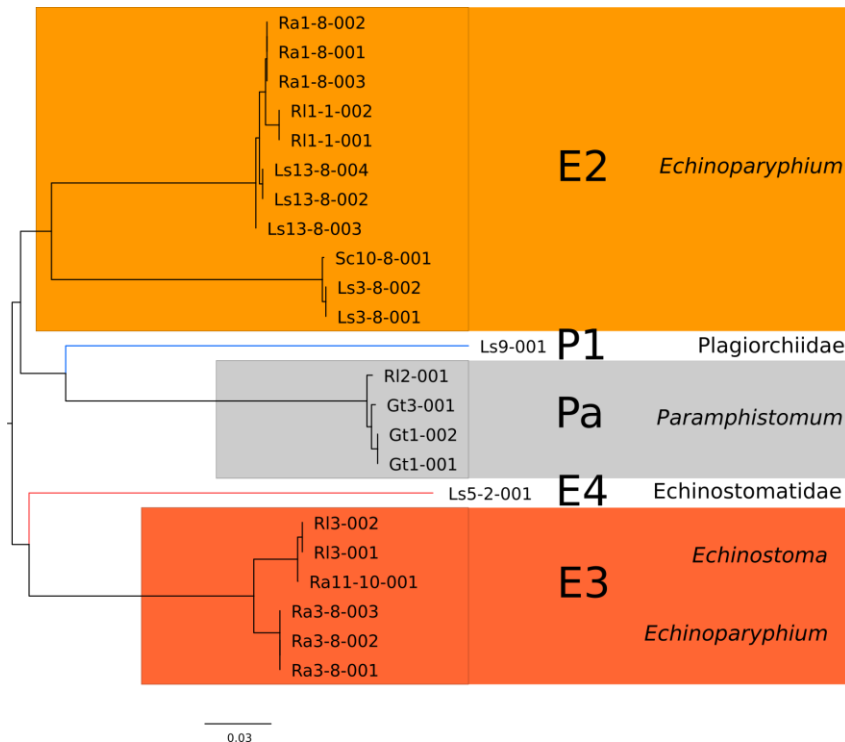


Abbildung 5. Phylogenetischer Baum (Neighbour-Joining-Baum) basierend auf *nd1*-Gensequenzen und die aus dem Vergleich mit GenBank-Sequenzen abgeleitete tentative Bestimmung. Die Farben entsprechen den Farben der Clades des *COI*-Baumes. In Vertretern von Clade E1 konnte die *nd1*-Sequenz nicht amplifiziert werden. Clade E1 ist daher in diesem Baum nicht vertreten.

3.2. DNA-Barcode-Referenzsequenzen von Süßwassermollusken

Insgesamt wurden elf gesammelte Wasserschnecken im Rahmen des Projektes genetisch untersucht (*COI*-Sequenz), wobei für ein Individuum von *Lymnaea stagnalis* aufgrund schlechter Fixierung kein positives Ergebnis erzielt werden konnte. Die Mollusken, für welche positive DNA-Ergebnisse vorliegen, wurden mit noch nicht veröffentlichten *COI*-Sequenzen aus Österreich, die im Rahmen des Projektes "ABOL Mollusken" generiert worden waren, verglichen. Die in Oberösterreich gesammelten Individuen sind genetisch eindeutig den jeweiligen Taxa zuzuordnen, wobei zu bemerken ist, dass die verschiedenen Arten der Gattung *Stagnicola* morphologisch sehr variabel und auch genetisch nicht eindeutig unterscheidbar sind. Die Taxonomie der Arten wird diskutiert und eine Revision der Gattung ist ausständig. Dementsprechend bezeichnen wir hier alle *Stagnicola*-Individuen mit *Stagnicola* sp. Im Phylogramm (Abbildung 6) sind die untersuchten Individuen in den entsprechenden Clades positioniert.

