©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Wissenschaft

Österreichs Fischerei 70. Jahrgang Seite 175 – 185

Mit eDNA den Fischen auf der Spur

Bettina Thalinger | Michael Traugott
Arbeitsgruppe für angewandte und trophische Ökologie, Institut für Ökologie, Universität Innsbruck, Technikerstraße 25, 6020 Innsbruck

Josef Wanzenböck
Forschungsinstitut für Limnologie Mondsee, Universität Innsbruck, Mondseestraße 9, 5310 Mondsee

Christian Moritz | Richard Schwarzenberger
ARGE Limnologie GesmbH, Hunoldstraße 14, 6020 Innsbruck

Abstract

Environmental DNA (eDNA) allows to detect aquatic organisms from water samples via small fragments of tissue and cells which are constantly released by aquatic organisms into the surrounding waterbody. In the past decade this method has been found to be a viable resource to molecularly examine fish in diverse ecosystems independent of season and runoff situation. eDNA allows tracking of the presence and density of certain fish species as well as the total aquatic diversity at a sampling point. Even though the method is simple to explain, its successful application depends on appropriate choices of sampling strategy, DNA extraction and species identification. Hence, multiple studies addressed methodological issues and identified factors which potentially bias the generated results. Within the FFG project »eDNA-AlpFisch«, we address specific issues such as appropriate sampling protocols, runoff, turbidity, detection distance from the fish, correlation with biomass and differences in eDNA-shedding rates between Alpine fish species. By obtaining insights into the interactions between these factors and the detectability of fish-eDNA, the broad applicability of this method will be ensured in the near future. eDNA analysis thus can be used to track species distribution and its seasonal changes and provide a new approach for the management of fish populations in stagnant and flowing waters.

Was ist eDNA?

Organismen geben konstant Zellen und Zellbestandteile an ihre Umgebung ab. Dadurch ist es möglich, molekulare Spuren ebendieser in Umweltproben aus dem Boden, der Luft und dem Wasser nachzuweisen, ohne dass die Organismen selbst Teil der gewonnenen Probe sind. Diese frei in der Umwelt vorliegenden Spuren des Erbgutes (DNA) werden als Umwelt-DNA (englisch: »environmental DNA«, kurz: »eDNA«) bezeichnet (Thomsen *et al.* 2012b). Im konkreten Fall von Fischen kann es sich bei der DNA-Quelle um Schuppen, Schleim der Fischoberfläche, Kiemenzellen, Zellen des Darmepithels, die mit dem Kot

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Abb. 1: *Wasserprobenahme für eDNA-Analysen.* © Thalinger

ausgeschieden werden, oder auch Fischkadaver handeln. Fisch-DNA wird so an das Umgebungswasser abgegeben und ermöglicht den molekularen Nachweis dieser Organismen anhand von Wasserproben (Thomsen *et al.* 2012b, *Abb. 1*).

Molekulare Methodik mit großem Potential

Die erste wissenschaftliche Publikation, welche den Nachweis aquatischer Wirbeltiere mittels Wasserproben zeigte, stammt von Ficetola *et al.* (2008) und behandelt die molekulare Detektion von DNA des Amerikanischen Ochsenfrosches (*Rana catesbeiana*) in Teichwasserproben. Seit dieser ersten Veröffentlichung ist das Interesse am eDNA-Ansatz und damit auch die Zahl der wissenschaftlichen Publikationen stark angestiegen. Aktuell (Abfrage 31. 5. 2017) gibt es 85 Publikationen in referierten wissenschaftlichen Journalen, die sich nur mit dem Thema Fisch-eDNA auseinandersetzen (*Abb. 2*).

Dieses enorme wissenschaftliche Interesse lässt sich einerseits durch das Potential der Methode für den Nachweis von Fischbeständen in marinen und limnischen Ökosystemen und andererseits durch rasante technische Entwicklungen und großen methodischen Optimierungsbedarf (siehe unten) erklären. Herkömmliche Fischbestandsaufnahmen werden in heimischen Binnengewässern meist durch Elektrobefischungen sowie Netzfänge (stehende Gewässer) durchgeführt und werden, auch bei bundesweit festgelegten Standards, von Faktoren wie Leitfähigkeit, Gewässertiefe, Beschaffenheit des Gewässergrundes, Strömungsgeschwindigkeit, Trübe und Maschenweite wesentlich beeinflusst. Hinzu kommt, dass diese Befischungen nur in einem relativ kleinen Zeitfenster außerhalb von Laichzeiten und der Winterruhe bestimmter Fischarten, sowie im Fall von Fließgewässern bei Niedrigwasser, durchgeführt werden können. Abhängig von der Gewässertiefe und -oberfläche ist erheblicher Geräte- und Personalaufwand, einhergehend mit großen Kosten für derartige Fischbestandserhebungen, notwendig. Die Anzahl der Gewässer, die in dem gegebenen Zeitfenster bearbeitet werden können, ist daher aus zeitlichen und finanziellen Gründen begrenzt.

