

# DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung?

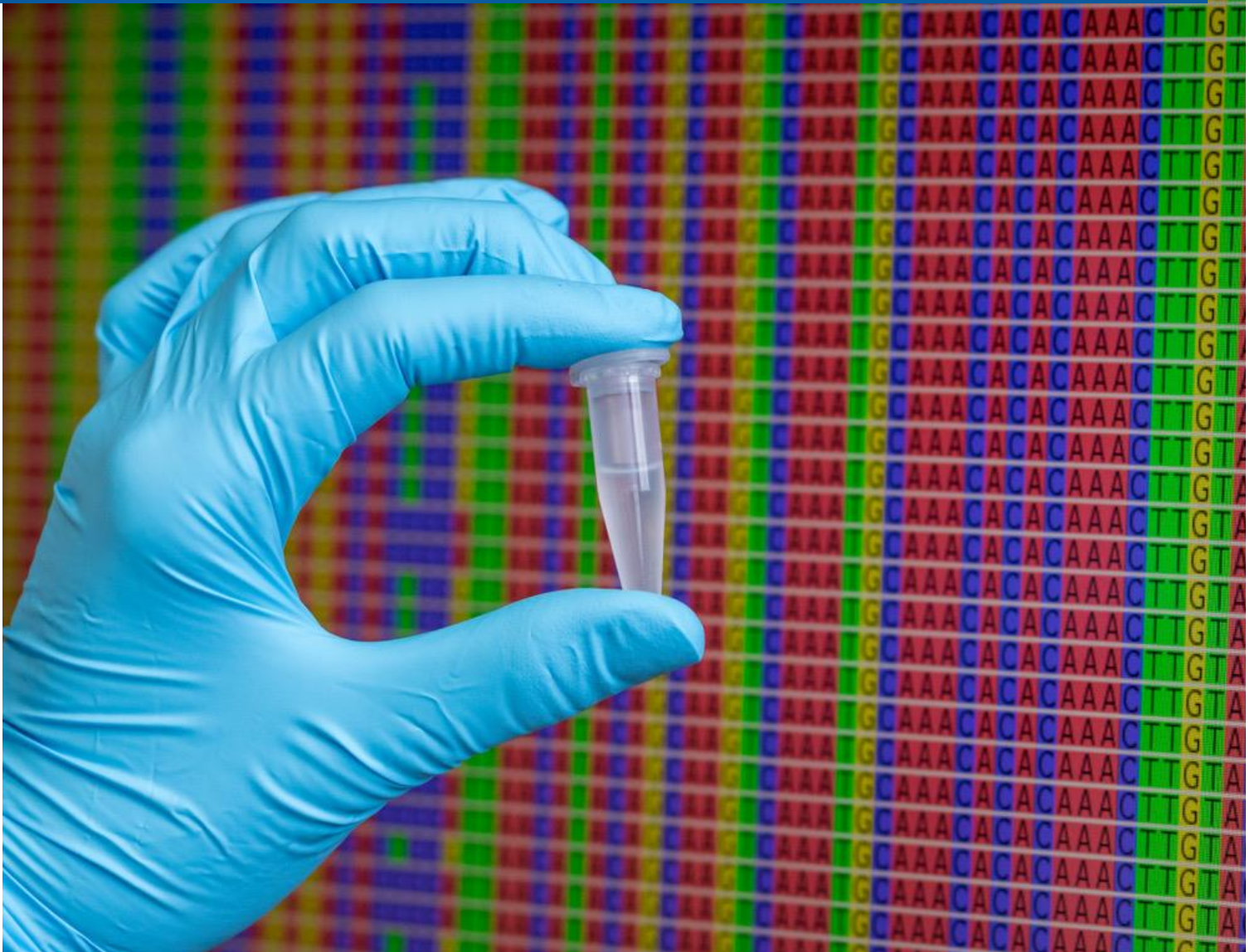
Eine Handlungsempfehlung aus Forschung und Praxis

Florian Leese, Ljuba Woppowa, Miklós Bálint, Sebastian Höss,  
Henrik Krehenwinkel, Stefan Lötters, Kristian Meissner,  
Carsten Nowak, Philipp Rausch, Vera Rduch, Björn Rulik,  
Alexander M. Weigand, Jonas Zimmermann, Jan Koschorreck  
und Wiebke Züghart

BfN-Schriften

666

2023





# **DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung?**

## **Eine Handlungsempfehlung aus Forschung und Praxis**

Florian Leese, Ljuba Woppowa, Miklós Bálint, Sebastian Höss,  
Henrik Krehenwinkel, Stefan Lötters, Kristian Meissner,  
Carsten Nowak, Philipp Rausch, Vera Rduch, Björn Rulik,  
Alexander M. Weigand, Jonas Zimmermann, Jan Koschorreck,  
Wiebke Züghart

Unter Mitarbeit von:

Florian Altermatt, Jens Arle, Jonas Astrin, Arne J. Beermann, Dominik Buchner,  
Sarah Bourlat, Jeanine Brantschen, Laura Epp, Silvio Erler, Birgit Gemeinholzer,  
Thomas Hörren, Stephan Jänsch, Karsten Karczewski, Sascha Krenek,  
Till-Hendrik Macher, Eva Mehler, Michael Mende, Demetrio Mora,  
Kirsten Morinière, Frank Narendja, Stefan Prost, Sandro Pütz,  
Thomas Riedinger, Jörg Römbke, Christoph Scherber, Saskia Schmidt,  
Julia Schwander, Klaus Schwenk, Wiebke Sickel, Michael Traugott,  
Carolin Uhlir, Franz Wagner, Vera M.A. Zizka

## Impressum

**Titelbild:** DNA-Probe vor einem Sequenzalignment (© Till-Hendrik Macher, Universität Duisburg-Essen)

### Adressen der Autorinnen und der Autoren:

Prof. Dr. Florian Leese	Universität Duisburg-Essen
Dr. Ljuba Woppowa	VDI Verein Deutscher Ingenieure e.V.
Prof. Dr. Miklós Bálint	Justus-Liebig-Universität Gießen, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung
Dr. Sebastian Höss	ECOSSA Ecological Sediment & Soil Assessment
Prof. Dr. Henrik Krehenwinkel	Universität Trier
Prof. Dr. Stefan Lötters	Universität Trier
Dr. Kristian Meissner	Finnish Environment Institute (SYKE)
Dr. Carsten Nowak	Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung
Dr. Vera Rduch	Stiftung Leibniz-Institut zur Analyse des Biodiversitätswandels (LIB)
Björn Rulik	Stiftung Leibniz-Institut zur Analyse des Biodiversitätswandels (LIB)
Dr. Philipp Rausch	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dr. Alexander M. Weigand	Nationalmuseum für Naturgeschichte Luxemburg
Dr. Jonas Zimmermann	Botanischer Garten & Botanisches Museum Berlin, Freie Universität Berlin
Jan Koschorreck	Umweltbundesamt
Dr. Wiebke Züghart	Bundesamt für Naturschutz

### Fachbetreuung im BfN:

Dr. Wiebke Züghart	Fachgebiet II 1.3 „Terrestrisches Monitoring“
Denise Munkelt	Fachgebiet II 1.3 „Terrestrisches Monitoring“

### Förderhinweis:

Gefördert durch das Bundesamt für Naturschutz (BfN) mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV)

Diese Veröffentlichung wird aufgenommen in die Literaturdatenbank „DNL-online“ ([www.dnl-online.de](http://www.dnl-online.de)).

BfN-Skripten sind nicht im Buchhandel erhältlich. Eine pdf-Version dieser Ausgabe kann unter [www.bfn.de/publikationen](http://www.bfn.de/publikationen) heruntergeladen werden.

Institutioneller Herausgeber: Bundesamt für Naturschutz  
Konstantinstr. 110  
53179 Bonn  
URL: [www.bfn.de](http://www.bfn.de)

Der institutionelle Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter. Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des institutionellen Herausgebers übereinstimmen.



Diese Schriftenreihe wird unter den Bedingungen der Creative Commons Lizenz Namensnennung – keine Bearbeitung 4.0 International (CC BY - ND 4.0) zur Verfügung gestellt ([creativecommons.org/licenses](http://creativecommons.org/licenses)).

Druck: Druckerei des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV)

Gedruckt auf 100% Altpapier

ISBN 978-3-89624-427-7

DOI 10.19217/skr666

Bonn 2023

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung und Handlungsempfehlungen</b> .....	<b>4</b>
<b>1</b> <b>Hintergrund, Motivation und Ziel</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b> <b>Bedeutung von Biodiversitätsdaten im behördlichen Natur- und Umweltschutz, Anwendungspotenziale DNA-basierter Methoden</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b> <b>Bedeutung von Standards in Monitoringprogrammen</b> .....	<b>9</b>
<b>4</b> <b>DNA-basierte Methoden zur Erfassung der Biodiversität</b> .....	<b>13</b>
<b>5</b> <b>Probenahme für genetische Untersuchungen</b> .....	<b>16</b>
<b>6</b> <b>Laboranalyse DNA-Metabarcoding</b> .....	<b>21</b>
<b>7</b> <b>Datenbanken</b> .....	<b>25</b>
<b>8</b> <b>Qualitätssicherung im Gesamtkontext</b> .....	<b>31</b>
<b>9</b> <b>Ausblick zur Implementierung</b> .....	<b>34</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>35</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>36</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>37</b>
<b>A</b> <b>Anhang: Europäische und Internationale Standardisierungsaktivitäten im Zusammenhang mit DNA-Metabarcoding</b> .....	<b>39</b>
A.1      Europäische Standardisierungsaktivitäten .....	39
A.2      Internationale Standardisierungsaktivitäten .....	40
A.3      Nationale Spiegelgremien des DIN zu Europäischen und Internationalen Gremien	41
<b>B</b> <b>Anhang: Tagungsprogramm</b> .....	<b>43</b>

## Zusammenfassung und Handlungsempfehlungen

Mit der vorliegenden Handlungsempfehlung werden die Herausforderungen und Optionen des standardisierten Einsatzes von DNA-Metabarcoding im behördlichen Natur- und Umweltschutz analysiert und bewertet. Basierend darauf werden konkrete Lösungsoptionen für die Standardisierung und Qualitätssicherung sowie die dafür erforderlichen Schritte dargestellt. Die Handlungsempfehlung fasst die Ergebnisse der Veranstaltung „DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung?“ zusammen, die vom Bundesamt für Naturschutz (BfN) gemeinsam mit dem Fachbereich Biodiversität der VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (VDI-TLS) vom 1.-3. Juni 2022 im Kloster Schöntal durchgeführt wurde (Abb. 1).



Abb. 1: Teilnehmende der Veranstaltung „DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung?“ in Kloster Schöntal. (© Woppowa, VDI)

Die Handlungsempfehlungen richten sich an politische Entscheidungsträger\*innen im Natur- und Umweltschutz, die behördliche Umweltbeobachtung sowie Fachleute des DNA-Metabarcodings und des Umwelt- und Biodiversitätsmonitorings.

## Handlungsempfehlungen

- Es ist jetzt Zeit zu handeln: Behörden diskutieren das DNA-Metabarcoding als komplementäre Methode für das Biodiversitätsmonitoring. Für vergleichbare und reproduzierbare Artenlisten werden technische Mindeststandards sowie eine Qualitätssicherung von Probenahme bis zur erstellten Artenliste benötigt.
- Eine essentielle Voraussetzung für die Nutzung von DNA-Metabarcoding im behördlichen Routinebetrieb ist der regelmäßige Austausch benannter Fachleute für die Planung und Umsetzung der DNA-basierten Monitoringprogramme, die Laboruntersuchungen sowie die Bewertung und Berichterstattung. Dazu gehören auch eine eindeutige Terminologie, die Standardisierung auf nationalem (DIN oder VDI) und internationalem Level (CEN oder ISO) sowie eine enge Abstimmung mit anderen Staaten. Letzteres ist Voraussetzung für die internationale Anerkennung der Verfahren und die Vergleichbarkeit der Daten.
- Die etablierten Probenahmen der Monitoringprogramme müssen angepasst oder erweitert werden, um DNA-Metabarcoding-Untersuchungen zu ermöglichen. Die sichere Zuweisung der Artnamen erfordert qualitätsgesicherte, öffentliche Referenzdatenbanken, die stufenweise erweitert und von Fachleuten verfügbar gemacht werden. Ziel ist es, dadurch mittelfristig auch bislang kaum untersuchte „Dark Taxa“, d.h. kaum erforschte Organismengruppen, zu erfassen.
- Für die Laboranalysen werden Mindeststandards für die Qualitätssicherung kritischer Arbeitsabläufe und Probentypen empfohlen. Die Qualitätssicherung DNA-basierter Analysen erfordert Maßnahmen auf vier Ebenen:
  1. Rahmenbedingungen für die Art und Weise der Probenahme und den Laborbetrieb, insbesondere mit Blick auf Dokumentation und Probenlagerung.
  2. Regelmäßige Eignungsprüfungen der durchführenden Labore durch kompetente Institutionen, beispielsweise durch Ringtests.
  3. Mindestanforderungen der Laboruntersuchungen durch Vorgaben für kritische Parameter wie Anzahl, Umfang und Konservierung der Proben, kontaminationsfreie Arbeitsweise, Anzahl der Replikate, Negativ- /Positivkontrollen sowie Sequenziertiefe.
  4. Qualitätskontrolle analysierter Proben *a posteriori*, z.B. über Rückstellproben oder Co-Analyse von Blindproben.
- Es ist erforderlich, die Koordination der Qualitätssicherung zu institutionalisieren, hierfür gibt es Erfahrungen und Beispiele anderer Messprogramme, z.B. Bund/Länder-Messprogramm (BLMP) der Küsten.

## 1 Hintergrund, Motivation und Ziel

Während DNA-basierte Methoden in der Forschung bereits häufig angewandt werden, ist ein Einsatz im behördlichen Kontext noch eher die Ausnahme. Für Behörden des Natur- und Umweltschutzes stellt sich insbesondere die Frage nach dem Reifegrad DNA-basierter Methoden für Biodiversitätsanalysen und den dazugehörigen Standards sowie Maßnahmen zur Qualitätssicherung. Dies sind entscheidende Voraussetzungen für die Aufnahme neuer Methoden in Monitoringprogramme des Natur- und Umweltschutzes.

Vom 1. bis 3. Juni 2022 organisierte das Bundesamt für Naturschutz (BfN) gemeinsam mit dem Fachbereich Biodiversität der VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (VDI-TLS) im Bildungshaus Kloster Schöntal einen Workshop zum Thema „DNA-basierte Methoden im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung?“.

Der Schöntaler Workshop brachte Fachleute aus Forschung und Praxis zusammen, um ausgehend von Optionen für die Standardisierung DNA-basierter Methoden konkrete Forschungs- und Handlungsschritte für die Praxis abzuleiten. Dabei lag der Fokus auf dem methodisch bereits weit entwickelten und häufig getesteten DNA-Metabarcoding (im Folgenden nur als „Metabarcoding“ bezeichnet), einer Methode für die Erstellung von Artenlisten basierend auf Sammelproben („Bulk samples“) oder Umweltproben mit DNA-Spuren der Organismen.