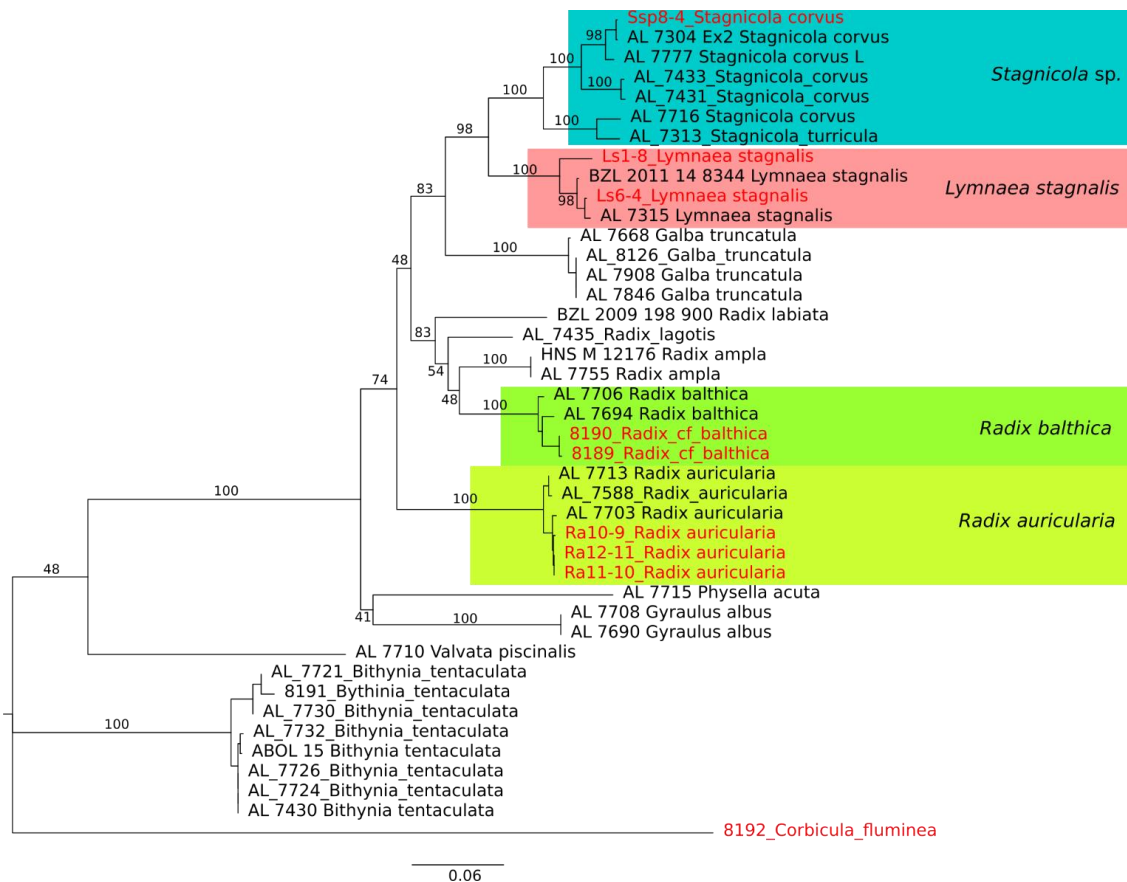


Abbildung 6. Phylogenetischer Baum (Neighbour-Joining-Baum) basierend auf *COI*-Gensequenzen mit Vertretern von Süßwassermollusken, die als Haupt-Zwischenwirte in Frage kommen (*Stagnicola* sp., *Lymnaea stagnalis* und *Radix* spp.). Weitere Sequenzen österreichischer Mollusken aus den entsprechenden Arten bzw. anderer verwandter Arten wurden inkludiert. Individuen, die in dieser Studie untersucht wurden, sind rot markiert. Die Muschel *Corbicula fluminea*, die ebenfalls im Rahmen dieses Projektes gesammelt und sequenziert wurde, dient als Außengruppe.

3.3. eDNA-Ansatz zum Nachweis von Zerkarien

Eine Übersicht über die eDNA-Proben und die Ergebnisse gibt Tabelle 6.