Der eDNA-Ansatz stellt für die Erfassung des Artenspektrums und semiquantitative Abschätzungen der relativen Artendominanz eine günstige und schnelle Alternative dar, da bei der Entnahme von Wasserproben nicht auf Schonzeiten Rücksicht genommen werden muss. Zudem können Beprobungen auch bei hohem Abfluss und Trübe durchgeführt werden. Die Effizienz des molekularen Ansatzes wurde bisher schon beim Nachweis von seltenen, gefährdeten Arten, wie z. B. dem Schlammpeitzger (*Misgurnus fossilis*), im Vergleich zu Elektrobefischungen und Reusenfängen belegt (Sigsgaard *et al.* 2015).

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

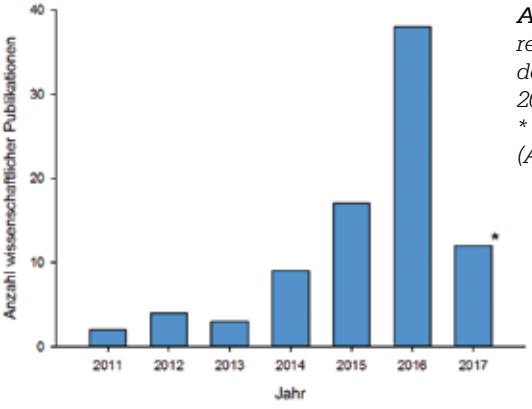

Abb. 2: *Anzahl der Publikationen in referierten wissenschaftlichen Journalen zu den Suchbegriffen »fish« und »eDNA« von 2011 bis 2017 (n = 85; Quelle: Web of Science). * Das Jahr 2017 ist bis inklusive April erfasst (Abfragedatum 31. 5. 2017).*

Hierbei zeigte sich, dass der eDNA-Ansatz nicht nur kosteneffizienter, sondern auch sensitiver war und somit zusätzliche von Schlammpeitzgern genutzte Habitate bestimmt werden konnten. Auch beim Vergleich mit Reusenfängen in Fließgewässern konnte der eDNA-Ansatz überzeugen, da sämtliche in den Reusen gefangenen Arten mittels eDNA-Analysen von Wasserproben bestätigt wurden (Shaw *et al.* 2016). Das im Laufe von 30 Jahren bei Netzbefischungen ermittelte Artenspektrum in drei großen englischen Binnengewässern konnte ebenfalls durch die molekulare Methodik erfasst werden, während eine zeitnah durchgeführte Netzbefischung lediglich 25 % des Fischartenspektrums detektierte (Hänfling *et al.* 2016). Schließlich überzeugte die eDNA-Analyse durch einen geringeren Beprobungsaufwand und eine Kostenreduktion um 67 % auch im direkten Vergleich zur qualitativen Elektrobefischung für den Nachweis von Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) (Evans *et al.* 2017).

Von der Wasserprobe zum Fischnachweis

Zunächst klingt die Herangehensweise bei eDNA-Analysen recht einfach: »Man nehme eine Wasserprobe, extrahiere die darin enthaltene DNA und weise diese den passenden Quellorganismen zu.« Doch im Laufe dieses Prozesses gibt es viele methodische Schritte, welche das Endergebnis stark beeinflussen können.

Bereits im ersten Schritt, der Probenahme, gibt es einige wichtige Aspekte zu berücksichtigen: zunächst kann der innerhalb eines Gewässers gewählte Ort den erfolgreichen Nachweis von Fischarten maßgeblich beeinflussen, wobei der artabhängig genutzte Lebensraum einer Fischart eine wichtige Rolle spielt. So konnten z. B. an tiefere Seeregionen angepasste Salmoniden bisher nicht in ufernah gewonnenen Wasserproben nachgewiesen werden (Hänfling *et al.* 2016). Auch wird die Nachweisbarkeit von Fischen besonders bei geringer Bestandsdichte wesentlich von der Anzahl der pro Stelle gewonnenen Wasserproben sowie deren Volumen bestimmt (Minamoto *et al.* 2016; Shaw *et al.* 2016; Turner *et al.* 2014). Schließlich ist auch zu bedenken, dass im Sediment größere Mengen an eDNA enthalten sein können und diese Umgebung eine DNA-Konservierung über viele Jahre ermöglicht (Turner *et al.* 2015). Demnach spiegelt die Sediment-eDNA nicht unbedingt die aktuelle Artenzusammensetzung wider, da manche Fischarten, bedingt durch saisonale Veränderungen wie z. B. Laichwanderungen, nicht mehr am Ort der Probenahme präsent sind. Bei der Beprobung ist daher eine Vermischung mit Sediment (z. B. durch Aufwirbeln des Untergrundes) tunlichst zu vermeiden.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Abb. 3: *Filtration von Wasserproben im Freiland im Rahmen des eDNA-AlpFisch Projektes um dem Abbau der eDNA in den Probenahme-Behältern entgegenzuwirken.* © Thalinger