Der Schöntaler Workshop wurde durch ein Koordinationsteam von Bundesamt für Naturschutz (BfN), VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (VDI-TLS), Umweltbundesamt (UBA), Universität Duisburg-Essen (UDE), Botanischer Garten und Botanisches Museum / Freie Universität (FU) Berlin, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung Frankfurt (SGN), Universität Trier (UT), Leibniz-Institut für Biodiversitätswandel (LIB), Universität Kiel, Mitgliedern des VDI-Fachbeirats Biodiversität sowie Experten der Umweltbehörde SYKE Finnland und des Nationalmuseums für Naturgeschichte Luxemburg (MNHNL) vorbereitet.

Eine empirische Basis für die Diskussionen vor Ort lieferte eine Umfrage zur Standardisierung DNA-basierter Verfahren, die im Vorfeld des Workshops durchgeführt wurde und die Antworten von Fachleuten aus Hochschulen, Forschungsinstituten, Behörden, Gutachterbüros und Auftragslaboren umfasste. Insgesamt nahmen 40 Expert\*innen an dem Workshop teil und erörterten die Optionen und spezifischen Herausforderungen der Standardisierung des Metabarcodings mit Blick auf vier Themenfelder:

- Probenahme
- Laboranalyse
- Datenbanken
- Generelle Maßnahmen zur Qualitätssicherung in behördlichen Monitoringprogrammen.

Mit der vorliegenden Handlungsempfehlung werden die Optionen und Herausforderungen des standardisierten Einsatzes von Metabarcoding im behördlichen Natur- und Umweltschutz analysiert und bewertet. Basierend darauf werden konkrete Lösungsoptionen für die Standardisierung und Qualitätssicherung sowie die dafür erforderlichen Schritte dargestellt. Abschließend wird die Bedeutung koordinierter transnationaler Prozesse bei der Standardisierung hervorgehoben und mögliche Plattformen dafür vorgeschlagen.

## 2 Bedeutung von Biodiversitätsdaten im behördlichen Natur- und Umweltschutz, Anwendungspotenziale DNA-basierter Methoden

Seit den 1970er Jahren schafft die Umweltpolitik auf nationaler und europäischer Ebene die gesetzlichen Grundlagen für den Schutz von Natur und Umwelt und die Voraussetzungen für die wissenschaftliche Forschung zur Unterstützung ihrer Umsetzung. Langfristige Monitoringprogramme leisten einen wichtigen Beitrag zur Erfüllung der Aufgaben von Bund und Ländern. Biodiversitätsdaten ermöglichen es, den Zustand der Ökosysteme zu bewerten, die Gründe für nachteilige Veränderungen zu erkennen und Maßnahmen für den Schutz von Natur und Umwelt abzuleiten. Biodiversitätsdaten sind die Grundlage wissenschaftlicher Politikberatung und geben Aufschluss, ob getroffene Maßnahmen wirksam sind oder ob Bedarf für eine Nachsteuerung besteht.

In Deutschland regelt das Bundesnaturschutzgesetz § 6 „Beobachtung von Natur und Landschaft“ die Aufgaben von Bund und Ländern, wie z.B. die Berichtspflichten für die EU-Richtlinien zum Schutz der Habitate (FFH), der Vögel (VRL), der Meere (MSRL) sowie zu invasiven gebietsfremden Arten (IAS). Weitere Aufgaben des Bundes und der Länder ergeben sich insbesondere durch das umfassende Regelwerk der EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) sowie durch das Washingtoner Artenschutzübereinkommen (CITES). Strategische Leitplanken für die Biodiversitätsforschung sind das Übereinkommen über die biologische Vielfalt der Vereinten Nationen (CBD), die Nationale Strategie zur Biologischen Vielfalt (NBS), die Deutsche Nachhaltigkeitsstrategie (DNS) sowie die Deutsche Anpassungsstrategie an den Klimawandel (DAS). Der europäische Green Deal setzt mit der Zero Pollution Ambition und der EU-Biodiversitätsstrategie 2030 neue Impulse im Umweltschutz, indem die Ökosysteme bis 2050 erholt, resilient und angemessen geschützt sein sollen. Eine wichtige Prämisse für Erfolge in allen Handlungsfeldern sind umfassende Beobachtungsdaten für die Bewertung des Ist-Zustandes und der Veränderung der Biodiversität sowie aussagekräftige Zukunftsprognosen. Die Bedeutung des Einsatzes neuer innovativer und leistungsfähiger Methoden in Ergänzung zu den etablierten klassischen Methoden nimmt dabei stetig zu. DNA-basierte Verfahren gehören neben Fernerkundung, Auswertungen akustischer Daten und automatisierter Bilderkennung (KI) zu den vielversprechenden Methoden, für die es bereits belastbare Erfahrungen und Praxisbeispiele gibt.

Anders als Forschungsprojekte, die in der Regel lokal begrenzte Biodiversitäts- und Umweltdaten einzelner oder weniger Jahre erheben, sind behördliche Monitoringprogramme für den zeitlichen und räumlichen Vergleich angelegt und sind oft über Jahrzehnte hinweg geplant. Für aussagekräftige Bewertungen müssen alle Daten langfristig vergleichbar, reproduzierbar, repräsentativ, valide und qualitätsgesichert sein. Neue Methoden werden erst dann eingesetzt, wenn sie für den Routinebetrieb ausreichend geprüft, in Verfahrensrichtlinien festgelegt und mit Qualitätssicherungsmaßnahmen hinterlegt sind.

Im FFH-Monitoring ist der Einsatz von DNA-basierten Methoden bereits etabliert. Verfahren des genetischen Artenmonitorings werden z.B. zur Erfassung des Erhaltungszustandes von Wolf, Luchs und Wildkatze sowie verschiedener Amphibien in Gewässern genutzt. Das im Aufbau befindliche bundesweite Insektenmonitoring bietet ebenfalls viel Potenzial für den Einsatz des Metabarcodings, z.B. bei der Analyse von Bulk-Proben flugaktiver Insekten (Malaisefallen, Farbschalen o.Ä.), bodenlebender Käfer und Spinnen (Bodenfallen) oder xylobionter Käfer im Wald (Kreuzfensterfallen). Da es sich beim Insektenmonitoring um ein Trendmonitoring handelt, werden jedoch nicht nur Nachweise der Artenzusammensetzung, sondern auch



der jeweiligen Abundanzen benötigt, was zumindest derzeit mit Metabarcoding noch nicht möglich ist.

Darüber hinaus befinden sich Metabarcoding-Verfahren in der Entwicklung z.B. zum Nachweis von Inhaltsstoffen geschützter Pflanzen in Gemischen und stark verarbeiteten Produkten, um den Handel mit unerlaubten Produkten aufzudecken (CITES Abkommen). Außerdem werden im Ressortforschungsprogramm des Bundesumweltministeriums Vorschläge für die Verwendung von Umwelt-DNA-Metabarcoding (eDNA-Metabarcoding) in Monitoringprogrammen der WRRL ([www.GeDNA.de](http://www.GeDNA.de)) gefördert sowie für die strukturierte Erfassung DNA-basierter Gewässerdaten in Forschungsdatenbanken, die den FAIR „Guiding Principles for scientific data management“ zur Datenqualität und -verfügbarkeit folgen, d.h. auffindbar ((f)indable), zugänglich ((a)ccessible), interoperabel ((i)nteroperable) und wiederverwendbar ((r)eusable) sind. Für die Umweltprobenbank des Bundes entwickeln Fachleute mehrerer Forschungsinstitute Verfahrensbeschreibungen für das eDNA-Metabarcoding und andere genetische Methoden. Sie ermöglichen es, Archivproben der letzten Jahrzehnte aus Meeren, Binnengewässern und terrestrischen Lebensräumen retrospektiv zu untersuchen und so wichtige Verständnislücken der Entwicklung der biologischen Vielfalt in den Ökosystemen zu schließen ([www.TrendDNA.de](http://www.TrendDNA.de)). Darüber hinaus werden genetische Methoden als neue Routineparameter in das Untersuchungsprogramm der Umweltprobenbank aufgenommen. Für ein zukünftiges Boden-Biodiversitätsmonitoring werden Metabarcoding-Methoden zur Erfassung der Biodiversität im Boden entwickelt und erprobt.

Diese Beispiele zeigen, dass DNA-basierte Methoden zur Erfassung der Biodiversität ein hohes Potenzial für den Natur- und Umweltschutz bieten. Die Voraussetzungen für ihre Verwendung im behördlichen Monitoring sind, dass sie die oben dargestellten Anforderungen erfüllen und belastbare, qualitätsgesicherte und reproduzierbare Daten liefern. Zur Gewährleistung einer Vergleichbarkeit müssen vereinheitlichte Verfahren angewendet werden, die sich in der Praxis bewährt haben. Die Standardisierung von Metabarcoding-Methoden ist ein wichtiger Schritt, um dies zu gewährleisten.

## Zusammenfassung

- Für das behördliche Umweltmonitoring sind Langzeitdaten zur Biodiversität für die Bewertung des Ist-Zustandes und der Veränderungen von großer Bedeutung.
- Daten müssen langfristig repräsentativ, vergleichbar, reproduzierbar und valide sein und gemäß den FAIR-Prinzipien auffindbar, zugänglich, interoperabel und wiederverwendbar sein.
- DNA-basierte Methoden zur Biodiversitätserhebung spielen im behördlichen Monitoring bislang kaum, in der Forschung dafür eine umso größere Rolle.
- Die Standardisierung ist ein wichtiger nächster Schritt, um das wissenschaftliche Potenzial der Methoden auch für die behördliche Praxis zu erschließen.

### 3 Bedeutung von Standards in Monitoringprogrammen

Standards, technische Regeln, Normen oder Richtlinien sind alles Bezeichnungen von Dokumenten, die in Deutschland, Europa und weltweit durch regelsetzende Institutionen im Rahmen eines klar geregelten, transparenten und partizipativen Prozesses definiert werden. Die Dokumente legen die Terminologie des behandelten Verfahrens oder Produkts fest und formulieren konkrete Anforderungen und Empfehlungen für die Verfahren und Produkte. In dieser Handlungsempfehlung nutzen wir den Begriff „Standards“. Der Prozess der Regelsetzung wird als „Standardisierung“ bezeichnet. Das Deutsche Institut für Normung (DIN) publiziert Normen und ist der national größte Regelsetzer. Das DIN hat den alleinigen Staatsvertrag, der ihm gestattet, Deutschland normungstechnisch bei den internationalen Standardisierungsgremien, CEN (Europa) und ISO (International), zu vertreten. Während CEN-Standards als nationale Standards in das nationale Regelwerk übernommen werden müssen, liegt eine Entscheidung für die Übernahme von ISO-Standards bei DIN. Der VDI ist nach DIN und dem Verband der Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik e.V. (VDE) der drittgrößte Regelsetzer in Deutschland. Die von VDI und DIN publizierten Standards sind als gleichwertig zu betrachten und decken oft komplementär unterschiedliche Bereiche ab. Über den verbindlichen Einsatz entscheidet der Gesetzgeber.

Standards werden in der Grundlagenforschung und Methodenentwicklung oft als extrinsische Vorgaben wahrgenommen, die Innovationen bremsen. Dies ist eines von mehreren Vorurteilen (Box 1), denn Standards sind Voraussetzung für die Anwendung von Methoden zur Ermittlung vergleichbarer Ergebnisse. Sie führen dazu, dass neue Technologien für die allgemeine Anwendung tauglich werden. Mit Blick auf Naturschutzziele formuliert z.B. der Bundesverband beruflicher Naturschutz e.V. in diesem Kontext: „Standards sind moderne Instrumente, mit denen Naturschutzziele besser, wirtschaftlicher und mit höherer Akzeptanz erreicht werden können“. Wie erfolgreich Standards genutzt werden können, wird an bestimmten Kriterien erläutert.

#### **Technische Regeln als ein Werkzeug der Qualitätssicherung**

Grundsätzlich sind Standards die Basis einer Qualitätssicherung. Dies ist insbesondere für eine forschungsnah Standardisierung relevant und von Vorteil, denn Standards definieren Bewertungsmaßstäbe, wie z.B. den Stand von Wissenschaft und Technik, geben konkrete Hilfestellungen und erleichtern so den Übergang von der Forschung zur Praxis, d.h. von der Invention zur Innovation.

Für neue Technologien erhöhen Standards die Akzeptanz und schaffen Vertrauen in Sicherheit und Qualität des Produkts oder des Prozesses. Durch die Einbindung aller interessierten Kreise, die Erarbeitung nach dem Konsensprinzip sowie durch die zweistufige Publikation als Entwurf und nach einem öffentlichen Einspruchsverfahren als finaler Standard werden Transparenz und Qualitätssicherung im Erstellungsprozess der technischen Regeln garantiert. Durch eine regelmäßige Überprüfung im 5-Jahresrhythmus werden Aktualität und dauerhafte Verfügbarkeit eines Standards gewährleistet. Nationale Standards dienen zudem oft als nationale Standpunkte oder Basisdokumente für die europäische und internationale Regelsetzung.

### **Mindestanforderung**

Der technologischen Entwicklungsmöglichkeit wird durch die Standardisierung sogenannter Mindestanforderungen Rechnung getragen. Dabei werden Prozesse (Verfahren) und Produkte (z.B. Analysegerät oder Probenahmeapparatur) nicht bis in die kleinsten Details festgeschrieben (und damit ggf. Entwicklungen gehemmt), sondern es wird festgelegt, welche Eigenschaften oder Merkmale der standardisierte Prozess bzw. das Produkt mindestens erfüllen muss, z.B. eine messtechnische Nachweisgrenze oder eine Produktlebensdauer. Auf welche Weise diese Mindestanforderung erfüllt wird, ist den Anwendenden oder Entwickelnden freigestellt. Die Festlegung von Mindestanforderungen geben z.B. Laboren oder Geräteentwickler\*innen Handlungsspielräume und die Möglichkeit, ihre Prozesse und Apparate weiterzuentwickeln. Mindestanforderungen müssen mindestens eingehalten werden, technologische Verbesserungen werden aber vom Anwendenden gerne genutzt – und können ggf. sogar zu einer Aktualisierung der technischen Regel führen.

### **Messtechnik**

Ziel der Datenerhebungen ist eine präzise und richtige Messung bestimmter Parameter des Ist-Zustands (Abb. 2). Das kann z.B. die Messung der Körpertemperatur im Krankenhaus, der Schichtdicke einer Platine in der Elektrotechnik, oder der Artenzahl von Insekten auf einer Wiese sein. Das Ergebnis soll dabei unabhängig vom ausführenden Labor sein. Standards bieten dafür die Grundlage. Die technische Regelsetzung hat eine besondere Bedeutung für die Vergleichbarkeit von Messwerten. Sowohl bei wiederkehrenden Messungen eines Labors als auch bei Vergleichen von Ergebnissen verschiedener Labore sind dafür vereinheitlichte Vorgehensweisen bei der Durchführung der Messung erforderlich sowie ggf. eine Ergebniskontrolle. Nur so kann verhindert werden, dass falsche oder unpräzise Messwerte erhalten werden, in den unterschiedlichsten Sektoren und Kontexten. Um eine Vergleichbarkeit der Messwerte zu garantieren, müssen besondere Randbedingungen eingehalten werden. Fachleute sprechen von Vergleichsbedingungen und Wiederholbedingungen.