Für die Etablierung der eDNA zum Nachweis von Trematoden wurden einerseits 18S-Markersequenzen verwendet, da die universellen Primer sehr gut binden und zum generellen Nachweis von Trematoden sehr geeignet sind. Damit ist ein sicheres, positives Ergebnis zu erwarten, sollte intakte DNA von Trematoden im Wasser enthalten sein. Des Weiteren wurden artspezifische eDNA-Primer für ein kurzes Stück des *COI*-Markers für drei Arten der Gattung *Trichobilharzia* (*T. franki*, *T. szidati* und *T. regenti*), die potenziell im Untersuchungsgebiet vorkommen können, entwickelt und an DNA-Proben von *T. franki* erfolgreich getestet (252 bp). Der nächste Schritt wäre, diese Primer an eDNA-Aquarium-Proben, in welchen nachweislich *Trichobilharzia* sp. geschlüpft sind, zu testen. Die Primer wurden an allen extrahierten eDNA-Proben getestet, allerdings konnte in keiner der Proben erfolgreich *Trichobilharzia* spp. nachgewiesen werden.

Bei den Tests der eDNA-Proben mit den 18S-Primern waren alle vier Proben (eine mit Wasser aus Aquarium, drei Freiland-Probenstellen) positiv. Sowohl bei der Aquariumprobe, als auch bei einer Gewässerprobe konnte die Familie Echinostomatidae nachgewiesen werden. Die beiden anderen Gewässerproben enthielten Mischsequenzen und waren somit nicht einwandfrei lesbar, konnten jedoch eindeutig als Trematodensequenzen identifiziert werden.

3.4. eDNA-Ansatz zum Nachweis von Mollusken

Für den Nachweis von Mollusken-eDNA wurde ein Primer für das *COI*-Gen konstruiert (ZDOE-Moll-fw), der spezifisch in den Arten bindet, die als Zwischenwirt dienen und möglichst andere Arten ausschließt. Er wurde in Kombination mit dem Primer (HCO2198_ABOL_Moll_1) eingesetzt (395 bp). In einer Test-PCR wurde DNA von verschiedenen Schneckenarten getestet: *Stagnicola* sp., *Lymnaea stagnalis*, *Radix auricularia* (die potenziellen Zwischenwirte von *Trichobilharzia*) waren positiv. Ebenfalls positiv war *Planorbarius corneus* (Zwischenwirt von *Bilharziella polonica*), während *Galba truncatula*, *Planorbis carinata*, *Planorbis planorbis*, *Anisus spirorbis* und *Anisus vorticulus* negativ waren. Die DNA für die Test-PCR stammt von Referenz-Individuen des ABOL Mollusken Projektes.

Bei der PCR der eDNA-Proben mit den Molluskenprimern war die Probe 2 (Wasser aus Aquarium, Tabelle 6) positiv. Die Bande wurde aus dem Gel eluiert und kloniert. Dieser Vorgang ist notwendig, da der Primer in verschiedenen Molluskenarten binden kann und dementsprechend bei einer Direktsequenzierung eine Mischsequenz aus verschiedenen Arten (die im Aquarium präsent waren) erwartet werden kann. Diese kann dann nicht eindeutig gelesen werden. Anhand der 26 sequenzierten Klone konnten *Lymnaea stagnalis* (11 Klone) und *Stagnicola* sp. (15 Klone) nachgewiesen werden, nicht aber *Radix balthica*. Möglicherweise war die Konzentration der DNA von *Radix balthica* (nur 1 Individuum im Aquarium) im Vergleich zu den anderen beiden Arten im Wasser nicht hoch genug und ist dementsprechend in der kompetitiven PCR Reaktion nicht amplifiziert worden. Der eDNA-Primer bindet nicht in den anderen Arten, die sich im Aquarium befunden haben (*Bithynia tentaculata*, *Physella acuta*). Erwartungsgemäß wurde auch keine DNA-Sequenz dieser Arten unter den klonierten Sequenzen gefunden. Die zwei Freiland-eDNA-Proben zeigten kein eindeutiges PCR-Produkt im Agarosegel, sondern nur einen „Smear“, demnach konnten aus diesen Proben keine Sequenzen generiert werden. Eine weitere Optimierung der PCR-Bedingungen ist notwendig, um erfolgreich die Wirtsarten aus Freilandproben nachweisen zu können.