Die Gewinnung der Zellverbände sowie freier DNA aus den Wasserproben erfolgt entweder durch Ausfällung mit Ethanol / Isopropanol, oder durch Filtration der Wasserproben. Bei der Ausfällungsmethode hat man zwar den Vorteil, die DNA im Feld und vor Ort mittels Alkohol zu konservieren, dazu können aber nur kleinere Wasservolumina im Milliliterbereich herangezogen werden (Doi *et al.* 2017b). Aus diesem Grund setzten wissenschaftliche Arbeiten in letzter Zeit zunehmend auf die Filtration von größeren Wasservolumina (z. B. Takahara *et al.* 2013; Wilcox *et al.* 2016; Yamanaka & Minamoto 2016). Faktoren, wie die Porengröße und das Filtermaterial in Abhängigkeit von der Trübe des beprobten Gewässers, standen dementsprechend im Fokus neuerer Untersuchungen (Minamoto *et al.* 2016; Rees *et al.* 2014; Spens *et al.* 2017; Turner *et al.* 2014). Unabhängig vom Filtertyp empfiehlt es sich jedenfalls, die Wasserproben schnellstmöglich zu bearbeiten (*Abb. 3*) und die Filter rasch einzufrieren, um einem DNA-Abbau vor der weiteren Bearbeitung im Labor entgegenzuwirken (Thomsen *et al.* 2012a; Yamanaka *et al.* 2016). Nicht zu vergessen ist auch eine entsprechende Sauberkeit und Sorgfältigkeit bei der Probenahme, um zu verhindern, dass die gewonnenen Proben durch DNA, welche sich an Gerätschaften und Ausrüstung befindet, verschmutzt werden.

Hat es die ausgefällte Wasserprobe bzw. der Filter letztendlich bis in ein speziell ausgestattetes Labor für molekulare Analysen geschafft, muss die DNA aus den in der Probe enthaltenen Zellverbänden freigesetzt werden. Dies geschieht mittels DNA-Extraktion. Auch hier gibt es neben vielen wissenschaftlich optimierten Extraktionsansätzen eine Vielzahl kommerzieller Kits, deren Effizienz sich deutlich unterscheidet (Eichmiller *et al.* 2016; Rees *et al.* 2014; Spens *et al.* 2017). Zusätzlich kann der Einsatz von Anti-Inhibitionskits notwendig sein, da bei standardmäßiger DNA-Extraktion nicht immer alle Substanzen, die eine weitere Bearbeitung der Proben im Labor behindern (z. B. Huminstoffe aus im Gewässer abgelagertem Laub), entfernt werden können (McKee *et al.* 2015).

Das fertige DNA-Extrakt enthält schließlich primär die aus der Wasserprobe gewonnene DNA, die nach einer Vervielfältigung durch Polymerase-Kettenreaktion (kurz: »PCR«) identifiziert werden kann. Da die DNA bzw. vom Organismus abgegebene Zellverbände in einem Gewässer ständigen Abbauprozessen durch Scherkräfte, UV-Strahlung, pH-Wert, Temperatur etc. unterworfen ist (Lacoursiere-Roussel *et al.* 2016; Rees *et al.* 2014; Thomsen *et al.* 2012b), werden für den Nachweis aquatischer Organismen mittels eDNA generell sehr kurze DNA-Fragmente in der PCR vervielfältigt. Außerdem wird meist auf