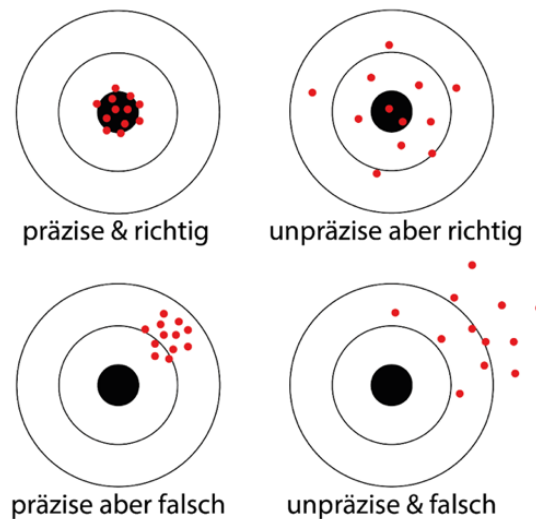


Abb. 2: Sicherheit (Präzision) und Richtigkeit einer Messung. Für eine Biodiversitätserhebung bedeutet dies, dass die Methode die tatsächliche Artenzusammensetzung (=schwarzes Zentrum) mit möglichst wenig Abweichung (=Streuung der roten Punkte) bei wiederholter oder unabhängiger Messung liefern kann. (© Leese modifiziert nach DIN ISO 5725-1 Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen - Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe (ISO 5725-1:1994))

### Verbindlichkeit

Die Anwendung von Standards ist grundsätzlich freiwillig. Standards sind keine Vorschriften, sondern privatrechtliche Empfehlungen. Der Prozess der technischen Regelsetzung impliziert jedoch eine starke Vermutungswirkung, dass die Anwendung der technischen Regel dem Stand der Technik entspricht und zu „richtigen“ Ergebnissen führt. Diese Vermutungswirkung kommt auch oft bei gerichtlichen Gutachten zum Tragen. Trotzdem steht es den Anwendenden frei, aus begründetem Anlass die standardisierte Vorgehensweise zu modifizieren, weil ein Anwendungsfall ebendies erfordert.

Im Rahmen gesetzlicher Umweltbeobachtungen und des Monitorings kann die Nutzung von Standards jedoch gefordert werden. Wenn der Gesetzgeber die technischen Regeln in seinen Gesetzen „anzieht“, d.h. verbindlich vorschreibt, wirkt die Regelsetzung staatsentlastend. Wichtige Beispiele sind z.B. TA Luft oder WRRL. Dann bedeutet die Nichtanwendung eines Standards eine Gesetzesmissachtung und kann geahndet werden.

#### BOX 1: Standards - Mythen und Fakten

##### **Irrtum #1: Standardisierung verhindert Fortschritt**

Fakt: Technische Regeln müssen alle 5 Jahre auf Aktualität überprüft werden. Standards führen oft dazu, dass eine Technologie für die allgemeine Anwendung tauglich wird.

##### **Irrtum #2: Standards sind Vorschriften, also bindend einzuhalten**

Fakt: Standards sind keine Vorschriften, sondern privatrechtliche Empfehlungen. Sobald Standards vom Gesetzgeber vorgeschrieben werden, ist ihre Einhaltung verpflichtend.

### **Irrtum #3: DIN-Standards sind verbindlich, VDI-Richtlinien nur empfehlend**

Fakt: DIN-Normen, VDI-Richtlinien und andere Regelsetzungsformate sind gleichwertig und ihre Anwendung wird empfohlen. Die Verbindlichkeit der technischen Regel legt der Gesetzgeber fest.

### **Irrtum #4: CEN- und ISO-Normen sind gleichwertig**

Fakt: CEN-Normen müssen EU-weit in nationale Standards überführt werden. ISO-Normen können in nationale Standards überführt werden, die Entscheidung trifft das zuständige nationale Spiegelgremium (siehe auch Anhang). Die Verbindlichkeit der technischen Regel legt der Gesetzgeber fest.

### **Irrtum #5: Standardisierung ist intransparent**

Fakt: Standards werden nach definierten und transparenten Prozessen erstellt (z.B. VDI 1000, DIN 820). Wichtige Grundsätze sind Konsensprinzip, Einspruchsverfahren, Einbindung aller interessierten Kreise.

### **Irrtum #6: Standards sind Gemeingut, man darf sie frei kopieren**

Fakt: DIN-Normen, VDI-Richtlinien und viele andere Standards sind kostenpflichtig und werden vom Beuth-Verlag Berlin vertrieben. Durch die Kosten wird die Arbeit der Normenerarbeitung finanziert.

Weitere Infos: VDI-Blog - sechs Irrtümer über Richtlinien und Normen ([www.vdi.de](http://www.vdi.de)).

Da DNA-basierte Monitoringmethoden derzeit vor allem in der Forschung und kaum in der behördlichen Praxis etabliert sind, besteht jetzt die Möglichkeit mithilfe der Standardisierung von Verfahren sowie der Etablierung eines standardisierten Qualitätsmanagements, eine Qualitätssicherung der gesamten Prozesskette von Probenahme bis zum übermittelten Ergebnis, d.h. der Arten- oder Taxaliste, einzuleiten.

## **Zusammenfassung**

- Standardisierung ist der formale Prozess der Regelsetzung und kann auf nationaler (z.B. DIN, VDI) bzw. internationaler (CEN, ISO) Ebene erfolgen.
- Standards definieren Parameter eines Produkts oder Prozesses, die erfüllt sein müssen, um zu einer richtigen, präzisen Messung, d.h. zu korrekten, vergleichbaren und reproduzierbaren Artenlisten beim Biodiversitätsmonitoring, zu kommen.
- Insbesondere für neue Technologien erhöhen Mindeststandards die Akzeptanz und sorgen für qualitätsgesicherte Daten.

## 4 DNA-basierte Methoden zur Erfassung der Biodiversität

DNA-basierte Methoden zur zeitlichen und räumlichen Erfassung der Biodiversität haben sich in den letzten zwei Jahrzehnten rasant entwickelt. Insbesondere die Technik des Metabarcodings hat für die Generierung von qualitativen Arten- bzw. Taxalisten für das behördliche Monitoring großes Potenzial. Die Arten- und Taxalisten können dabei aus komplexen „Bulk“-Proben (Sammelproben wie z.B. Insektenfallen oder Netzfänge) aber auch direkt aus Umweltproben wie Wasser, Boden oder Sediment und Luft basierend auf Umwelt-DNA (eDNA, engl. environmental DNA) generiert werden (Box 2). DNA-basierte Analysen können technisch einfach hochskaliert werden. Das bedeutet, dass eine große Anzahl von Proben, selbst viele Tausende Sammelproben mit Zehntausenden Individuen, in Tagen bis Wochen prozessiert werden können. Auch können viele Organismen schnell auf Artniveau bestimmt werden, für die eine Bestimmung anhand äußerlicher Merkmale schwierig oder unmöglich wäre.

Daneben bietet Metabarcoding Einsichten in Diversitätsmetriken von Gemeinschaften ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Diversität), die genetische Variation einzelner Arten einer Mischprobe und die Interaktion von Arten in einer Gemeinschaft (z.B. über Metabarcoding von Darminhalt).

### Box 2: Probenkategorien für das DNA-Metabarcoding

Probenkategorien für das Metabarcoding werden grob in „Bulk“-Proben (Sammelproben aus biologischen Gemeinschaften, z.B. Fänge von Malaisefallen etc.) und in Umwelt-DNA-Proben (eDNA-Proben) eingeteilt. Für diese weit gefassten Kategorien gibt es zahlreiche Definitionen, die sich insbesondere im Hinblick auf Mikroorganismen stark überschneiden. In diesem Dokument definieren die Autor\*innen sie wie folgt:

**Bulk-Proben** bestehen aus konservierten Organismen, die bereits aus ihrem Substrat entfernt und konserviert wurden (z.B. eine Makrozoobenthos-Probe, die für Analysen gemäß Wasserrahmenrichtlinie genommen wurde, oder ein Glas mit Insektenkörpern aus einer Malaisefalle). Ziel der standardisierten Probenahme von Bulk-Proben ist es, sicherzustellen, dass die DNA aller Organismen für das Metabarcoding erhalten bleiben.

**Umwelt-DNA-Proben** bestehen aus einer Umweltmatrix, die DNA der Zieltaxa enthält (z.B. Boden, Wasser- und Luftfiltrate, Darminhalt). Ziel der Standardisierung ist es, sicherzustellen, dass die DNA-Spuren aus der Umweltmatrix für das Metabarcoding geeignet sind, wobei auch kleine Organismen aus dem Substrat erhalten bleiben.

Für die Bestimmung zahlreicher Organismen in einer Probe ist das Metabarcoding in der Wissenschaft eine etablierte Methode. Grundlage der Methode ist die Tatsache, dass unterschiedliche Arten sich genetisch unterscheiden. Über das Sequenzieren, also das „Auslesen“ eines charakteristischen Abschnitts im Erbgut der Organismen, dem sogenannten DNA-Barcode, kann die Identität eines Organismus durch Abgleich mit einer Referenzdatenbank erfolgen. Beim Metabarcoding geschieht dies für zahlreiche Organismen gleichzeitig. Die Prozesskette ist aus folgenden Komponenten aufgebaut (Abb. 3):

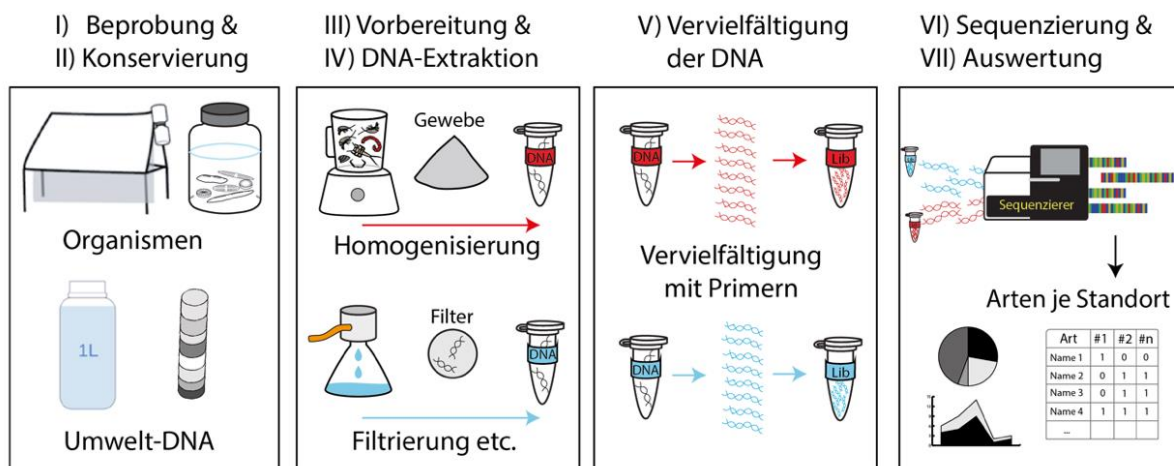


Abb. 3: Übersicht über die Schritte des DNA-Metabarcodings. (© Leese, Universität Duisburg-Essen)

**I) Probenahme:** Ausgangspunkt der Analysen ist die Probenahme von Organismen in der Umwelt. Dies kann mit spezifischen Fallen oder Netzen erfolgen. Alternativ kann auch direkt eine Boden-, Sediment-, Wasser-, Luftprobe oder auch andere, z.B. pflanzliche/tierische Proben (siehe Tab. 1), genutzt werden, aus der die DNA ohne Sortieren gewonnen wird (sog. eDNA) (Abb. 4).

**II) Konservierung:** Das Probenmaterial muss geeignet konserviert werden, damit die DNA für die Laboruntersuchungen in guter Qualität erhalten bleibt. Dies kann durch Trocknen, Frieren oder Fixierung in entsprechenden Konservierungs- oder Lagermedien erfolgen.

**III) Probenvorbereitung:** Im Labor müssen die Proben unter reinen (idealerweise Ziel-DNA-freien) Bedingungen für die Analysen vorbereitet werden. Dies bedeutet, dass z.B. die Organismen größenfraktioniert und mechanisch homogenisiert werden müssen. Bei eDNA-Proben müssen z.B. die Filtermembranen zerkleinert oder Sedimentproben aliquotiert werden.

**IV) DNA-Extraktion:** Die DNA muss mit geeigneten Methoden aus den Proben isoliert und aufgereinigt werden. Hierzu gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher, bereits etablierter Verfahren und Verfahrensbeschreibungen.

**V) Vervielfältigung der DNA:** DNA-Barcodes, die eine eindeutige Zuordnung der Arten erlauben, müssen enzymatisch für möglichst alle in der Probe vorliegenden Arten vervielfältigt werden. Dies geschieht durch die Polymerasekettenreaktion (PCR). Diese Amplifikation ist nötig, damit genug Kopien für eine anschließende Hochdurchsatzsequenzierung vorliegen.

**VI) Sequenzierung:** Die PCR-amplifizierten DNA-Barcodes der unterschiedlichen Organismen einer Probe werden auf einem Hochdurchsatzsequenzierer ausgelesen. Für jede Probe werden bis zu mehrere Millionen Sequenzen generiert, um möglichst alle Taxa zu erfassen (klein und groß, häufig und selten).

**VII) Auswertung:** Um von den Rohdaten (Sequenzen aus Schritt VI) zu Artenlisten zu kommen, müssen die Sequenzen überprüft und nach bestimmten informatischen Kriterien (Signal vs. Rauschen) gefiltert sowie nach Ähnlichkeit zusammengefasst werden. Die qualitätsgeprüften Sequenzen werden anschließend gegen eine Referenz-Datenbank abgeglichen. In diesem letzten Schritt entstehen Arten- bzw. Taxalisten.