Tabelle 6. Gesammelte eDNA Proben. Herkunft: Bezieht sich entweder auf Probennahme im Freiland (Wasserprobe) oder auf Herkunft der Mollusken, die für Positivkontrollen im Aquarium gehalten wurden. Datum: Bei Freiland-Wasserproben – Datum der Probennahme; bei Wasserproben aus Aquarium – Datum der Probennahme aus dem Aquarium. Erwartete Taxa: bei Freiland-eDNA-Proben – häufig gesichtete Molluskenarten bzw. geschlüpfte Trematoden; bei eDNA-Proben aus Aquarium – im Aquarium vorhandene Arten (Mollusken, Trematoden); n.a. = nicht analysiert.

Herkunft Wasserprobe/ Mollusken (Datum)	Probe	Datum	Erwartete Taxa	Nachgewiesen mittels eDNA
Unterer Inn, Reichersberger Au	eDNA Aquarium	29.05.2019	Trematoda: <i>Echinostomatidae</i> Mollusca: <i>Stagnicola</i> sp.	n.a.
Unterer Inn, Reichersberger Au	eDNA Aquarium	04.06.2019	Trematoda: <i>Echinostomatidae</i> Mollusca: <i>Lymnaea stagnalis</i> <i>Stagnicola</i> sp. <i>Radix balthica</i> <i>Bithynia tentaculata</i> <i>Physella acuta</i>	Trematoda: COI negativ 18S <i>Echinoparyphium</i> sp. Mollusca: COI <i>Lymnaea stagnalis</i> COI <i>Stagnicola</i> cf <i>corvus</i>
Mühlheim a. Inn, Mühlheimer Lacke	eDNA Gewässer	01.08.2019		n.a.
Seeleithensee	eDNA Gewässer	01.08.2019		n.a.
Ausee	eDNA Gewässer	07.08.2019		n.a.
Ausee	eDNA Aquarium	07.08.2019	Trematoda: tent. Plagiorchiidae	Trematoda: COI negativ
Kronstorf, Schwimmteich Prack	eDNA Gewässer	07.08.2019		n.a.
Pleschingersee	eDNA Gewässer	07.08.2019		n.a.
Oedtersee	eDNA Gewässer	07.08.2019		n.a.
Pichlingersee	eDNA Gewässer	19.08.2019		Trematoda: COI negativ 18S Mischsequenz Mollusca: smear
Unterer Inn, Hagenauer Bucht	eDNA Gewässer	19.08.2019	Trematoda: <i>Trichobilharzia</i> <i>Echinostomatidae</i>	Trematoda: COI negativ 18S <i>Echinoparyphium</i> sp. Mollusca: smear
Unterer Inn, Hagenauer Bucht	eDNA Gewässer	19.08.2019	Trematoda: <i>Trichobilharzia</i> <i>Echinostomatidae</i>	n.a.
Unterer Inn, Hagenauer Bucht	eDNA Aquarium	20.08.2019	Trematoda: <i>Diplostomum</i> sp. <i>Echinostomatidae</i> Mollusca: <i>Lymnaea stagnalis</i>	n.a.

4. Diskussion/Interpretation

Methodisch stützte sich das Projekt auf vier Schwerpunkte: (1) DNA-Analyse von Museumsmaterial zum Testen der Primer und zum Generieren von DNA-Barcode-Referenzsequenzen, (2) Etablieren und Testen von PCR-Primern für Zerkarien und deren Wirtsschnecken, (3) DNA-Analyse von Material aus dem Freiland (Schnecken zum Testen der Primer und zum Generieren von DNA-Barcode-Sequenzen, eDNA zum Nachweis von Schnecken / Zerkarien), (4) DNA-Analyse von Aquarium-Proben (Zerkarien, eDNA zum Nachweis von Schnecken / Zerkarien).