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

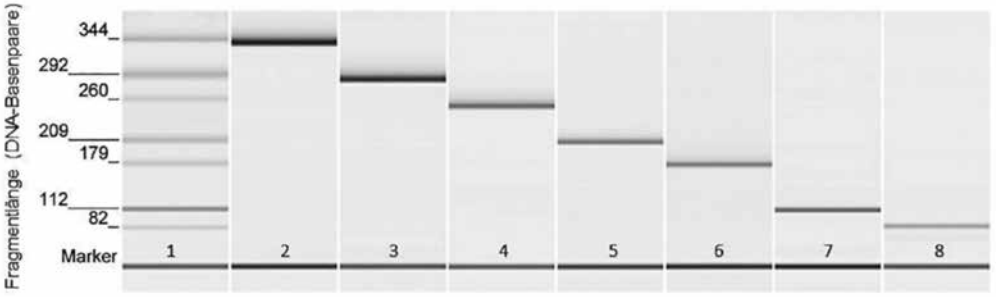

Abb. 4: *Molekularer Artnachweis von Salmoniden mittels diagnostischer PCR. Die vervielfältigten DNA Fragmente (Banden) erlauben den Nachweis sowie die Unterscheidung der folgenden Fischtaxa: 1 Positivkontrolle, eine Mischung von DNA der sieben Zielarten, 2 Renke (Coregonus spp.), 3 Bachforelle (Salmo trutta), 4 Atlantischer Lachs (Salmo salar), 5 Huchen (Hucho hucho), 6 Äsche (Thymallus thymallus), 7 Bach- und Seesaibling (Salvelinus spp.), 8 Regenbogenforelle (Oncorhynchus mykiss).* © Thalinger

DNA-Fragmente der Mitochondrien abgezielt, da sie in vielfacher Anzahl in jeder Zelle vorkommen (Minamoto *et al.* 2017). Somit kann eine sehr gute Nachweiswahrscheinlichkeit trotz des stetigen DNA-Abbaus im Wasser sichergestellt werden.

Die eigentliche Zuordnung der vervielfältigten DNA zu ihren Ursprungsorganismen kann auf zwei sehr unterschiedliche Methoden erfolgen. Bei der diagnostischen PCR wird nur die DNA eines oder mehrerer bestimmter Zielorganismen (z. B. einzelne Arten wie die Bachforelle oder ein eingeschränktes, potentiell vorkommendes Artenspektrum) detektiert. Findet eine Vervielfältigung der spezifischen DNA in der PCR statt, ist das Vorhandensein dieser Art in einer bestimmten Probe belegt (*Abb. 4*).

Die diagnostische PCR ist vergleichsweise kostengünstig, schnell und erlaubt eine effiziente Untersuchung größerer Probenzahlen auf bestimmte Fischarten. Sie ist auch sehr sensitiv hinsichtlich der detektierten Arten, und es reichen bereits wenige Moleküle für einen Nachweis. Aus diesem Grund wird sie bei eDNA-Analysen z. B. für die Bestimmung von Verbreitungsgebieten besonders von invasiven oder gefährdeten Fischarten eingesetzt (z. B. Carim *et al.* 2017; Carim *et al.* 2016; Sigsgaard *et al.* 2015).

Dem gegenüber steht die Artidentifikation basierend auf der DNA-Sequenz. Hierbei wird im ersten Schritt ebenfalls ein definiertes DNA-Fragment mittels PCR vervielfältigt, ehe die Identifikation durch Sequenzierung des PCR-Produktes erfolgt. Sequenzierplattformen, welche das gleichzeitige Auslesen von Millionen von Sequenzen erlauben, wurden bereits vielfach in eDNA-Studien angewandt (z. B. Civade *et al.* 2016; Hänfling *et al.* 2016; Valentini *et al.* 2016). Diese Methode wird als »next generation sequencing« oder »metabarcoding« bezeichnet. Ihr Vorteil liegt vor allem darin, dass in der PCR durch eine entsprechende Wahl der molekularen Sonden gleichzeitig DNA vieler verschiedener Arten vervielfältigt und im nächsten Schritt identifiziert werden kann. Im Idealfall ist es somit möglich, das Arteninventar eines Gewässers zu erfassen (Valentini *et al.* 2016). Ein Nachteil dieser Methode im Vergleich zur diagnostischen PCR ist, dass die Sensitivität hinsichtlich seltener Arten nicht automatisch gewährleistet ist und diese oftmals nicht oder nur unzuverlässig detektiert werden können. Durch den erhöhten Laboraufwand sowie die nachfolgenden bioinformatischen Analysen, die je nach verwendeter Datenbank und Analysemethode auch noch zu teils unterschiedlichen Ergebnissen führen können, ist dieser Ansatz derzeit nur bedingt für flächendeckende Analysen geeignet.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Abb. 5: *eDNA-Extraktion im Reinraumlabor der Arbeitsgruppe angewandte und trophische Ökologie, Institut für Ökologie der Universität Innsbruck.* © Thalinger

Unabhängig von der Fragestellung und den verwendeten Methoden ist bei eDNA-Analysen große Vorsicht vor falsch-negativen und falsch-positiven Ergebnissen geboten. Bei falsch-negativen Ergebnissen kann eine Fischart nicht mittels eDNA nachgewiesen werden, obwohl sie in einem Gewässer vorhanden ist. Dies wird vor allem durch falsche Probenahmestrategien und suboptimale Laboranalysen verursacht. Von falsch-positiven Ergebnissen spricht man, wenn eine Art basierend auf molekularen Analysen in einem Gewässer nachgewiesen wird, obwohl sie in diesem gar nicht vorkommt. Der Hauptgrund hierfür ist die Kontamination der Proben entlang verschiedener Analyseschritte oder methodisch bedingte Fehler bei der Sequenzierung (Ficetola *et al.* 2016). Aus diesem Grund sollten sämtliche Probenahme- und Analyseschritte nur von geschultem Personal und in eigens dafür ausgestatteten Räumlichkeiten durchgeführt werden (*Abb. 5*).