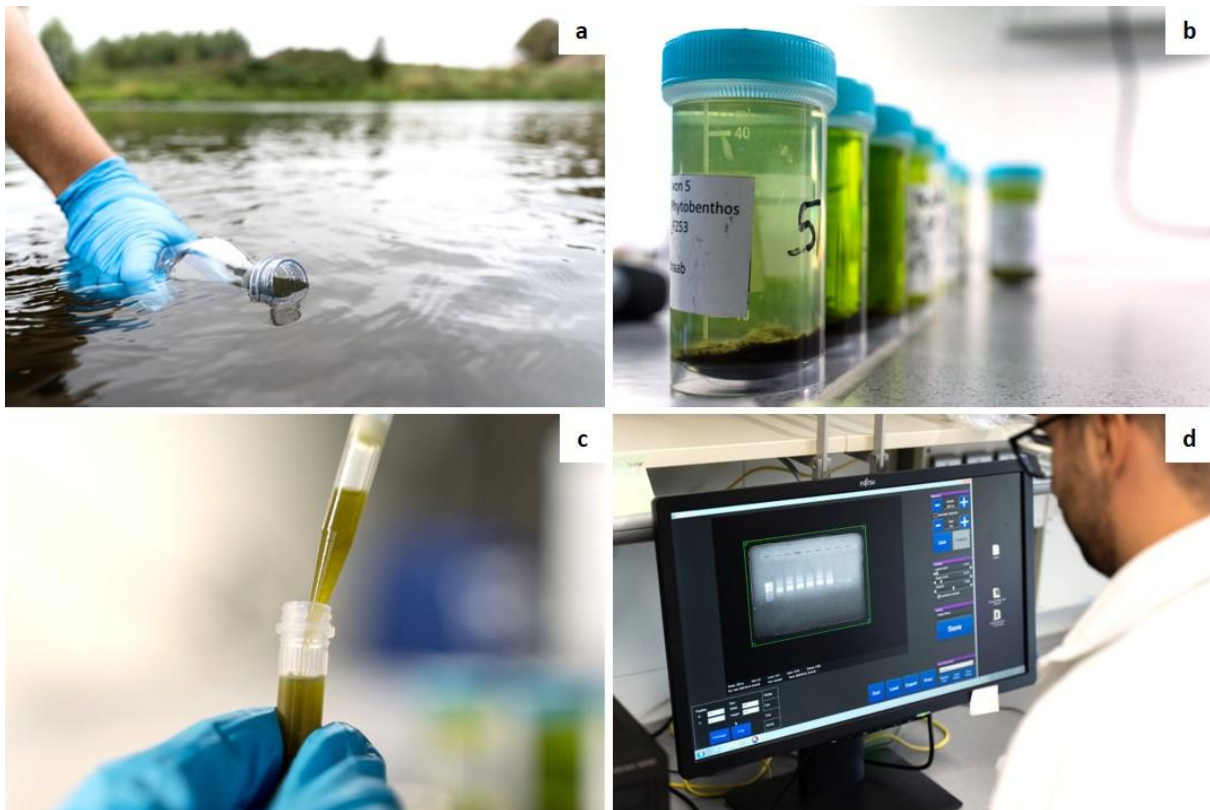


Abb. 4: Beispielbilder für Probenahme von Umweltproben und Probenaufbereitung für die Sequenzierung. a) Wasserprobenahme für anschließende Umwelt-DNA-Analyse, b) Phytobenthosprobe, die mit Hilfe einer Zahnbürste von Steinen gewonnen wurde und in Ethanol lagert, c) Vorbereitung der DNA-Isolation aus einer Phytobenthosprobe, d) Erfolgskontrolle einer Polymerasekettenreaktion mit Hilfe eines Agarose-Gels und UV-Licht im Labor. (© Till-Hendrik Macher, GeDNA-Projekt)

### Zusammenfassung

- DNA-Metabarcoding bezeichnet die Analyse der Artenvielfalt in Sammelproben (z.B. aus Insektenfallen oder Netzfängen) oder Umweltproben (z.B. Wasser, Boden) durch Hochdurchsatzsequenzierung von DNA-Barcodes aus der Probe.
- Das Metabarcoding-Verfahren folgt einer klar definierten Prozesskette von Probenahme bis zur Artenliste, bei der zahlreiche Parameter variiert werden können.



## 5 Probenahme für genetische Untersuchungen

Probenahmen müssen gut geplant und dokumentiert sein, da Qualität und Umfang der Proben die Voraussetzung für plausible und repräsentative Daten der Umweltbeobachtung sind und Metadaten zentral für die langfristige Probenarchivierung sind (z.B. in einem Museum oder einer Umweltprobenbank). Fehler beim Design des Probenahmeschemas sowie während der Probenahme sind nicht revidierbar und ziehen sich bis zur Ergebnisangabe durch. Die gründliche Auswahl einer geeigneten Methode und der erforderlichen Anzahl von Messstellen und Messzeitpunkten sind für den Erfolg der Probenahme und der späteren Analysen daher entscheidend.

Ein wichtiger Baustein für den Einsatz genetischer Methoden im behördlichen Monitoring sind vereinheitlichte und validierte Probenahmemethoden. Im behördlichen Monitoring werden bereits Erhebungen in Wasser, Boden, Luft sowie der Biodiversität nach standardisierten Methoden im Rahmen des klassischen Monitorings durchgeführt (siehe standardisierte Arbeitsanweisungen für Insektenmonitoring oder WRRL ANNEX V).

Die gängigen Probenahmeverfahren im behördlichen Monitoring sind teilweise auch für DNA-basierte Untersuchungen geeignet, inklusive Probenkonservierung und -lagerung (siehe Tab. 1). Häufig besteht aber noch Forschungsbedarf zur Identifizierung geeigneter Lösungen. Ein zentraler Aspekt ist die Stabilität der DNA in der Probe (Box 3). Bereits geringfügige Änderungen eines Probenahmeprotokolls können die DNA-Konservierung und die Eignung der Proben für das Metabarcoding beeinflussen, beispielweise durch unterschiedliche chemische Konservierung oder Probenlagerung.

Die Anpassung und Standardisierung der Probenahmeverfahren für das Metabarcoding soll sicherstellen, dass 1) die aus einer Probe gewonnene DNA für das Metabarcoding während der vorübergehenden Probelagerung nicht abgebaut wird und 2) quantitativ und qualitativ ähnliche DNA-Extrakte aus Proben gewonnen werden.

### Box 3: Probenqualität und DNA-Metabarcoding

Die Eignung einer Probe für das Metabarcoding wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst:

**DNA-Abbau:** Die DNA kann vor oder während der Probenahme, der Vorbereitung oder der Probenkonservierung abgebaut werden, wodurch sich die DNA-Quantität und Qualität in einer Probe erheblich verringert. Der Abbau geschieht aufgrund regulärer physiko-chemischer Prozesse (Hydrolyse, UV-Licht). Aber auch biologische Prozesse sind relevant. DNA enthält große Mengen an Phosphor, einem essenziellen und oft limitierenden Nährstoff für Lebewesen. Folglich sind Mikroorganismen sehr effizient darin, Phosphor aus DNA-Proben zu nutzen, wenn die Konservierung das mikrobielle Wachstum nicht unterbindet.

**Verunreinigung:** Alle Organismen besitzen DNA. Entsprechend ist eine Kontamination der Proben durch Fremd-DNA während und nach der Probenahme leicht möglich, wenn die Proben mit Organismen von außerhalb der Probestelle oder Spuren dieser (z.B. Pollen oder Pilzsporen, Körperteile, Zellreste) in Kontakt kommen sowie wenn unsauber bei der Probenahme oder -prozessierung gearbeitet wird. Eine Kontamination durch Fremd-DNA kann für bestimmte Probentypen mehr oder weniger relevant sein, abhängig von der allgemeinen DNA-Konzentration in einer Probe (Proben mit höheren autochthonen DNA-

Mengen sind schwerer zu kontaminieren bzw. die große Verdünnung führt dazu, dass keine falsch-positiven Nachweise auftreten) und den Zielarten (die Kontamination ist geringer, wenn die Proben in Umgebungen verarbeitet werden, in denen keine Zielarten oder deren DNA vorkommen).

**Enzymatische Hemmstoffe:** Das Metabarcoding beruht auf einer enzymatischen Vervielfältigung von DNA-Barcodes aus der Proben-DNA (siehe Kapitel 4). Proben enthalten oft Substanzen, die die Effizienz des Amplifikationsenzym einschränken. Verschiedene Probentypen und Probenahmeverfahren sind unterschiedlich empfindlich gegenüber Analyse-hemmenden Substanzen (sog. Inhibitoren).

Bulk-Proben mehrerer Zieltaxa können bereits durch Anpassung bestehender internationaler Normen (ISO, CEN) für das Metabarcoding beprobt werden. Internationale Normen beschreiben beispielsweise die Probenahmen der wichtigsten Gruppen wirbelloser Bodeninvertebraten (z.B. die Normen DIN ISO 10381, DIN EN ISO 23611 des ISO/TC 190 Bodenbeschaffenheit, Meeres- und Süßwassermakrofauna (z.B. DIN EN ISO 10870, DIN EN ISO 16665 des ISO TC 147 Wasserbeschaffenheit) oder benthischer Süßwasserkieselalgen (DIN EN 13946 des CEN/TC 230 Wasseranalytik). Es existiert auch eine CEN-Norm für den Nachweis allergener Pollen und Pilzsporen in Luftproben (DIN EN 16868 des CEN/TC 264 Luftbeschaffenheit). HelCom-Protokolle der sog. Helsinki-Kommission beschreiben, wie diverse biotische und abiotische Proben der Ostsee zu nehmen sind (<https://helcom.fi/action-areas/monitoring-and-assessment/monitoring-manual/>). Der Schwerpunkt dieser Normen liegt auf bislang morphologiebasierten Identifizierungen. Mehrere Normen und weithin angewandte Standardarbeitsanweisungen sind bereits auf DNA-Endpunkte ausgerichtet. So existiert eine ISO-Norm für die Extraktion mikrobieller Boden-DNA, die für die Entnahme von Boden-eDNA für andere Gruppen angepasst werden kann (DIN EN ISO 11063 des ISO/TC 190 Bodenbeschaffenheit). Ähnliches gilt für Probenahmestandards bei Diatomeen und Makrozoobenthos. Ferner hat das Europäische Zentrum für Bodendaten bereits Erfahrungen mit Metabarcoding im Kontext großräumiger Bodenprobenahmen in seinem europaweiten "Land Use and Coverage Area frame Survey (LUCAS)" gesammelt (<https://esdac.jrc.ec.europa.eu/projects/lucas>). Gleiches gilt für das Monitoring der Donau durch die Internationale Kommission zum Schutz der Donau (IKSD). Im vierten internationalen Joint Danube Survey wurden klassische und DNA-basierte Analysen erfolgreich parallel durchgeführt (<https://www.danubesurvey.org/jds4/>). In diesem Kontext wurde Anfang 2022 der Normentwurf für die Probenahme aquatischer eDNA veröffentlicht (DIN EN 17805). Diese standardisierten Verfahren berücksichtigen ausdrücklich die DNA-basierte taxonomische Identifizierung, aber sie müssen für konkrete Monitoringprogramme noch erweitert, angepasst, bzw. spezifiziert werden.

Tab. 1: Eignung gängiger gegenwärtiger und zukünftiger Probentypen für das DNA-Metabarcoding und Forschungsbedarf. Expert\*innen-Bewertung. Eignung hoch: dunkelblau; mittel: blau; niedrig: hellblau; Forschungsbedarf hoch: braun; mittel: orange; niedrig: gelb. \* eDNA.

	Probentyp	Probenahme		Probenkonservierung		Langzeitlagerung	
		Eignung	Forschungsbedarf	Eignung	Forschungsbedarf	Eignung	Forschungsbedarf
<b>Heutiges Monitoring</b>	Bodeninvertebraten	hoch	niedrig	mittel	mittel	mittel	hoch
	Boden-Mikroorganismen	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig
	Makrozoobenthos, Süßwasser Phyto­benthos und -plankton	hoch	niedrig	hoch	mittel	hoch	mittel
	Benthische Diatomeen	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig
	Fische / Amphibien *	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig
	Pollen	hoch	mittel	hoch	hoch	hoch	mittel
<b>Zukünftiges Monitoring</b>	Flug- und epigäische Insekten	hoch	hoch	hoch	mittel	niedrig	hoch
	Pollen- oder Pflanzenspuren auf Insekten *	hoch	hoch	hoch	mittel	hoch	mittel
	Spuren von Insekten auf Pflanzen *	mittel	hoch	mittel	hoch	mittel	hoch
	Gewölle / Kot *	mittel	mittel	hoch	niedrig	hoch	niedrig
	Grundwasserfauna, Süßwasser, Meiofauna	hoch	hoch	hoch	mittel	mittel	hoch
	Wasser (gesamt eDNA)	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig
	Sediment (gesamt eDNA)	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig

## Herausforderungen

Die große Anzahl bereits ausgewählter und zukünftiger Probentypen (siehe Tab. 1) von eDNA aus Boden bis zu Pilzsporen aus der Luft stellt die größte Herausforderung für eine Standardisierung dar. Bestehende Probenahmestrategien müssen für jeden Probentyp berücksichtigt werden, auch wenn für manche noch keine internationalen oder allgemein anerkannten Standardverfahren existieren. Folglich müssen standardisierte Probenahmeverfahren problem-spezifisch in Zusammenarbeit von Metabarcoding- sowie wissenschaftlichen und behördlichen Monitoring-Expert\*innen entwickelt werden. Diese Entwicklung muss neben den praktischen Aspekten der eigentlichen Probenahme und Probenkonservierung auch Aspekte der Versuchsplanung (z.B. technische Replikation, räumliche und zeitliche Abdeckung) berücksichtigen.

Eine besondere Herausforderung im Zusammenhang mit der Probenahme für das DNA-basierte Biodiversitätsmonitoring ist die Langzeitlagerung von Proben bzw. DNA-Extrakten. Eine geeignete Langzeitlagerung kann für die Qualitätssicherung und künftige Forschung von großer Bedeutung sein. Die derzeitige Praxis ist heterogen und hängt von behördlichen Vorgaben bzw. auch der konkreten Verfügbarkeit von Lagerflächen und Expertisen ab. Während DNA-Extrakte ein begrenztes Volumen haben und in der Regel über lange Zeiträume hinweg

gefroren oder gefriergetrocknet aufbewahrt werden können, so stellen die zu erwartenden Volumina von Bulk-Proben aus Monitoringprogrammen, mit oft vielen großvolumigen Gefäßen, für viele Institutionen eine große logistische Herausforderung dar.

Wichtige Aspekte für die Langzeitlagerung sind Medium und Temperatur, verteilte/ausfallsichere Lagerung, Kuratierung, Probenbeschriftung und Verknüpfung mit verschiedenen Datenbanken (Taxonomie, Barcodes, Veröffentlichungen). Da die Langzeitlagerung arbeits- und aufwandsintensiv ist, müssen die Standardisierungsbemühungen auch die oft begrenzten Ressourcen hinsichtlich vorhandener Finanzmittel und Arbeitszeit berücksichtigen.

Die Dokumentation der Metadaten ist bei der Probenahme ein entscheidender Aspekt. Metadaten beschreiben verschiedene Eigenschaften von Metabarcoding-Proben, wie z.B. Zielorganismen, Probenvolumen, die Fläche, die eine Probe repräsentiert, Entnahmemethode, Fangmedium, Konservierungsmethode, Probebehälter, Datum der Probenahme, Koordinaten etc. Die Metadaten werden von den am Projekt beteiligten Akteur\*innen individuell erhoben. Die Eingliederung von Metabarcoding als Methode des behördlichen Monitorings erfordert jedoch eine standardisierte Erfassung, Speicherung und gemeinsame Nutzung von Metadaten gemäß den FAIR-Prinzipien für Daten. Dies ist für die Inventarisierung, den Vergleich und die Wiederverwendung von Proben und zugehörigen Ergebnissen unerlässlich. Die Sammlung von Metadaten sollte gemäß den bestehenden Open-Source-Metadatenstandards für Biodiversitätsforschung erfolgen (<https://tdwg.org/>).

### **Forschungs- und Kommunikationsbedarf**

Die Vielfalt an Probentypen und Probenahmestrategien ist bei Bulk-Proben (siehe Tab. 1) besonders groß. Damit das Metabarcoding eine breite und qualitätsgesicherte Anwendung findet und zu vergleichbaren Ergebnissen führt, müssen Mindeststandards angepasst oder neu entwickelt werden, die den Besonderheiten der einzelnen Probentypen und Probenahmeverfahren Rechnung tragen (siehe oben). Es gibt zahlreiche Aspekte, die bei der Standardisierung für jede Art von Bulk-Proben zu berücksichtigen sind (z.B. Masse/Volumen), die für die DNA-Extraktion erforderlich sind (die DNA-Extraktion erfolgt im Allgemeinen aus relativ begrenzten Probenvolumina), Größensortierung, Reinigung vor der Homogenisierung (z.B. Entfernung von Steinen), Aufteilung der Probe in technische Replikate sowie Proben-Homogenisierung. Auch die Konservierung der Proben muss für jeden Probentyp vor der Verarbeitung im Labor festgelegt werden; etwa hinsichtlich der Konzentration und Zusammensetzung der Tötungs- und Konservierungsflüssigkeiten bzw. der Notwendigkeit des späteren Einfrierens oder Trocknens.

eDNA-Proben weisen im Allgemeinen geringe DNA-Konzentrationen im Vergleich zum gesamten Substratvolumen auf und sind daher anfälliger für Kontaminationen mit DNA von Nicht-Zieltaxa. In den Mindeststandards für eDNA sollten daher allgemeine Strategien zur Kontaminationskontrolle bei der Probenahme beschrieben werden, z.B. hinsichtlich der Einbeziehung von Negativ- und Positivkontrollen bei der Probenahme, der Verwendung von Kontaminationsmarkern, sowie der Erstellung von Empfehlungen für die Handhabung oder die Vermeidung von Kreuzkontaminationen. Hier kann auf den neuen CEN-Standard EN 17805 aufgebaut werden.