4.1. DNA-Barcode-Sequenzen und Primer-Design

4.1.1. Trematoden

Es wurden DNA-Barcode-Sequenzen von Vertretern aus sechs Trematoden-Familien (elf Gattungen) ermittelt. Auf der Basis der im Zuge des Projekts isolierten DNA-Barcode-Referenzsequenzen konnten spezifische Primer entworfen werden, die in der Folge getestet wurden. Das Testen und Etablieren der PCR-Primer verlief sehr erfolgreich, es steht uns nun eine Palette von PCR-Primern für drei Gene zur Verfügung. Ein Nachteil war, dass nicht alles Museumsmaterial bis auf Artebene bestimmt war. Weiters sind die in der GenBank vorhandenen Vergleichssequenzen (verschiedener Gene) ebenfalls größtenteils nicht bis auf Artebene bestimmt. Darüber hinaus erscheinen manche Bestimmungen der GenBank-Sequenzen zweifelhaft. Dies zeigt, welcher langwieriger Prozess es ist, gute DNA-Barcode-Sequenzen mit verlässlich bestimmten Referenzindividuen zu verknüpfen. Für die im Zentrum des Projekts stehenden *Trichobilharzia*-Arten konnten wir jedoch von mehreren Individuen DNA-Referenzsequenzen erstellen und gemeinsam mit publizierten Sequenzen als Grundlage für das Primer-Design für die eDNA verwenden.

4.1.2. Mollusken

Die für den Nachweis von Mollusken-eDNA (Zwischenwirte) konstruierten PCR-Primer für das *COI*-, erwiesen sich im Test mit Positivkontrollen der Arten *Stagnicola sp.*, *Lymnaea stagnalis*, *Radix auricularia* (die potenziellen Zwischenwirte von *Trichobilharzia*) als sehr selektiv. Nur *Planorbis corneus* war ebenfalls positiv, während *Galba truncatula*, *Planorbis carinata*, *Planorbis planorbis*, *Anisus spirorbis* und *Anisus vorticulus* negativ waren. Die Detektion von *Planorbis corneus* ist jedoch als Zwischenwirt von *Bilharziella polonica* nicht unbedeutend.

In den Aquarienproben konnten nur zwei der drei erwarteten Schneckenarten nachgewiesen werden. Dass *Radix auricularia*, welche sich ebenfalls im Aquarium befand, nicht in der eDNA detektiert werden konnte, könnte daran gelegen sein, dass *L. stagnalis* und *Stagnicola sp.* in größerer Anzahl vorhanden waren. Das Ergebnis ist vielversprechend, bis dato kamen eDNA-Analysen von Mollusken primär zum Nachweis invasiver Arten bzw. bedrohter Muscheln zum Einsatz (Belle et al. 2019) dies jedoch sehr erfolgreich. Mit dem in diesem Projekt entwickelten Ansatz besteht die Möglichkeit mehrere Arten gleichzeitig nachzuweisen, da der „forward-Primer“ nur in den gewünschten Zwischenwirt-Arten bindet. Das im derzeitigen Projekt amplifizierte DNA-Stück könnte für manche eDNA-Proben zu lang sein (395 bp), da in eDNA-Proben die DNA meist fragmentiert

vorliegt. Als nächster Schritte sollte ein passender „reverse Primer“ entwickelt werden, der ein noch kürzeres Stück amplifiziert (und damit die Erfolgsquote erhöht). Es wäre natürlich wünschenswert, einzelne Arten mit spezifischen Primern selektiv detektieren zu können. Dies ist bei Mollusken besonders schwierig, da die Variation im *COI*-Gen sehr hoch ist und ein nicht erwünschtes Amplifizieren von anderen Arten schwer auszuschließen ist. Weitere Sequenzvergleiche sollten die Frage klären, ob eine weitere Spezifizierung (Artspezifität) durch eine Kombination aus zwei PCR-Reaktionen ("nested PCR") erreicht werden kann.

Insgesamt sind die im Zuge des Projekts gewonnenen Ergebnisse von besonderem Wert, da sie erstens den Grundstein für die weitere Etablierung eines eDNA-Nachweisverfahrens der Wirtsarten (möglicherweise auch für Metabarcoding im "high throughput sequencing"-Verfahren) legten und zweitens weitere DNA-Barcode-Referenzsequenzen für Oberösterreich ermittelt wurden, die in die ABOL-Datenbank übernommen werden.