Wissenschaft und praktische Anwendung in heimischen Gewässern

Trotz des großen Potentials des eDNA-Ansatzes wurde dessen Anwendbarkeit in heimischen Gewässern durch folgende, bisher unzureichend geklärte Fragestellungen, limitiert (Tab. 1): Inwiefern ist es möglich, ausgehend von der DNA-Signalstärke auf Fischbestände in Gewässern rückzuschließen? Unterscheiden sich Fischarten in der abgegebenen DNA-Menge? Wie weit wird eDNA in Fließgewässern flussabwärts transportiert, ehe sie nicht mehr nachweisbar ist, und was für einen Einfluss spielen Umweltfaktoren wie pH-Wert und UV-Strahlung dabei?

Tab. 1: Vor- und Nachteile der eDNA-Methode.

Vorteile	Nachteile bzw. Forschungsbedarf
• rasche und kostengünstige Methode	• Einfluss aus dem Oberlauf (Herkunft der eDNA)
• effiziente Analyse großer Probenzahlen welche die räumliche und zeitliche Verdichtung von Untersuchungsstellen erlaubt	• Quantifizierbarkeit bisher nur eingeschränkt möglich
• sehr hohe Sensitivität, Nachweis seltener Arten	• keine Angaben zur Populationsstruktur (Altersaufbau)
• keine Auswirkungen auf den Fischbestand (Elektronarkose, Betäubung, Hälterung, ...)	• richtige Probenahme erforderlich, um Verschmutzungen zwischen Probenstellen zu vermeiden
• flexible jahreszeitliche Anwendung	• optimiertes Laborprotokoll zur Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

In bisherigen Studien wurde für einzelne Fischarten wie z. B. Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*) oder Ayu (*Plecoglossus altivelis*) versucht, von der gewonnenen eDNA-Menge in Wasserproben auf die im Gewässer vorhandene Fischbiomasse rückzurechnen (Baldigo *et al.* 2017; Doi *et al.* 2017a; Lacoursiere-Roussel *et al.* 2016). In allen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Fischabundanz bzw. -biomasse im Gewässer und der Stärke des eDNA-Signals nachgewiesen werden. Fischbiologische Faktoren komplizieren jedoch nach wie vor die direkte Interpretation dieser Ergebnisse. So wurden z. B. Unterschiede in der DNA-Abgaberate sowohl zwischen Fischarten, als auch zwischen adulten und juvenilen Fischen nachgewiesen (Evans *et al.* 2016; Maruyama *et al.* 2014; Sassoubre *et al.* 2016). In Fließgewässern kompliziert die von oberhalb der Probenahmestelle herangetragene eDNA die Interpretation der Ergebnisse noch zusätzlich, da nicht endgültig geklärt ist, wie weit eDNA abhängig von Umweltbedingungen stromabwärts des Quellorganismus nachweisbar ist (Civade *et al.* 2016; Jane *et al.* 2015).

Das eDNA-AlpFisch Projekt

Um die oben beschriebenen Wissenslücken zu schließen und den eDNA-Ansatz in heimischen Gewässern für ein möglichst breites Spektrum von Fragestellungen anwendbar zu machen, wurde an der Universität Innsbruck in Zusammenarbeit mit der ARGE Limnologie GesmbH das von der Österreichischen Forschungsförderungsgesellschaft FFG finanzierte Projekt »eDNA AlpFisch: Detektion und semiquantitative Bestandserhebung alpiner Fischarten mittels eDNA« (FFG-Projekt 853219) ins Leben gerufen. Ziele des Projektes sind die Optimierung der Probenahme und Analyse für alpine Gewässer, die Bestimmung des Einflusses abiotischer Faktoren (pH-Wert, UV-Strahlung, Abfluss, Trübe), sowie die Abschätzung von Dominanzverhältnissen der projektspezifischen Zielarten in der Forellen- und Äschenregion (Tab. 2).