Grundsätzlich ist ein Austausch zwischen den Fachleuten der Probenahme, der Laboruntersuchungen sowie der Planung der Monitoringprogramme unerlässlich, damit die entwickelten Methoden in den Routinebetrieb integrierbar, d.h. praxisnah, sind. Eine standardisierte Terminologie erleichtert dabei die Kommunikation zwischen Expert\*innen mit unterschiedlichem Hintergrund. Dies gilt auch für die nachgeordneten Analysen. Beispiele für

eine standardisierte Terminologie gibt es für das Biomonitoring von Boden (ISO 11074) und Wasser (ISO 6107).

### Zusammenfassung

- Die Probenahme ist ein entscheidender Schritt, weil Fehler hier auf alle nachfolgenden Schritte der Prozesskette wirken.
- Aktuelle Probenahmen im behördlichen Monitoring sind zum Teil bereits für DNA-Analysen kompatibel, teils müssen jedoch die Probenahmemethoden und -strategien angepasst werden.
- Alle relevanten Informationen der Probenahme müssen standardisiert protokolliert werden, da sie auf die Analyse Auswirkungen haben.
- Forschungsbedarf besteht hinsichtlich der Ausweisung konkreter Arbeitsschritte für die unterschiedlichen Probentypen sowie bzgl. der Langzeitlagerung der Proben.

## 6 Laboranalyse DNA-Metabarcoding

Nach der Probenahme umfasst die Generierung von Metabarcoding-Daten zwei grundsätzliche Arbeitsschritte: 1) die Laborarbeit und 2) die Analyse der generierten Sequenzdaten. Diese beiden Arbeitsschritte umfassen wiederum viele Einzelschritte, welche gut dokumentiert werden müssen. Beispielsweise beinhaltet die Laborarbeit die Isolation der DNA aus der Probe, die Amplifikation der isolierten DNA über PCR, die anschließende Markierung der Einzelproben mit charakteristischen Kennsequenzen (sog. Indexe) und die folgende Hochdurchsatzsequenzierung. Jeder dieser Arbeitsschritte kann durch verschiedene Zwischenschritte und Modifikationen der Reaktionsbedingungen erweitert werden, um die Methodik z.B. für eine bestimmte Probenart (Wasser- vs. Bodenprobe, Malaisefallen- vs. Makrozoobenthos-Mischprobe etc.) oder taxonomische Gruppe (Wirbeltiere, Insekten, Weichtiere etc.) zu optimieren. Auch werden aktuell sehr viele verschiedene Reagenzien für die jeweiligen Arbeitsschritte angeboten und verwendet. Daraus ergibt sich rein kombinatorisch ein extrem komplexes Bild zahlloser Verfahrensbeschreibungen, die derzeit für das Metabarcoding verwendet werden.

Viele der in Metabarcoding-Verfahrensbeschreibungen verwendeten Methoden und Arbeitsschritte sind sehr robust gegenüber Variationen, z.B. erzielen unterschiedliche DNA-Polymerasen oder Primer vergleichbare Ergebnisse (Abb. 5). Verschiedene Metabarcoding-Verfahrensbeschreibungen können identische Taxalisten erzeugen, solange einige grundsätzliche Arbeitsschritte befolgt werden. Abweichungen sind insbesondere bei seltenen Arten anzutreffen. Eine gute Übersicht über besonders sensitive Arbeitsschritte bieten bereits vorhandene Leitfäden (siehe z.B. <https://doi.org/10.3897/ab.e68634>, <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-1884>, <https://www.gedna.de/data/>).

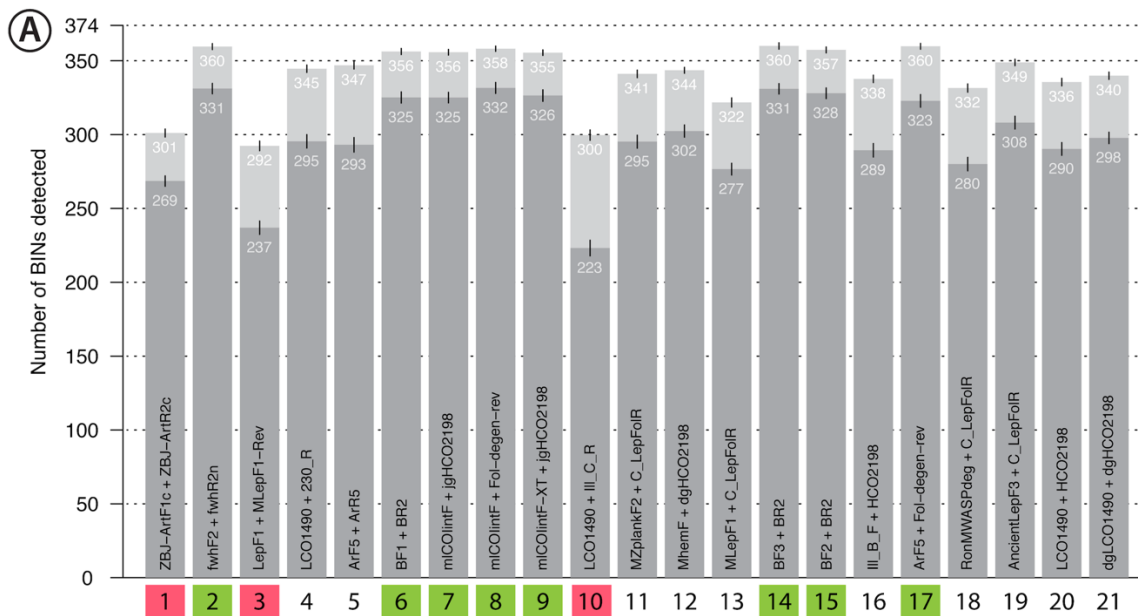


Abb. 5: Unterschiedliche Primerkombinationen (X-Achse) zeigen zwar unterschiedliche Nachweise der insgesamt 374 möglichen Zielarten, aber viele kommen zu sehr ähnlichen Ergebnissen, was die Robustheit von Metabarcoding-Verfahrensbeschreibungen gegenüber Variation zeigt. Die Primerkombinationen in Grün sind besonders geeignet, die in Rot besonders ungeeignet. (Quelle: aus Elbrecht et al. 2021; <https://peerj.com/articles/7745/#fig-4>)

Aufgrund dieser grundsätzlichen Robustheit ist eine strenge Standardisierung einzelner Arbeitsschritte bei vielen Analysen nicht notwendig. Insgesamt ist eine flexible Gestaltung der Laborarbeit und Datenanalyse durch verschiedene Labore akzeptabel. Ausnahmen stellen z.B. Metabarcoding-Analysen von Pollen aus der Luft dar, weil hier bereits geringe Abweichungen der Methodik zu großen Änderungen in den Taxalisten führen. Sofern aber mit einer Methode eine akkurate Taxaliste generiert werden kann, ist eine Verfahrensbeschreibung für das behördliche Metabarcoding als geeignet anzusehen (ergebnisorientierter Ansatz). Anstelle der Vorgabe exakter und kleinteiliger Verfahrensbeschreibungen im Metabarcoding sollte eine Überprüfung der erzeugten Ergebnisse auf Vergleichbarkeit, Dokumentation der Arbeitsschritte und Verwendung geeigneter Kontrollen (Reproduzierbarkeit, Messgenauigkeit) als wichtigster Qualitätsstandard im Metabarcoding betrachtet werden (siehe Kapitel 8).

### **Herausforderungen und Lösungsansätze**

Hauptherausforderung ist es, langfristig vergleichbare, richtige und genaue Artenlisten mit Metabarcoding zu erzeugen. Einige grundsätzliche Arbeitsschritte werden aber als besonders wichtig angesehen. Die hier identifizierten Mindestanforderungen an Metabarcoding-Verfahrensbeschreibungen beziehen sich hauptsächlich auf die Überprüfbarkeit und Plausibilisierung der generierten Metabarcoding-Daten und nicht auf Details einzelner Arbeitsschritte. Dazu gehört insbesondere:

- Die Verwendung von Negativkontrollen in allen Arbeitsschritten (DNA-Isolation, PCR-Amplifikation) wird als essentiell betrachtet, um Kontaminationen im Arbeitsablauf zu identifizieren. Eine standardisierte Handhabung, insbesondere auch wie mit Sequenzen in den Negativkontrollen umgegangen wird, bzw. ab wann eine Probe insgesamt verworfen wird, wird benötigt.
- Für besonders sensible Analysen, wie z.B. Pollenanalysen oder Pollenspuren auf Insekten oder Kot- und Mageninhaltsanalysen, ist auf besonders reine Arbeitsbedingungen zu achten.
- Auf eine probenspezifisch ausreichende Sequenziertiefe ist zu achten, insbesondere bei eDNA-Analysen und individuenreichen Bulk-Proben.
- Technische und biologische Replikation einzelner Arbeitsschritte kann die Genauigkeit der Ergebnisse erheblich verbessern. Seltene Taxa werden unter Umständen nur mit mehreren Replikaten nachgewiesen. Entsprechend sind konkrete Empfehlungen für die minimale technische bzw. biologische Replikation probetypspezifisch zu entwickeln.
- Besonders wichtig sind die genaue Dokumentation der Arbeitsabläufe und Ergebnisse gemäß der FAIR-Prinzipien und Empfehlungen zur Guten Laborpraxis (GLP). Hierzu sind probenspezifische Formulierungen von Mindestanforderungen für die Publikation der Ergebnisse und verwendeten Arbeitsschritte im behördlichen Metabarcoding empfehlenswert.
- Die Einlagerung der verwendeten Proben, bzw. Aliquots dieser, in Biobanken wird mit Nachdruck empfohlen, um eine spätere Überprüfung zu ermöglichen.
- Ggf. probenspezifische Empfehlungen zur Wahl geeigneter Primerkombinationen oder Reagenzien zur Vermeidung der Inhibition enzymatischer Reaktionen.
- Die Plausibilisierung von Ergebnissen mittels Positivkontrollen und/oder „Mock Communities“, also künstlichen Artengemeinschaften mit bekannter taxonomischer Zusammensetzung, wird empfohlen. Eine solche Mock-Community erlaubt es, die taxonomische

Genauigkeit einer Verfahrensbeschreibung umfassend zu testen und validieren (siehe Kapitel 8).

- Ringversuche sind sinnvolle standardisierte Verfahren der Qualitätssicherung, um die Eignung von Analyselaboren zu prüfen, ohne diesen spezifische Arbeitsabläufe notwendigerweise vorzuschreiben. So könnten z.B. für Metabarcoding-Analysen im behördlichen Monitoring nur zertifizierte Labore zugelassen werden, die eine von einem Referenzlabor ausgegebene, unbekannte Mock-Community richtig charakterisieren.

### **Forschungs- und Umsetzungsbedarf**

Forschungsbedarf besteht hinsichtlich quantitativer Ergebnisse DNA-basierter Biodiversitätsanalysen. Während Metabarcoding bereits heute akkurate qualitative Taxalisten generiert, gilt es zukünftig weitere Forschungsarbeiten auf die Generierung von Abundanz- oder Biomasseinformationen für Taxa zu konzentrieren. Hier gibt es methodische Ansätze z.B. über die Verwendung interner Standards zur Kalibrierung. Großes Potenzial wird insbesondere auch darin gesehen, quantitative Informationen durch Kombination von Metabarcoding mit weiteren neuen Monitoringmethoden, insbesondere der automatischen Bilderkennung bei Bulk-Proben, zu erhalten. An diesen Schnittstellen besteht großer Forschungs- und Entwicklungsbedarf. Auch die Rekonstruktion biotischer Interaktionen mittels Metabarcoding ist ein wichtiges Ziel für zukünftige Forschung. Ein umfassendes Verständnis der komplexen Abhängigkeiten verschiedener Organismen in einem Ökosystem ist essentiell für effektiven Naturschutz und den Nutzen DNA-basierter Daten.

Weniger Forschungs- als Umsetzungsbedarf besteht bei der Entwicklung von Mindestanforderungen, um qualitätsgesicherte, vergleichbare und überprüfbare Ergebnisse für das behördliche Metabarcoding zu garantieren. Dazu gehören beispielsweise die Entwicklung einheitlicher Standards in der Dokumentation und Veröffentlichung von Ergebnissen und Arbeitsabläufen für behördliche Praxis und Forschung. Ansätze hierzu gibt es z.B. im Kontext von NFDI4Biodiversity (Box 4). Eine zukünftige Herausforderung ist die Entwicklung von diversen Mock-Communities für verschiedene taxonomische Gruppen, die es erlauben, die Messgenauigkeit zu überprüfen. Für in Deutschland eher artenarme Gruppen, wie z.B. Fische, ist das verhältnismäßig einfach. Für Gruppen wie Insekten, mit über 30.000 heimischen Arten, ist die Erstellung einer umfassenden Mock-Community dagegen schwierig und müsste sich zur Qualitätssicherung auf eine repräsentative Stichprobe fokussieren (siehe z.B. Abb. 5). Alternativ oder in Ergänzung könnte die Etablierung von Ringversuchen zur Eignungsprüfung von Laboren für das behördliche Monitoring eine wichtige zukünftige Aufgabe sein (siehe Kapitel 8).



## Zusammenfassung

- Die Laborarbeit und Analyse der generierten Daten sind zwei essentielle Schritte im Metabarcoding, bei der bei Nichtbeachtung wichtiger Aspekte fehlerhafte Daten entstehen.
- Verschiedene Metabarcoding-Protokolle können methodisch erheblich voneinander abweichen, aber dennoch akkurate Taxalisten generieren. Die große Diversität verwendeter Verfahrensbeschreibungen verlangt die Einführung von Mindestanforderungen zur Qualitätssicherung der Daten.
- Die Dokumentation der Arbeitsschritte inkl. benötigter Metadaten ist für die Nachnutzung der Daten entscheidend.

## 7 Datenbanken

Referenzdatenbanken spielen eine zentrale Rolle in DNA-basierten Biodiversitätsanalysen. Erst die korrekte taxonomische Zuordnung einer Metabarcodingsequenz aus der gesammelten Probe zu einem DNA-Barcode in der Referenzdatenbank erlaubt eine sichere Artbestimmung. Die Qualität dieser Artbestimmung ist somit unabdingbar von der Qualität und dem Umfang der DNA-Barcode-Referenzdatenbanken abhängig. Je nach Organismengruppe existieren unterschiedliche Datenbanken für zudem auch unterschiedliche genetische Marker. Wissenschaft und Behörden haben dabei unterschiedliche Ansprüche an Referenzdatenbanken. Behördliche Biodiversitätsanalysen unterliegen oft anderen Fragestellungen und strengen gesetzlichen Rahmenbedingungen (Rechtsverbindlichkeit). In der Forschung können auch Daten mit größerer Messunsicherheit für Biodiversitäts- und Trendanalysen genutzt werden.