4.2. Im Untersuchungsgebiet nachgewiesene Mollusken und Zerkarien

Zahlreiche Schneckenarten konnten im Untersuchungsgebiet nachgewiesen werden, Schwerpunkt der Aufsammlungen waren die als Zwischenwirt besonders relevanten Arten der Gattungen *Lymnaea*, *Radix* und *Stagnicola* (Tabelle 3). Weiteres Augenmerk sollte auch auf *Planorbarius* gerichtet sein. In den untersuchten Prosobranchiern (Deckelschnecken) sowie in *Physella acuta*, konnten keine Trematoden-Stadien nachgewiesen werden. In den untersuchten Lymnaeiden wurde eine reiche Zerkarienfauna gefunden, darunter zwei *Trichobilharzia* Arten sowie Vertreter anderer Familien. Aufgrund der Zwischenwirtspräferenzen und der Häufigkeit in naturnahen Badegewässern sind *Lymnaea stagnalis*, *Radix auricularia* und *Radix balthica*, die Schnecken, die das größte Potential als Verursacher einer Zerkariendermatitis darstellen. Arten der Gattung *Stagnicola* und andere seltene Arten mit speziellen Ansprüchen an den Lebensraum sind bezüglich der Zerkariendermatitis wohl von untergeordneter Bedeutung (Horák P & Kolářová 2011). Die eingangs gestellte Frage, ob das Risikopotential von Badermatitis auch am Vorkommen von bestimmten Schneckenarten festgemacht werden kann, kann wohl vorsichtig mit ja beantwortet werden. Der Nachweis der Wirtsarten mit eDNA bedarf jedoch weiterer Optimierung, und ein Nachweis der Wirtsarten bedeuten nicht zwangsläufig das Vorkommen der entsprechenden Trematoden. Die Häufigkeit der Trematodenarten in (Wasser)vögeln ist noch nicht gut untersucht. Ein gut funktionierendes System zum Nachweis von Wirtsarten und Zerkarien über eDNA würde umfassende Erhebungen über die Verbreitung der Erreger ermöglichen.

Neben der Gattung *Trichobilharzia* (Clades T1 + T2), wurden in den im Rahmen des Projekts gesammelten Schnecken die Gattungen *Echinoparyphium* (Clades E1, E2), *Echinostoma* (E3), *Diplostomum* (D1)) sowie vermutlich drei Arten der Familie Plagiorchiidae (P1, P2, P3) detektiert. Aufgrund der bereits erwähnten morphologischen Ähnlichkeiten war die Artzuordnung für alle Zerkarien, ausgenommen *Trichobilharzia franki*, *Trichobilharzia szidati* sowie *Echinostoma revolutum*, unsicher. Nur mittels Sequenzen von sicher bestimmten Adulttieren könnten die DNA-Barcodes eindeutig der entsprechenden Art zugeordnet werden, was die Bestimmung in zukünftigen Studien erleichtern würde, da es für fast alle in Österreich detektierten Arten keine publizierten Referenzsequenzen gibt. Von den gefundenen Zerkarien können die beiden Arten *T. franki* und *T. szidati*, die in Vögeln parasitieren, Erreger der Zerkariendermatitis beim Menschen und bei Tieren

sein (Auer & Aspöck 2002). Weitere Arten von Schistosomatiden, die für das Gebiet durchaus erwartet werden können (siehe Einleitung), wurden im Zuge der Studie nicht detektiert.

Neben den Arten der Gattung *Trichobilharzia*, sind auch Vertreter der anderen im Freiland gefundenen Familien (veterinär)medizinisch relevant. Arten der Gattung *Echinostoma* und *Echinoparyphium* parasitieren im Darm von Vögeln und Säugern, einschließlich des Menschen (Fried et al. 2004). Die adulten Würmer verursachen Darmentzündungen (Auer & Aspöck 2014). Arten der Gattung *Diplostoma* parasitieren in Vögeln, erste Zwischenwirte sind Wasserschnecken, zweite Zwischenwirte Fische. Bei Fischen siedeln sich die Metazerkarien in den Augen an und verursachen Verhaltensänderungen und bakterielle Ko-Infektionen. Die Familie Plagiorchiidae beinhaltet zahlreiche Arten, die in verschiedenen Wirbeltieren parasitieren. Häufig werden in den heimischen Wasserschnecken Arten gefunden, die Amphibien als Endwirte nutzen (Sattmann & Hörweg 2005). Arten der Gattung *Paramphistomum* (im Rahmen der Untersuchung aus Museumsmaterial analysiert) bewohnen die Pansen von Wiederkäuern und können schwere Darmerkrankungen (z.B. bei Rindern) verursachen (Eckert et al. 2008). Die gefundenen Zerkarien sind nicht nur Trematoden-Arten von medizinischer und ökonomischer Bedeutung, sie repräsentieren auch einen Teil der ökologisch bedeutenden Biodiversität im Lebensraum.