Hierfür ist es zunächst notwendig, etwaige Unterschiede in den eDNA-Abgaberaten der heimischen Fischarten zu bestimmen. Bei Aquarienversuchen am Forschungsinstitut für Limnologie (Mondsee) der Universität Innsbruck wird dies aktuell in Verbindung mit Messungen der Fischaktivität und des Stoffwechsels untersucht (*Abb. 6*). Somit können später in Freiland gewonnene Daten zuverlässig interpretiert werden.

Um den Einfluss abiotischer Faktoren zu erheben, werden im Rahmen des Projektes Käfigversuche am fischfreien Oberlauf der Melach (Tirol) durchgeführt (*Abb. 7* und *8*). Dabei wird eine definierte Masse Fisch in Käfigen ins Gewässer eingebracht und

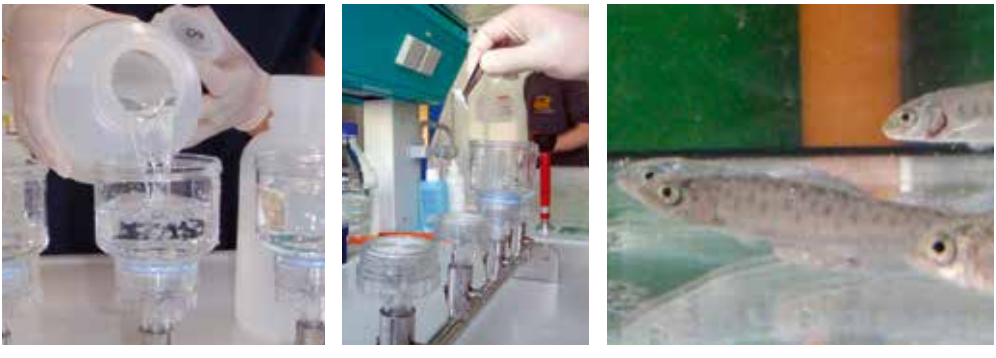

Abb. 6: *Filtration von Wasserproben während der Aquarienversuche im Rahmen des eDNA-AlpFisch Projektes am Forschungsinstitut für Limnologie (Mondsee) der Universität Innsbruck*
© Thalinger

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Tab. 2: Das Fischartenspektrum des Leitbildkataloges für die Forellen- und Äschenregion in den für Tirol relevanten Kalkhoch- und -voralpen sowie den vergletscherten und unvergletscherten Zentralalpen (Bundesamt für Wasserwirtschaft, BAW Scharfling); der Semling kommt in Tirol nicht vor.

		Epirhithral			Metarhithral			Hyporhithral gr.		
Fischart	*Wissenschaft. Name*	A	B	M	A	B	M	A	B	M
Aalrutte	*Lota lota*						s	s	b	b
Aitel	*Squalius cephalus*					s		s	b	b
Äsche	*Thymallus thymallus*				s	b	s	l	l	l
Bachforelle	*Salmo trutta fario*	l	l	l	l	l	l	l	l	l
Bachschmerle	*Barbatula barbatula*							s	s	s
Barbe	*Barbus barbus*							s	b	b
Elritze	*Phoxinus phoxinus*				s	s		b	s	b
Flussbarsch	*Perca fluviatilis*							s	s	s
Grundling	*Gobio gobio*							s	b	s
Hasel	*Leuciscus leuciscus*							s		s
Hecht	*Esox lucius*							s	s	s
Huchen	*Hucho hucho*							l	l	b
Koppe	*Cottus gobio*	/b/s/-	/b/s/-	/b/s/-	b	b	l	l	l	l
Nase	*Chondrostoma nasus*							s	b	b
Neunauge	*Eudontomyzon mariae*					b		s	b	
Schneider	*Alburnoides bipunctatus*							s	s	s
Semling	*Barbus balcanicus*								s	
Strömer	*Telestes souffia*							b	s	s

anschließend werden Wasserproben in unterschiedlichen Entfernungen von dieser eDNA-Quelle genommen. Mittels gleichzeitiger Messung von Strahlung, Abfluss, Trübe sowie pH-Wert kann der Einfluss dieser abiotischen Parameter auf das Überdauern der eDNA im Gewässer sowie die Nachweisdistanz unterhalb des Käfigs abgeschätzt werden. Da bei diesem Versuch nur eine sehr geringe Fischmasse (verschiedene Arten) ins Gewässer eingebracht wird, ist es zusätzlich möglich, die Nachweisgrenzen des eDNA-Ansatzes in alpinen Gewässern zu bestimmen und zwischen diagnostischer PCR und metabarcoding zu vergleichen. Bisherige Zwischenergebnisse zeigen beispielsweise, dass bereits 200 g Fischbiomasse (ca. 3 – 4 kleine Salmoniden von rund 12 – 15 cm Länge) bei einem Abfluss von rund 200 l/s sehr gut mittels diagnostischer PCR detektiert werden kann und untermauern die hohe Sensitivität der Methode.