Für den Einsatz von DNA-Barcode-Referenzdatenbanken im Rahmen eines behördlichen Monitorings sollten verschiedene Voraussetzungen als klare Vorgaben (=Standards) erfüllt werden. Die Referenzdatenbanken sollten:

- die Umsetzung der FAIR-Prinzipien für Daten ermöglichen,
- taxonomisch sowie nomenklatorisch kuratiert werden (ständige Qualitätssicherung und -kontrolle findet statt),
- Rohdaten und entsprechende Metadatenbeschreibung enthalten, sowie wo möglich auf Belegmaterial verweisen,
- die Transparenz der Kriterien für die Erstellung der in der Datenbank hinterlegten/bereitgestellten Einträge gewährleisten,
- zitierfähige Einträge enthalten (z.B. via DOI).

Neben öffentlichen Datenbanken werden auch nicht öffentliche, z.B. selbst erstellte Datenbanken verwendet, dies gilt insbesondere in der Forschung. Wenn diese zur Artbestimmung für Monitoringzwecke herangezogen werden, sollten sie zumindest mit einem DOI und einer kurzen Metadatenbeschreibung versehen werden.

### Herausforderung

Ein Blick auf die verwendeten Datenbanken zeigt, dass sich diese hinsichtlich Organismengruppen, Qualitätssicherung, geografischer Abdeckung, Vollständigkeit und verfügbarer Metadaten stark unterscheiden (Tab. 2). Sind für Wirbeltiere und das mitochondriale Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit 1-Gen (COI) die Daten zum Beispiel für europäische Taxa sehr gut in BOLD (Barcode Of Life Data Systems) erfasst, so sind diese für Mikroalgen, Pflanzen sowie Bakterien unzureichend erfasst.

Tab. 2: Übersicht über besonders häufig genutzte Datenbanken in DNA-Metabarcoding-Studien zum Zuweisen taxonomischer Namen zu Sequenzen.

Datenbank	Organismengruppen	Genmarker	Kommentar	Link
BOLD	Insbesondere Tiere	v.a. COI	Ein Großteil der Sequenzen ohne morphologische Validierung	<a href="http://www.boldsystems.org/">http://www.boldsystems.org/</a>
GBOL	Tiere, Pflanzen, Pilze und Diatomeen	z.B. COI, 18S, rbcL, ITS, trnIF/K, matK	Taxonomisch durch Expert*innen sehr gut kuratiert	<a href="https://bolger-many.de">https://bolger-many.de</a>
INSDC	alle Organismengruppen	alle Marker	Ein Großteil der Sequenzen ohne morphologische Validierung	<a href="https://www.insdc.org">https://www.insdc.org</a>
Diat_sys	Diatomeen	v.a. rbcL teilweise 18S SSU	Taxonomisch durch Expert*innen sehr gut kuratiert	<a href="https://www6.inrae.fr/carrtel-collection/Barcoding-database">https://www6.inrae.fr/carrtel-collection/Barcoding-database</a>
SILVA	Bacteria, Archaea und Eukarya	16S/18S, SSU und 23S/28S, LSU	Taxonomisch durch Expert*innen größtenteils gut kuratiert	<a href="https://www.arb-silva.de/">https://www.arb-silva.de/</a>
PR2	Insbesondere Protisten, Fokus marin	18S SSU	Taxonomisch durch Expert*innen größtenteils gut kuratiert	<a href="https://pr2-database.org/">https://pr2-database.org/</a>
UNITE	Eukaryoten, insbesondere Fungi	ITS	Taxonomische Annotation durch die Expert*innen-Gemeinschaft	<a href="https://unite.ut.ee/">https://unite.ut.ee/</a>

Wie der generelle Aufbau der Referenzdatenbanken so sollten auch die zu einzelnen Referenzbarcodes hinterlegten Informationen, die sogenannten Metadaten, klaren Standards folgen, wie sie z.B. durch die Global Biodiversity Information Facility (<https://www.gbif.org>) festgelegt werden (<https://docs.gbif.org/publishing-dna-derived-data/1.0/en/>). Mindestanforderungen an die Datenangaben werden wie folgt festgelegt:

- Probenahmeort (Dokumentation des Probenahmeort: Koordinaten, Habitat, etc.)
- Zeitpunkt bzw. Zeitfenster
- Sammel- / Erhebungsmethode
- Probenart
- Sammler\*in
- Bestimmer\*in und Zeitpunkt der Bestimmung
- ggf. Kultivator\*in
- Laboranalyse (insbesondere Primer und ggf. zusätzlich auch Angaben zu DNA-Extraktion, PCR-Protokollen sowie primäre Analysedaten).

Um die besten Voraussetzungen für eine verlässliche Barcode-Referenzdatenbank zu erreichen, sind zusätzliche Informationen wichtig, insbesondere:

- Anzahl der DNA-Barcodes je Art und geografische Abdeckung
- Expertise Bestimmer\*in
- Barcodes vom Typus-Material, Lebensstadium
- Zugänglichkeit der Voucher/Belege (Voucher müssen vorhanden sein)
- Dokumentation (Fotodokumentation) der Belege.

Anhand dieser Metadaten kann die Verlässlichkeit der Zuweisung eines taxonomischen Namens (im besten Fall des Artnamens) zu einer Sequenz bestimmt werden bzw. bei sich ändernder Taxonomie neu zugeordnet werden.

Neben der Qualitätskontrolle beim Eingang der Referenz-Barcodes und Referenzmetadaten ist es wichtig, die Datenbanken aktuell zu halten. Das betrifft stetige Aktualisierung und Vervollständigung der Informationen zu Taxonomie, Ökologie oder Gefährdung. Auch sollten Synonyme einbezogen werden und Sequenzen neuer Taxonomie angepasst werden. Es ist somit eine stetige Harmonisierung von morphologischen und molekularen Daten und Verschneidung von Synonymen notwendig. Auch Bundestaxalisten, operationelle Taxalisten sowie nomenklatorische/taxonomische Hintergründe sind hier zu berücksichtigen. Die Listen sollten kompatibel mit historischen Daten und Artenlisten sein. Da verschiedene Datenbanken verwendet werden, ist deren Kompatibilität und Interoperabilität ein wichtiger Aspekt. So kann die Datengrundlage für verschiedene Analysen erhöht werden. Leider treten immer wieder Probleme bei der Nutzung und Zusammenführung von Referenzdaten aus unterschiedlichen Datenbanken auf. Hier liegen die Vorteile von NFDI4Biodiversity (Box 4), einem Projekt, das die Erhöhung der Interoperabilität verschiedener Datenbanken (Datenmodelle) zum Ziel hat, denn Kompatibilität ist durch Datenstandards machbar. Wichtige internationale Initiativen in dem Kontext sind die GBIF sowie der Catalogue of Life (<https://www.catalogueoflife.org>). Dabei gilt es als selbstverständlich, dass in Datenbanken wissenschaftliche Namen verwendet werden.

Neben den Referenzdaten ist auch die öffentliche Verfügbarkeit der Referenzproben von großer Bedeutung. Belegindividuen können in naturkundlichen Sammlungen aufbewahrt werden, während molekulare Unterproben (DNA, eDNA, RNA, Gewebe, Zellen, etc.) üblicherweise in Biobanken archiviert werden. Probensammlungen sind nicht nur unverzichtbar, wenn sich die zugrundeliegende Taxonomie der Arten ändert, sondern auch für die allgemeine Nachprüfbarkeit und Erweiterbarkeit von Ergebnissen. Anhand von musealen Organismenproben oder DNA-Proben, die in Biobanken eingefroren werden, kann Jahre später, z.B. wenn sich die Sequenzieretechniken weiterentwickelt haben (oder neue Zielgene genutzt werden), die Kohärenz neuer und alter Erhebungen gewährleistet werden, indem man die neue Analysemethode auf die archivierten Proben ausweitet.

#### **Box 4: NFDI4Biodiversity**

Ein zentrales Netzwerk mit Blick auf das Verfügbarmachen von Biodiversitätsdaten ist NFDI4Biodiversity, welches als Konsortium innerhalb der Nationalen Forschungsdateninfrastruktur (NFDI) agiert. Es ist derzeit auf 10 Jahre angelegt und setzt sich aus rund 100 Partner\*innen zusammen, darunter wissenschaftliche Einrichtungen, Museen, naturkundliche Fachgesellschaften, Landesämter sowie weitere Institute und Expert\*innengruppen im Bereich Biodiversitäts- und Umweltdaten.

Die Zusammenarbeit ist geleitet von dem Wissen, dass Akteur\*innen aus Wissenschaft, Politik, Naturschutz und Landschaftspflege verlässliche Daten benötigen, um bessere Beiträge zum Erhalt der Artenvielfalt erarbeiten zu können. Die Nutzung DNA-basierter Daten ist auch eine wichtige Datenquelle im Rahmen von NFDI4Biodiversity und es werden Richtlinien für den Umgang, die Zugänglichkeit, die Analyse und Vernetzung der Daten in Kooperation mit de.NBI, ELIXIR und GBIF unter Verwendung von TDWG-Standards (ABCD-DNA und DarwinCore) erarbeitet.

NFDI4Biodiversity vernetzt bislang nicht vernetzte Datenbankinfrastrukturen, nicht nur von wissenschaftlichen Einrichtungen, sondern auch von Behörden, Citizen Scientist- und Expert\*innengruppen und harmonisiert Workflows in einem nationalen und internationalen Kontext. So werden weitere Datenbestände und Werkzeuge für eine gemeinschaftliche Nutzung mobilisiert, die für den Nutzer eine vereinfachte Handhabung ermöglicht (z.B. Verlinkung von GBOL-Metabarcodingdaten mit Herkunftsdaten aus GBIF und Rote Liste-Daten). Ferner werden Datenbankwerkzeuge generiert, um Doubletten zu identifizieren, Qualitätsfilter zu implementieren und taxonomische Änderungen in verschiedenen Listen nachvollziehbar und transparent zu machen (z.B. Veränderungen der Taxonomie in den Roten Listen, in GBIF und Co.).

Gleichzeitig bietet NFDI4Biodiversity zahlreiche Workshops sowie Trainings für die Community an und betreibt wichtige Lobbyarbeit für den sicheren und kompetenten Umgang mit Daten, die einer breiten und verantwortungsbewussten Nutzung zugeführt werden sollen. Derzeit gibt es 23 use-cases in NFDI, die entsprechend Zugang zu modernen Technologien und einem umfassenden Bestand an Biodiversitäts- und Umweltdaten durch ihre Arbeit ermöglichen sollen. Zusätzlich liegt ein starker Fokus auf der Entwicklung eines Cloud-basierter Tools (sowohl textbasiert aber auch mit grafischer Benutzeroberfläche), damit Anwender\*innen z.B. Metabarcodingdaten hochladen, mit entsprechender Computing Power schnell analysieren und in den INSDCs (Tab. 2) hinterlegen können und somit die Verbindung zu den Metadaten ermöglicht wird.

Nähere Informationen: <https://www.nfdi4biodiversity.org/>

## Forschungsbedarf und Verstetigung

Um das volle Potenzial DNA-basierter Methoden für das behördliche Monitoring nachhaltig zur erschließen, sind hohe Qualitätsstandards der Datenbankeinträge, ein offener Zugang zu Datenbanken sowie der Abgleich und die Harmonisierung mit internationalen taxonomischen Rahmenbedingungen entscheidend. Für Deutschland ist mit dem German Barcode of Life-Projekt (GBOL) eine wesentliche Grundlage geschaffen (Box 5). Insgesamt ist aber eine langfristige Finanzierung der Datenbankinfrastruktur notwendig, sodass personelle und technische Änderungen mit Blick auf die Nutzbarkeit auch bei Änderungen nomenklatorischer oder technologischer Aspekte gewährleistet sind. Die Instandhaltung umfasst darüber hinaus, wie Datenbanken vorgehalten und verfügbar gemacht werden. Als genereller Maßstab ist es wichtig, dass die Datenbanken gut gesichert, Cloud-basiert und dezentral sind. Ferner sollten Routinefilter implementiert sein, um z.B. bei nicht-plausiblen Einträgen (Habitat, Geografie) entsprechende Warnmeldungen auszugeben. Wichtige wissenschaftliche Begleitung zu den Datenbanken ist die Publikation von Daten (kommentierte Veröffentlichung von Barcodes).

### Box 5: Die Entdeckung unbekannter Diversität – GBOLIII “Dark Taxa”

Die Möglichkeit, Organismengruppen in Datenbanken abzudecken, hängt vor allem von zwei Voraussetzungen ab: 1) dem Wissensstand um diese Organismengruppe (die Arten sind bekannt, benannt und beschrieben, sodass sie bestimmt werden können), 2) den Expert\*innen, die Arten dieser Gruppen identifizieren können. Nur so gelingt es, die essenzielle Verbindung von bestimmtem Belegexemplar und DNA-Barcode (mit den zugehörigen Daten) in der Referenzdatenbank zu schaffen. Ist eine der Voraussetzungen nicht gegeben, so wird es schwieriger, Organismen in die Referenzdatenbanken aufzunehmen. Sind aber beide Voraussetzungen nicht erfüllt, so wird eine Einbeziehung der Organismen in die Referenzdatenbanken so gut wie unmöglich. Diese Organismengruppen, für die es weder Wissen noch Expert\*innen gibt, werden als „Dark Taxa“ bezeichnet.

Als Beispiel seien hier die Diptera (Zweiflügler: Fliegen und Mücken) und Hymenoptera (Hautflügler: Bienen, Wespen und Ameisen) erwähnt, sogenannte megadiverse Insektenordnungen, die alleine in Deutschland mit etwa 9.500 bzw. 9.800 Arten vertreten sind. Von besonderer Bedeutung sowohl hinsichtlich Individuen- als auch Artenzahl sind die Mücken, einige Gruppen von Fliegen und die parasitoiden Hymenopteren (also Arten, die sich an oder in anderen Insekten entwickeln). Es sind gerade diese Insektengruppen, deren Anteil an der tatsächlich gefundenen Gesamtdiversität in Umwelt- und Massenproben enorm ist (oft über 70% der gefundenen Individuen) – die sich aber nicht auf Artniveau bestimmen lassen. Diese Dark Taxa können derzeit nicht in Arbeiten im Bereich Biodiversitätsmonitoring, Naturschutz oder Ökologie einbezogen werden, geschweige denn auf ihre Rolle und ihren Nutzen in natürlichen oder menschengemachten Ökosystemen und ihre mögliche Gefährdung hin evaluiert werden. Selbst in Deutschland ist derzeit nur knapp die Hälfte der ca. 33.000 Insektenarten Deutschlands molekular erfasst. Neben den Insekten gibt es Dark Taxa in vielen weiteren Organismengruppen (Tausendfüßern, Spinnen, Milben, Nematoden, Protisten u.a.).