4.3. Stimmen die PCR-Ergebnisse aus Gewässerproben mit den Schlüpfversuchen überein?

Zerkarien-DNA konnten mittels *18S*-Primern nachgewiesen werden, sowohl in den Aquarium-Proben, als auch in den Freilandproben. In beiden Fällen war die nachgewiesene Art *Echinoparyphium* sp. auch mittels Schlüpfversuchen detektiert worden. Da *18S*-Primer allerdings zu unspezifisch sind, um auf Artniveau eine Bestimmung zu ermöglichen, war es das Ziel, zumindest für Dermatitis auslösende Trematoden *COI* Primer zu designen. Diese Primer wurden erfolgreich an Positivkontrollen (DNA direkt von einem Individuum entnommen) getestet. Der nächste Schritt wäre, diese Primer ebenfalls an Aquarium-Proben zu testen, in welchen *Trichobilharzia* spp. nachgewiesen vorkommen. Damit ist es dann möglich abzuschätzen, wie spezifisch diese Primer binden und ihre Eignung für das Freiland zu evaluieren.

Zu diskutieren ist die eDNA-Probe von Hagenau, Unterer Inn (vom 19.08.2019), wo in den Schlüpfversuchen nicht näher bestimmbare Echinostomatidae sowie *Trichobilharzia* sp. gefunden wurden. Die Tatsache, dass mit den *18S*-Primern *Echinoparyphium* sp. detektiert wurde, während mit den *COI*-Primern kein positives Ergebnis erzielt wurde, kann einerseits darin begründet sein, dass die Primer noch optimiert werden müssen, oder, dass die Wirtschnecken an anderen Stellen im Gewässer entnommen wurden, als die eDNA-Proben. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, Versuche zur Sensitivität des eDNA Ansatzes durchzuführen. Eine derartige Untersuchungsreihe würde Voraussetzungen für die Anwendung der Methode im Freiland klarer definieren. Hier könnte ein experimenteller Ansatz unter naturnahen Bedingungen und parallel dazu Verdünnungsreihen angedacht werden.

Schlussbemerkungen

Beide Ziele der vorliegenden Studie wurden erreicht. DNA-Barcodes von Mollusken und Trematoden wurden generiert und ermöglichen den genetischen Nachweis der behandelten Arten. Die Grundlagen für einen eDNA-Ansatz zum Nachweis von in Österreich vorkommenden Arten der Gattungen *Trichobilharzia* und *Bilharziella* und ihrer Zwischenwirte wurden erarbeitet. Ein eDNA Nachweis ist nunmehr grundsätzlich möglich, die Methode bedarf jedoch noch einiger Verfeinerungen und muss noch im Freiland getestet werden. Aus diesem Grund sollte ein Folgeprojekt die Methodenoptimierung und die Evaluierung der Sensitivität des eDNA Ansatzes zum Ziel haben. Wenn die Anwendung für einen seriösen Nachweis und für ein Warn/Entwarnsystem aussichtsreich erscheint, kann auf der vorhandenen Basis ein effizientes Protokoll entwickelt werden.