Im finalen Schritt werden im Laufe des eDNA-AlpFisch Projektes unmittelbar vor quantitativen Elektrobefischungen Wasserproben für eDNA-Analysen genommen. Diese Vorgehensweise erlaubt durch eine Kombination der Fischbestandsdaten mit gewässerspezifischen Parametern und den molekular gewonnenen Ergebnissen eine Abschätzung der praktischen Anwendbarkeit des eDNA-Ansatzes. Dabei ist es möglich, die eDNA-Signalstärke aller im Gewässer vorhandenen Fischarten direkt mit Parametern wie Biomasse, Fischoberfläche oder Abundanz zu korrelieren. Auch hier zeigen erste Zwischenergebnisse bereits gute Übereinstimmungen zwischen Befischungsergebnissen und dem eDNA-Ansatz.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Abb. 7: *Einbringen der Versuchsfische in die Käfige. Hier ist eine Niedrigwassersituation mit geringer Trübe dargestellt.* © Thalinger

Durch dieses dreistufige Projektdesign wird die Anwendbarkeit des eDNA-Ansatzes für die heimischen Gewässer optimiert und ermöglicht so zukünftig den großflächigen und zuverlässigen Einsatz dieser Methode für angewandte Fragestellungen. Während bisher Fischarten der Forellen- und Äschenregion im Fokus des Projektes lagen, scheint durch erste vielversprechende Ergebnisse eine Ausweitung der molekularen Detektionssysteme auf fließende und stehende Gewässer in tiefer liegenden Regionen mit einem breiteren Artenspektrum der nächste, logische Schritt.

Anwendungsmöglichkeiten in heimischen Gewässern

Aufgrund der effizienten Beprobung kann bei eDNA-Analysen eine große Anzahl an Probenstellen in Vergleich zu Elektrobefischungen untersucht werden. Dies macht die Methode beispielsweise ideal, um die Verbreitungsgrenzen von Fischarten großräumig zu bestimmen. Besonders im Fall von gefährdeten Arten wie z. B. dem Schlammpeitzger oder invasiven Arten wie z. B. dem Blaubandbärbling (*Pseudorasbora parva*) und ponto-kaspischen Grundelarten eröffnen sich neue Möglichkeiten für ein räumlich und zeitlich feinmaschiges Monitoring.

Abb. 8: *Fischkäfige im Oberlauf der Melach (Tirol). Das Foto zeigt eine typische, nachmittägliche Sommerabflusssituation mit hohem Abfluss und Trübe.* © Thalinger

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Erfolgskontrolle von Besatzmaßnahmen, da, sofern die oben erläuterten externe Einflüsse erfasst und berücksichtigt werden, anhand der eDNA-Signalstärke auf Populationsdichten und Dominanzverhältnisse im Längsverlauf von Fließgewässern rückgeschlossen werden kann. Mittels umfassender Beobachtungen von Bestandsentwicklungen übers Jahr können Revierbesitzer so zukünftig die saisonale Entwicklung des Fischbestands überwachen und wertvolle Informationen darüber erlangen, ob ein Besatz erfolgreich war und in der Bewirtschaftung gegebenenfalls rasch reagieren bzw. vorausplanen. Die Auswirkungen von Hochwasserereignissen auf lokale Fischbestände sind somit ebenfalls abschätzbar.

Da neben dem Nachweis einzelner Arten auch die Erfassung des gesamten Arteninventars möglich ist, kann auch das noch vorhandene Artenspektrum in einem Einzugsgebiet bzw. oberhalb von Querbauwerken nachgewiesen werden. Dies ermöglicht, das Renaturierungspotential von Rückbaumaßnahmen bzw. deren Erfolg zu beurteilen. Vorab großräumig durchgeführte eDNA-Analysen von Gewässerabschnitten könnten darüber hinaus auch helfen, Befischungsstellen für im Umfeld der Wasserrahmenrichtlinie durchgeführte quantitative Elektrobefischungen gezielt auszuwählen.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Untersuchung wurde durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft im Rahmen des Projektes eDNA-AlpFisch gefördert. Zudem bedanken wir uns bei allen bisher in das Projekt im Rahmen von Bachelor- und Masterarbeiten involvierten Studenten für ihren unermüdlichen Einsatz bei Feldarbeiten und im Labor.

LITERATUR

Baldigo BP, Sporn LA, George SD, Ball JA (2017) efficacy of Environmental DNA to detect and quantify brook trout populations in headwater streams of the Adirondack Mountains, New York. *Transactions of the American Fisheries Society 146*, 99–111.