Im Rahmen von GBOL III: Dark Taxa, der dritten Phase der GBOL-Initiative (<https://bolger-many.de>), gefördert vom BMBF, liegt der Fokus auf der Erforschung ausgewählter Dark Taxa aus den Diptera und Hymenoptera und deren Einbeziehung in die Referenzdatenbank. Es bedarf weiterer Forschungsinitiativen, um unbekannte Arten wissenschaftlich zu dokumentieren und über Referenzdatenbanken für das Biodiversitätsmonitoring verfügbar zu machen.

Datenbanken mit eindeutigen Sequenzen (sog. Amplikon-Sequenz-Varianten, ASVs) wie in GBOL III: Dark Taxa etabliert, können helfen, eindeutige DNA-Barcodes ohne bislang zugeordneten Artnamen zu hinterlegen und bereits in ein Monitoring einzubeziehen. Später kann im Idealfall diese Sequenz mit einem Artnamen verknüpft werden, wenn diese Art formal beschrieben oder korrekt referenziert werden konnte.

Neben den Datenbanken sollte ein weiterer Fokus auf die Verbesserung der maschinellen Lesbarkeit und Interpretation der Daten gerichtet werden. An dieser Stelle ist die Verwendung internationaler Standards (Biodiversity Information Standards, TDWG, <https://doi.org/10.35035/doc-vf1a-nr22>) wichtig. Ferner bedürfen Daten korrekter und ausführlicher Metadatenbeschreibungen, was zu einer FAIR-Datenverfügbarkeit führt. Neben der nachhaltigen Bereitstellung der Daten nach FAIR-Prinzipien sollte zudem grundsätzlich versucht werden, die angesprochenen Lücken in taxonomischen Gruppen oder Regionen zu schließen und Datenbanken zusammenzuführen. Hierzu steht auch NFDI4Biodiversity unterstützend zur Verfügung.

### Zusammenfassung

- Referenzdatenbanken sind entscheidend für die korrekte taxonomische Zuordnung von DNA-Metabarcoding-Sequenzen zu Artnamen; es sind jedoch nicht alle Organismengruppen vollständig repräsentiert.
- Metadatenstandards für die DNA-Barcode-Referenzen sind nötig für die Bewertung der Qualität.
- Langfristige Finanzierung von Personal für die Kuratierung sowie technische Lösungen für die Interoperabilität unterschiedlicher Datenbanken sind Voraussetzung für die nachhaltige Nutzung der Daten im behördlichen Monitoring.
- DNA aller Erhebungen sollte in öffentlichen Sammlungen verfügbar gemacht werden, um Erweiterbarkeit und Nachprüfbarkeit aller Ergebnisse zu gewährleisten.
- Referenzdatenbanken sollten den FAIR-Prinzipien folgen.

## 8 Qualitätssicherung im Gesamtkontext

Alle bundesweiten Monitoringprogramme zur Erfassung der Biodiversität werden systematisch durchgeführt und verwenden jeweils einheitliche bzw. standardisierte Methoden, die in Leitfäden oder Handbüchern beschrieben werden. Eine umfassende Qualitätssicherung der generierten Daten erfolgt je nach Zuständigkeit durch Fachgesellschaften, Landesbehörden und/oder BfN. Zur Qualitätssicherung gehören auch Qualitätskontrollen, z.B. über Nachbestimmung von Rückstellproben in einzelnen Programmen und Bundesländern. Weiterhin werden Schulungen z.B. zur Bestimmung bestimmter Organismengruppen angeboten. In einigen Ländern werden/wurden zudem Eignungsprüfungen gemäß standardisierter Verfahren (ISO 13528; Proficiency Testing) eingesetzt. So z.B. in Finnland, wo persönliche Eignungsprüfungen für traditionelle Taxonom\*innen angeboten werden, die nur die jeweilige Person auszeichnen, jedoch nicht das Labor, in dem sie tätig sind.

Die in den Kapiteln 5-7 ausgeführten Aspekte zeigen, dass für DNA-basierte Methoden teils bereits Leitfäden existieren bzw. in vielen Fällen für das behördliche Monitoring technische Mindestanforderungen spezifiziert und umgesetzt werden können. Um valide Biodiversitätsdaten für das behördliche Monitoring zu erhalten, ist die Etablierung technischer Mindeststandards langfristig jedoch nur ein Baustein in einem Qualitätsmanagementsystem. Aktuelle Metabarcoding-Studien belegen, dass unterschiedliche Laboratorien – selbst bei Einhaltung der Mindeststandards – zu unterschiedlichen Artenlisten kommen können. Dies ist vor allem für den Nachweis seltener Arten problematisch. Entsprechend wichtig ist es, dass im Kontext des behördlichen Monitorings die Implementierung weiterer Elemente der Qualitätssicherung mitgeplant wird. Die Ebenen der Qualitätssicherung können hierbei in einem hierarchischen Modell mit verschiedenen Ebenen dargestellt werden (Abb. 6).

**EBENE 1:** Basiselement hierbei ist ein generelles Qualitätsmanagementsystem, in dem generelle Arbeitsprozesse definiert werden, vorzugsweise Elemente aus Standard ISO 9001, 17025 bzw. auch OECD-Richtlinie zu Guter Laborpraxis (GLP). Für ein DNA-basiertes Monitoring sind dabei in der Regel weniger die generellen und teils sehr umfassenden Aspekte zur Arbeitsorganisation aus ISO 9001 als konkrete Maßnahmen zur Sicherung hoher Laborstandards wichtig (aber siehe Ebene 3). Dies betrifft insbesondere die Dokumentation jeglicher Arbeitsschritte, die Nachhaltung der Daten, sowie die regelmäßige Validierung der Labor-Arbeitsschritte. Eine Konformitätsbewertung durch eine Zertifizierungsstelle erscheint zum aktuellen Zeitpunkt nicht nötig, sollte jedoch im Rahmen des behördlichen Monitorings vorausgesetzt werden.

**EBENE 2:** Erfüllt ein Analyselabor diese grundlegenden Anforderungen (Ebene 1), so bieten standardisierte Verfahren zur Eignungsprüfung von Analyselaboren eine konkrete Möglichkeit zur Identifikation geeigneter Laboratorien. Dies kann z.B. über Ringversuche erfolgen, die nach internationalen Standards (ISO/IEC 17043) vorbereitet und in welchen Abweichungen in der Messgenauigkeit (ISO 13528) spezifiziert werden. Für chemische, medizinische aber auch biologische Untersuchungen existieren Prüflaboratorien, die eine Zertifizierung gemäß der zu erfüllenden Kriterien der Eignungsprüfung via Ringversuchen durchführen können. Ein Beispiel ist das Deutsche Referenzbüro für Ringversuche und zertifizierte Referenzmaterialien (<https://drrr.de/>). Auch im Rahmen des marinen Monitorings in Deutschland, sowie in einigen Ländern beim Monitoring nach WRRRL, werden solche Ringversuche für chemische und traditionell biologische Nachweise z.B. durch das Prüflabor des staatlichen finnischen Umweltinstitutes (SYKE) regelmäßig durchgeführt. In den Ringversuchen werden Referenzmaterialien an die teilnehmenden Laboratorien ausgegeben und die Analyseergebnisse zentral ausgewertet.



Nur Laboratorien, die erfolgreich einen bestimmten Anteil der Proben richtig analysieren konnten (z.B. definiert als Variation zwischen technischen Replikaten sowie Gesamtzahl der richtig-Positiven sowie falsch-Positiven), sind als Analyselabore zertifiziert. Dies wird bereits in England genutzt, um Analyselabore für das eDNA-basierte Kammolch-Monitoring zu zertifizieren. Diese Zertifizierung ist zeitlich begrenzt. Ein ähnlicher Schritt ist für Metabarcoding-Analysen denkbar und notwendig. Solche standardisierten Eignungsprüfungen sind umso wichtiger, da die Entwicklung DNA-basierter Technologien zur Biodiversitätserfassungen noch längst nicht abgeschlossen sind. Referenzmaterialien können über taxonomisch eindeutig bestimmte oder in Monokultur gezüchtete Organismen bzw. künstlich vervielfältigtes Gewebe von Pflanzen bzw. Tieren, erstellt werden (z.B. Museen, Behörden) oder die DNA der zu erwartenden Zielorganismen kann künstlich synthetisiert und zur Verfügung gestellt werden.

**EBENE 3:** Basierend auf den “äußeren Ebenen” ist ein Labor prinzipiell qualifiziert, Metabarcoding-Analysen gemäß definierter Mindestanforderungen durchzuführen. Diese Anforderungen sind fallspezifisch zu definieren und betreffen z.B. Anzahl biologischer und technischer Replikate, verwendete Negativkontrollen sowie interne Positivkontrollen, um mögliche Kreuzkontaminationen zu erkennen, Sequenziertiefe, Referenzdatenbanken und FAIR-Prinzipien sowie für sensitive Proben typen (z.B. Pollenanalysen) striktere Vorgaben zur Arbeitsweise.

**EBENE 4:** Als quasi letzter Schritt der Qualitätssicherung eines Labors empfiehlt sich für das behördliche Monitoring die nachgeschaltete Qualitätskontrolle, z.B. über die Analyse von Referenzproben, d.h. Proben, die eine vom Referenzlabor bekannte Gewebe- oder DNA-Kombination erhalten (siehe Ebene 2). Diese Proben müssen vom Auftragnehmenden mitanalysiert werden und die Ergebnisse gemeinsam mit den Analyseergebnissen bereitgestellt werden. Über die Abweichung der Resultate dieser Blindproben (=Positivkontrollen) kann die Verlässlichkeit der Messung der echten Proben quantifiziert werden und bei Unterschreiten einer definierten prozentualen Mindestgrenze der korrekt zugewiesenen Arten werden die Ergebnisse als unzuverlässig abgelehnt. Bezüglich der institutionellen Organisation werden die Qualitätskontrollen ähnlich wie bei Ebene 2 durch zertifizierte Laboratorien durchgeführt.

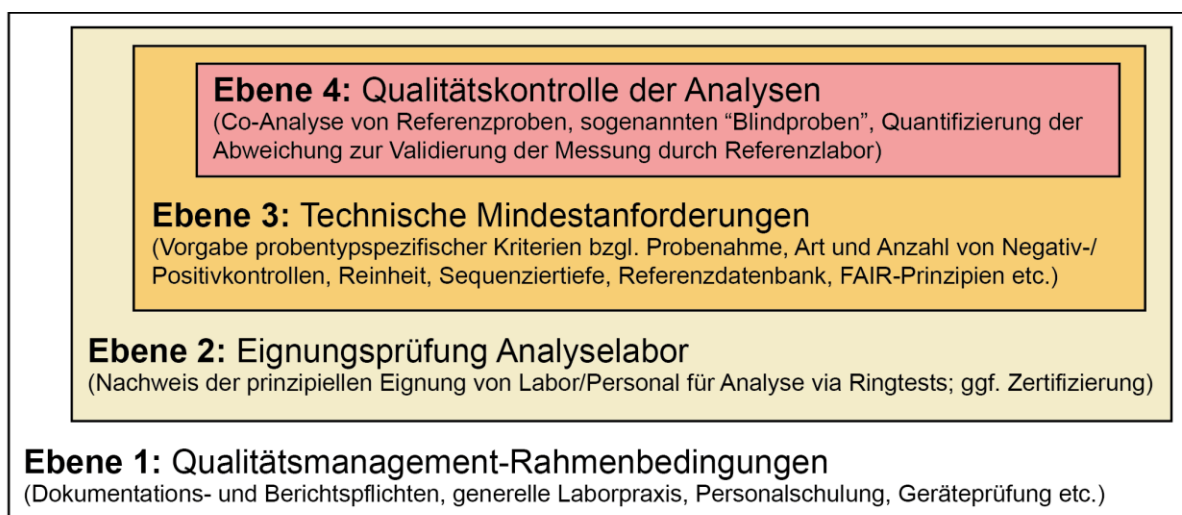


Abb. 6: Vorgeschlagene Ebenen zur möglichen Standardisierung DNA-basierter Biodiversitätsanalysen im behördlichen Natur- und Umweltschutz. (© Leese, Universität Duisburg-Essen)

## Umsetzungsbedarf

Für das behördliche Monitoring ist es wichtig, eine konkrete Liste mit erfolgreichen Kriterien für die vier verschiedenen Ebenen der Qualitätssicherung in das gesetzliche oder untergesetzliche Regelwerk aufzunehmen. Diese müssen gemäß der unterschiedlichen Probenarten und Monitoringprogramme teilweise spezifisch sein (insbesondere Ebene 2 und 3). Mit Blick auf die Umsetzung europäischer Regelungen für das Monitoring sowie grenzüberschreitende Untersuchungen ist es von Vorteil, wenn international akkreditierte Institutionen die Qualitätssicherung der einzelnen Labore durchführen. Metrologische Institutionen, die sich mit der Rückführbarkeit von Messwerten, deren Genauigkeit sowie deren Verbreitung beschäftigen, sollten auf nationaler und europäischer Ebene die Standardisierung des Metabarcodings und anderer molekularer Verfahren für die Umweltbeobachtung unterstützen und in die Prüfprogramme aufnehmen.

### Zusammenfassung

- Die Nutzung technischer Mindestanforderungen ist wichtig für die Qualitätssicherung, garantiert aber keine qualitativ hochwertigen Daten.
- Ein hierarchisches Qualitätssicherungsmanagement wird für das behördliche Monitoring empfohlen.
- Insbesondere wird empfohlen,
  - i) eine allgemeine Konformitätsbeurteilung der Analyselabore zu etablieren (Laborabläufe, Dokumentation, GLP),
  - ii) eine anwendungsbezogene Eignungsprüfung (Ringtests) durchzuführen,
  - iii) probenspezifische Mindeststandards (Replikation, Negativkontrollen, Reinheit, Sequenziertiefe, Referenzdatenbanken) festzulegen,
  - iv) Kontrollproben für die Probenahme sowie Referenzmaterialien für die Qualitätskontrolle der Laborergebnisse zu implementieren.
- Aktuelle Testschemata nach internationalen Standards können für Eignungsprüfung und Qualitätskontrolle genutzt werden.

## 9 Ausblick zur Implementierung

Viele Behörden werden die genetischen Untersuchungen aller Voraussicht nach nicht selbst durchführen, sondern die Leistung an Auftragslabore vergeben. In beiden Fällen ist der regelmäßige Nachweis der beteiligten Labore erforderlich, dass sie zur Durchführung der Analysen in ausreichender Qualität befähigt sind. Dafür sind Qualitätssicherungsmaßnahmen auf verschiedenen Ebenen möglich; von den Grundvoraussetzungen für das Qualitätsmanagement im Laborbetrieb über die Überprüfungen der Qualität der Messleistung durch Dritte bis hin zu laborinternen oder projektbezogenen Qualitätssicherungsmaßnahmen (siehe Kapitel 8).

Je nach Monitoringprogramm werden Behörden voraussichtlich entweder den gesamten Prozess einer DNA-basierten Bewertung von der Probenahme über die Messung bis zur Aus- und Bewertung der Daten beauftragen oder das Metabarcoding als eine separate Leistung vergeben, die auch von DNA-Laboren ohne Expertise in der Probenahme und der Bewertung durchgeführt werden kann. Ungeachtet dessen ist es erforderlich, dass Qualitätssicherungsmaßnahmen bereits bei der Probenahme beginnen und den gesamten Prozess bis zum Analyseergebnis begleiten. Um die Diskussionen in die Praxis zu leiten, ist als erster Schritt denkbar, anhand eines Beispiels ein Qualitätssicherungssystem zu entwickeln und erste Erfahrungen damit zu sammeln. Geeignet wäre dafür das eDNA-Metabarcoding zur Bewertung der Fischdiversität in Gewässern, da es bereits viele konkrete Methodenleitfäden gibt, es sich um eine überschaubare Artengruppe handelt und es vielfältige Vergleichsdaten gibt.