Literatur

- Auer H & Aspöck H 2002 „Vogelbilharzien“ als Erreger einer Hautkrankheit: die Zerkariendermatitis. — In: ASPÖCK H. (Hrsg.), Amöben, Bandwürmer, Zecken... Parasiten und parasitäre Erkrankungen des Menschen in Mitteleuropa. *Denisia* 6:321-331.
- Auer H & Aspöck H 2014 Helminths and helminthoses in Central Europe: general overview and diseases caused by trematodes (flukes). — *Wiener Medizinische Wochenschrift* 164: 405–413.
- Belle C C, Stoeckle BC & Geist J 2019. Taxonomic and geographical representation of freshwater environmental DNA research in aquatic conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(11), 1996–2009. doi: 10.1002/aqc.3208
- Duda M, Schindelar J, Macek O, Eschner A, Kruckenhauser L 2017 First record of *Trochulus clandestinus* (Hartmann, 1821) in Austria (Gastropoda: Eupulmonata: Hygromiidae). *Malacologica Bohemoslovaca* 16, 37–43.
- Dvorak J, Sattmann H, Horak P, Konecny R 1999 Bird schistosomes from freshwater snails in Austria, with some notes on current problems (Digenea, Schistosomatidae). *Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie* 21: 69-76
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P 2008 Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 2., vollständig überarbeitete Auflage. Enke-Verlag, 2008.
- Fried B, Graczyk TK & Tamang L 2004: Food-borne intestinal trematodiasis in humans. *Parasitology Research* 93: 159–170. DOI 10.1007/s00436-004-1112-x
- Führer HP, Silbermayr K, Glawischnig W & Joachim A 2015 Barcoding parasitischer Würmer – eine Sammlung ungeliebter Tiere? Das Fallbeispiel *Onchocerca jakutensis*. *Acta ZooBot Austria* 152, 2015, 173–178
- Gaub L 2014 Molecular species determination of larval Digenea as basis for reliable epidemiological analyses, enhanced biodiversity data and significant medical risk assessments. Master Thesis, University of Vienna; 111pp.
- Gräfe G, Aspöck H & Picher O 1973 Auftreten von Bade-Dermatitis in Österreich und Möglichkeiten ihrer Bekämpfung. — *Zentralbl. Bakt. Hyg. I. Orig.A* 225: 398–405.



- Hörweg C, Sattmann H, Auer H 2006 Cercarial dermatitis in Austria: Questionnaires as useful tools to estimate risk factors? Wiener Klinische Wochenschrift 118 [Suppl 3]: 77-80.
- Hörweg C & Sattmann H 2014 Demonstration: watersnails, cercarial release experiments, cercariae. Wiener Klinische Wochenschrift 126 (Suppl.1): S 73.
- Hohensee N 2016 Digenean trematodes in freshwater snails in the surroundings of Vienna with a focus on species involved in human infections. Master thesis, University of Vienna; 104pp.
- Horák P & Kolářová L 2011 Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. — Freshwater Biology 56: 779–790.
- Kearn GC 1998 Parasitism and the Platyhelminths. — Chapman & Hall, London: 544 pp.
- Kolářová L 2007: Schistosomes causing cercarial dermatitis: a mini-review of current trends in systematics and of host specificity and pathogenicity. Folia Parasitologica 54: 81–87.
- Konecny R, Dvorak J, Horak P, Sattmann H 1999 Zerkarien von Süßwasserschnecken in Ost-Österreich. Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie 21: 77-82
- Kruckenhauser L, Eschner A & Duda M 2016 ABOL Mollusken – Barcoding im Schneckentempo? Acta ZooBot Austria 153, 2016, 169–171
- Sattmann H, Hörweg C, Konecny R 2004 Zerkariendermatitis in Österreich – Rückblick und Perspektiven. Denisia 13: 457-461
- Sattmann H & Hörweg C 2005 Untersuchung zur Messung der Befallsrate der Leberegelschnecke *Galba truncatula* mit dem Amerikanischen Riesenleberegel *Fascioloides magna* im Nationalpark Donauauen. Studie im Auftrag des NP Donau-Auen und des NÖ Landesjagdverbandes. 39pp.
https://infothek.donauauen.at/fileadmin/infothek/2_wissenschaft/publikationen/22_forschung_monitoring_berichte_karten/436_fascioloidesendberichtnhmfeb06.pdf
- Sattmann H & Hörweg C 2019 Schnecken als Zwischenwirte von parasitischen Würmern. Denisia 42: 555-566.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Gewässerschutzberichte Oberösterreich und Wassergüteatlasse Oberösterreich](#)

Jahr/Year: 2019

Band/Volume: [91](#)

Autor(en)/Author(s): Duda Michael, Haring Elisabeth, Hörweg Christoph, Kruckenhauser Luise, Reier Susanne, Sattmann Helmut, Szucsich Nikolaus U.

Artikel/Article: [Pilotstudie zum Nachweis von Zerkarien-Dermatitis-Erregern in OÖ Badeseen mittels DNA-Barcoding 1-29](#)