Carim KJ, Dysthe JC, Young MK, McKelvey KS, Schwartz MK (2017) A noninvasive tool to assess the distribution of Pacific lamprey (*Entosphenus tridentatus*) in the Columbia River basin. *PLoS One 12*, 7.

Carim KJ, Dysthe JCS, Young MK, McKelvey KS, Schwartz MK (2016) An environmental DNA assay for detecting Arctic grayling in the upper Missouri River basin, North America. *Conservation Genetics Resources 8*, 197–199.

Civade R, Dejean T, Valentini A, *et al.* (2016) Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PLoS One 11*.

Doi H, Inui R, Akamatsu Y, *et al.* (2017a) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology 62*, 30–39.

Doi H, Uchii K, Matsuhashi S, *et al.* (2017b) Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA. *Limnology and Oceanography-Methods 15*, 212–218.

Eichmiller JJ, Miller LM, Sorensen PW (2016) Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources 16*, 56–68.

Evans NT, Olds BP, Renshaw MA, *et al.* (2016) Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources 16*, 29–41.

Evans NT, Shirey PD, Wieringa JG, Mahon AR, Lamberti GA (2017) Comparative Cost and Effort of Fish distribution detection via environmental DNA analysis and electrofishing. *Fisheries 42*, 90–99.

Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett 4*, 423–425.

Ficetola GF, Taberlet P, Coissac E (2016) How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Molecular Ecology Resources 16*, 604–607.

Hänfling B, Handley LL, Read DS, *et al.* (2016) Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology 25*, 3101–3119.

Jane SF, Wilcox TM, McKelvey KS, *et al.* (2015) Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources 15*, 216–227.

Lacoursiere-Roussel A, Rosabal M, Bernatchez L (2016) Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources 16*, 1401–1414.

Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, Kondoh M, Minamoto T (2014) The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS One 9*.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

McKee AM, Spear SF, Pierson TW (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.

Minamoto T, Naka T, Moji K, Maruyama A (2016) Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology 17*, 23–32.

Minamoto T, Uchii K, Takahara T, *et al.* (2017) Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Ecology Resources 17*, 324–333.

Rees HC, Maddison BC, Middleditch DJ, *et al.* (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.

Sassoubre LM, Yamahara KM, Gardner LD, Block BA, Boehm AB (2016) Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environmental Science & Technology 50*, 10456–10464.

Shaw JLA, Clarke LJ, Wedderburn SD, *et al.* (2016) Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation 197*, 131–138.

Sigsgaard EE, Carl H, Moller PR, Thomsen PF (2015) Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation 183*, 46–52.

Spens J, Evans AR, Halfmaerten D, *et al.* (2017) Comparison of capture and storage methods for aqueous macrobial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution 8*, 635–645.

Takahara T, Minamoto T, Doi H (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One 8*.

Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* (2012a) Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One 7*.

Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* (2012b) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol 21*, 2565–2573.

Turner CR, Barnes MA, Xu CCY, *et al.* (2014) Particle size distribution and optimal capture of aqueous macrobial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution 5*, 676–684.

Turner CR, Uy KL, Everhart RC (2015) Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation 183*, 93–102.

Valentini A, Taberlet P, Miaud C, *et al.* (2016) Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology 25*, 929–942.

Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, *et al.* (2016) Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation 194*, 209–216.

Yamanaka H, Minamoto T (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators 62*, 147–153.

Yamanaka H, Motozawa H, Tsuji S, *et al.* (2016) On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. *Ecological Research 31*, 963–967.

DI Dr. Ulrich Habsburg-Lothringen
Allgemein gerichtlich beeideter und zertifizierter Sachverständiger für Fischerei, Reinhaltung des Wassers, Forstwesen und Landschaftspflege
A-9400 Wolfsberg ~ Klagenfurter Straße 1 ~ Tel. 0 43 52/39 36 11 ~ Fax 0 43 52/39 36 20
Mobil 0664/24 39 786 ~ E-Mail: ulrich.habsburg@gmx.at

Fischzucht Rhönforelle
GmbH & Co. KG | Rendelmühle
36129 Gersfeld | Deutschland
Tel. +49(0)66 54/91 92 20
Fax +49(0)66 54/82 77 | www.fisch-gross.de
Wir liefern unter anderem nach Österreich:
Sterlet und orig. **Störe, Aalrutten, Elritzen, Nasen, Hechte, Zander** vorgestreckt sowie
Glasaale (April–Mai) & **Farmaale** (Mai–Sept.)

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Österreichs Fischerei

Jahr/Year: 2017

Band/Volume: 70

Autor(en)/Author(s): Thalinger Bettina, Traugott Michael

Artikel/Article: Wissenschaft: Mit eDNA den Fischen auf der Spur 177-185