Wichtig ist, dass die Qualitätssicherung der Metabarcoding-Studien in der behördlichen Umweltbewertung institutionalisiert wird. Für die Qualitätssicherung der morphologisch-taxonomischen Daten im Bund-Länder-Messprogramm der Küsten (BLMP) hat beispielsweise das Umweltbundesamt bereits eine Qualitätssicherungsstelle implementiert. Für den weiteren inhaltlichen Prozess wird ein Forum für den transdisziplinären Austausch zum Thema DNA-basierte Methoden auf nationaler, DACH-Raum bzw. europäischer/internationaler Ebene dringend benötigt und sollte im Dialog zwischen Behörden und Forschungsinstitutionen, aber auch mit kommerziellen Anbietern regelmäßig, z.B. alle zwei Jahre, stattfinden.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Teilnehmende der Veranstaltung „DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung?“ in Kloster Schöntal. (© Woppowa, VDI).....	4
Abb. 2:	Sicherheit (Präzision) und Richtigkeit einer Messung. Für eine Biodiversitätserhebung bedeutet dies, dass die Methode die tatsächliche Artenzusammensetzung (=schwarzes Zentrum) mit möglichst wenig Abweichung (=Streuung der roten Punkte) bei wiederholter oder unabhängiger Messung liefern kann. (© Leese modifiziert nach DIN ISO 5725-1 Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen - Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe (ISO 5725-1:1994)) .....	11
Abb. 3:	Übersicht über die Schritte des DNA-Metabarcodings. (© Leese, Universität Duisburg-Essen) .....	14
Abb. 4:	Beispielbilder für Probenahme von Umweltproben und Probenaufbereitung für die Sequenzierung. a) Wasserprobenahme für anschließende Umwelt-DNA-Analyse, b) Phytobenthosprobe, die mit Hilfe einer Zahnbürste von Steinen gewonnen wurde und in Ethanol lagert, c) Vorbereitung der DNA-Isolation aus einer Phytobenthosprobe, d) Erfolgskontrolle einer Polymerasekettenreaktion mit Hilfe eines Agarose-Gels und UV-Licht im Labor. (© Till- Hendrik Macher, GeDNA-Projekt).....	15
Abb. 5:	Unterschiedliche Primerkombinationen (X-Achse) zeigen zwar unterschiedliche Nachweise der insgesamt 374 möglichen Zielarten, aber viele kommen zu sehr ähnlichen Ergebnissen, was die Robustheit von Metabarcoding-Verfahrensbeschreibungen gegenüber Variation zeigt. Die Primerkombinationen in Grün sind besonders geeignet, die in Rot besonders ungeeignet. (Quelle: aus Elbrecht et al. 2021; <a href="https://peerj.com/articles/7745/#fig-4">https://peerj.com/articles/7745/#fig-4</a> ).....	21
Abb. 6:	Vorgeschlagene Ebenen zur möglichen Standardisierung DNA-basierter Biodiversitätsanalysen im behördlichen Natur- und Umweltschutz. (© Leese, Universität Duisburg-Essen) .....	32

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Eignung gängiger gegenwärtiger und zukünftiger Probenotypen für das DNA-Metabarcoding und Forschungsbedarf. Expert*innen-Bewertung. Eignung hoch: dunkelblau; mittel: blau; niedrig: hellblau; Forschungsbedarf hoch: braun; mittel: orange; niedrig: gelb. * eDNA. ....	18
Tab. 2:	Übersicht über besonders häufig genutzte Datenbanken in DNA-Metabarcoding-Studien zum Zuweisen taxonomischer Namen zu Sequenzen. ....	26

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
16S/18S und 23S/28S	Unterschiedliche ribosomale Genmarker, die in DNA-basierten Biodiversitätsanalysen zur Bestimmung unterschiedlicher Taxa verwendet werden
ASV	Amplikon-Sequenz-Varianten
BfN	Bundesamt für Naturschutz
BLMP	Bund-Länder-Messprogramm der Küsten
CBD	Übereinkommen über die biologische Vielfalt der Vereinten Nationen (eng. Convention on Biological Diversity)
CEN	Europäisches Komitee für Normung (frz. Comité Européen de Normalisation)
CITES	Übereinkommen über den internationalen Handel mit gefährdeten frei lebenden Tieren und Pflanzen (eng. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)
COI	Genmarker; Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit 1-Gen
DACH-Raum	D (Deutschland), A (Österreich), CH (Schweiz)
DAS	Deutsche Anpassungsstrategie an den Klimawandel
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNS	Deutsche Nachhaltigkeitsstrategie
eDNA	Umwelt-DNA (engl. environmental DNA)
EU	Europäische Union
FAIR	Ziele zur Datenqualität und -verfügbarkeit: auffindbar (engl. findable), zugänglich (engl. accessible), interoperabel (engl. interoperable, wiederverwendbar (engl. reusable)
FFH-RL	Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie
GBOL	engl. German Barcode of Life
GLP	Gute Laborpraxis (Richtlinie, Empfehlungen, i.d.R. Verweis auf OECD-Richtlinie zur Guten Laborpraxis)
HelCom	Helsinki Commission, internationale Organisation zum Schutz der Meeresumwelt der Ostsee

IAS	Invasive gebietsfremde Arten (engl. invasive alien species)
ISO	Internationale Organisation für Normung
ITS	Genmarker; engl. internal transcribed spacer
LSU	große Untereinheit der rRNA (engl. long subunit)
LUCAS	Europäische Flächenstichprobenerhebung zur Bodennutzung und Bodenbedeckung (engl. Land Use and Coverage Area frame Survey)
matK	maturase K, Gemarker zur Bestimmung insbesondere pflanzlicher Taxa
MSRL	Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie
NBS	Nationale Strategie zur Biologischen Vielfalt
NFDI	Nationale Forschungsdateninfrastruktur
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (engl. Organisation for Economic Co-operation and Development)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
rbcl	Genmarker, engl. ribulose-bisphosphate carboxylase
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
SSU	kleine Untereinheit der rRNA (engl. small subunit)
TA Luft	Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft
TC	Technisches Komitee
trnL-F/K	tRNA-Genmarker zur Bestimmung insbesondere pflanzlicher Taxa
VDE	Verband der Elektrotechnik Elektronik Informationstechnik e.V.
VDI	Verein Deutscher Ingenieure e. V.
VRL	Vogelschutzrichtlinie
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie

## A Anhang: Europäische und Internationale Standardisierungsaktivitäten im Zusammenhang mit DNA-Metabarcoding

### A.1 Europäische Standardisierungsaktivitäten

#### A.1.1 CEN/TC 230 Water analysis (created 1989)

[https://standards.cen-cenelec.eu/dyn/www/f?p=205:7:0:::FSP\\_ORG\\_ID:6211&cs=1F56318D14ADC18191F68173E68B16469](https://standards.cen-cenelec.eu/dyn/www/f?p=205:7:0:::FSP_ORG_ID:6211&cs=1F56318D14ADC18191F68173E68B16469)

**Secretariat:** DIN (Germany)

**Scope:** Standardization in the area of water analysis including: - definition of terms; - sampling of water; - measurement; - reporting. Excluded are the limits of acceptability for water quality.

**Structure:** 10 working groups

**Standards published:** 225 documents

**Work programme:** 24 documents

#### A.1.2 CEN TC 230 / WG 28 Water Analyses DNA- and eDNA Methods:

[https://standards.cen-cenelec.eu/dyn/www/f?p=205:7:0:::FSP\\_ORG\\_ID:2601978&cs=1D38954EB9D1DAF2DC920BEB143FCDE34](https://standards.cen-cenelec.eu/dyn/www/f?p=205:7:0:::FSP_ORG_ID:2601978&cs=1D38954EB9D1DAF2DC920BEB143FCDE34)

**Secretariat:** SFS (Finland)

#### **Published Standards:**

- CEN/TR 17244:2018 (WI=00230348)  
Water quality - Technical report for the management of diatom barcodes
- CEN/TR 17245:2018 (WI=00230349)  
Water quality - Technical report for the routine sampling of benthic diatoms from rivers and lakes adapted for metabarcoding analyses
- EN 17805:2023 (WI=00230395)  
Water quality - Sampling, capture and preservation of environmental DNA from water



## A.2 Internationale Standardisierungsaktivitäten

### A.2.1 ISO/TC 147 Water quality (created 1971)

<https://www.iso.org/committee/52834.html>

**Secretariat:** DIN (Germany)

**Scope:** Standardization in the field of water quality, including definition of terms, sampling of waters, measurement and reporting of water characteristics.

**Structure:** 6 Subcommittees

**Standards published:** 327 documents

**Work programme:** 42 documents

### A.2.2 ISO/TC 190 Soil quality (created 1985)

<https://www.iso.org/committee/54328.html>

**Secretariat:** DIN (Germany)

**Scope:** Standardization in the field of soil quality: Soils in situ; Soil materials intended for reuse in or on soils, including dredged sub-aquatic soil materials (= excavated sediments).

**Structure:** 3 Subcommittees

**Standards published:** 179 documents

**Work programme:** 25 documents

### A.2.3 ISO TC 331 Biodiversity (created 2020)

<https://www.iso.org/committee/8030847.html>

**Secretariat:** AFNOR (France)

**Scope:** Standardization in the field of Biodiversity to develop principles, framework, requirements, guidance and supporting tools in a holistic and global approach for all organizations, to enhance their contribution to Sustainable Development.

TC 331 Biodiversity will work closely with related committees (e.g. ISO/TC 190 Soil quality, ISO/TC 147 Water quality, ISO/TC 276 Biotechnology, ISO/TC 34 Food products) in order to identify standardization needs and gaps, and collaborate with other organizations to avoid duplications and overlapping standardization activities.

**Structure:** 5 working groups

**Standards published:** --

**Work programme:** 4

## **A.3 Nationale Spiegelgremien des DIN zu Europäischen und Internationalen Gremien**

### **A.3.1 NA 119 DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)**

#### **Europäische Gremien von NA 119**

Der Normenausschuss begleitet die folgenden europäischen Gremien auf nationaler Ebene. Bei den entsprechend gekennzeichneten Gremien liegt auch das Sekretariat beim DIN.

<https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/naw/europaeische-gremien>

#### **Internationale Gremien von NA 119**

Der Normenausschuss begleitet die folgenden internationalen Gremien auf nationaler Ebene. Bei den entsprechend gekennzeichneten Gremien liegt auch das Sekretariat beim DIN.

<https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/naw/internationale-gremien>

#### **NA 119-01-03 AA Wasseruntersuchung (Spiegelgremium zu CEN/TC 230, ISO/TC 147)**

<https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/naw/nationale-gremien/wdc-grem:din21:54752592>

### **A.3.2 NA 172 DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS)**

#### **Internationale Normungsaktivitäten zum Schutz der Artenvielfalt und Ökosysteme (din.de)**

Der DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS) ist das zuständige Arbeitsgremium für die fachübergreifende Grundlagennormung im Bereich des Umweltschutzes auf nationaler, europäischer und internationaler Ebene. Der NAGUS erarbeitet Normen und Spezifikationen auf dem Gebiet der Umweltmanagementsysteme und der Instrumente des Umweltmanagements.

#### **NA 172-00-17 AA Biodiversität (Spiegelgremium zu ISO/TC 331)**

Der Arbeitsausschuss NA 172-00-17 AA „Biodiversität“ organisiert die deutsche Spiegelarbeit zum ISO/TC 331 „Biodiversity“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) und gegebenenfalls weitere übergreifende Normungsarbeit zu diesem Thema und stellt die deutsche Beteiligung an den Arbeiten der entsprechenden europäischen und internationalen Normung und Standardisierung sicher (Spiegelarbeit).

<https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/nagus/nationale-gremien/wdc-grem:din21:333002185>



**B Anhang: Tagungsprogramm**



Bundesamt für  
Naturschutz



**DNA-basierte  
Biodiversitätsanalysen im Natur-  
und Umweltschutz:  
Welche Optionen haben wir für  
eine Standardisierung?**

01. bis 03. Juni 2022  
Kloster Schöntal

## Hintergrundinformationen:

Die wissenschaftliche Entwicklung von Methoden für DNA-basierte Biodiversitätsanalysen schreitet rasant voran und ihre Anwendung ist auch für den behördlichen Natur- und Umweltschutz von großem Interesse. Insbesondere der behördliche Einsatz, z.B. im Rahmen von Monitoringprogrammen, erfordert robuste und standardisierte Methoden, die verlässliche und vergleichbare Daten liefern.

Der Fokus der Veranstaltung liegt auf dem „DNA-Metabarcoding“. Einführend wird ein Überblick über den aktuellen Stand der Methodenentwicklung und ihre Anwendungsbereiche gegeben. Anhand konkreter Projekte werden dann Erfahrungen aus dem Blickwinkel unterschiedlicher Akteure mit dem Einsatz des DNA-Metabarcoding ausgetauscht. Anschließend können die Teilnehmenden in vier Workshops folgende Themenfelder beleuchten und einen möglichen Standardisierungsbedarf aufzeigen:

I: Probenahme und Matrix (Wasser, Boden, Luft, Land)

II: Laborarbeit und Datenanalyse

III: Referenz-Datenbanken und Infrastruktur

IV: Qualitätssicherung für DNA-basiertes Monitoring

Die identifizierten Herausforderungen sowie die herausgearbeiteten Lösungsansätze für eine Standardisierung sollen im Nachgang zur Veranstaltung in einem Positionspapier von den Teilnehmenden sowie weiteren Expert\*innen zusammengefasst, systematisiert, priorisiert und veröffentlicht werden.

## Teilnehmer\*innenkreis:

Vertreter\*innen von Forschungseinrichtungen, Behörden, Verbänden, Gutachterbüros.

## Veranstalter:

Bundesamt für Naturschutz (BfN) gemeinsam mit VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (VDI-TLS).

## Veranstaltungsort:

Bildungshaus Kloster Schöntal, Klosterstr. 6, 74214 Schöntal;  
Tel: 07943 / 8940; E-Mail: [bildungshaus@kloster-schoental.de](mailto:bildungshaus@kloster-schoental.de);  
<https://www.kloster-schoental.de>

### **Konzeption und Leitung der Tagung:**

Miklos Bálint, Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum Frankfurt; Sebastian Höss, ECOSSA; Jan Koschorreck, Umweltbundesamt; Henrik Krehenwinkel, Universität Trier; Florian Leese, Universität Duisburg-Essen; Stefan Lötters, Universität Trier; Carsten Nowak, Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum Frankfurt; Vera Rduch, Leibniz-Institut zur Analyse des Biodiversitätswandels - Museum Koenig, Bonn; Christoph Scherber, Leibniz-Institut zur Analyse des Biodiversitätswandels - Museum Koenig, Bonn; Ljuba Woppowa, VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (VDI-TLS); Wiebke Züghart, Bundesamt für Naturschutz.

### **Kosten:**

Unterkunft im Einzelzimmer inkl. Frühstück pro Pers./Tag: 75 €

**Zahlung sind per EC-Karte oder Master/Visa-Kreditkarten möglich.**

Bitte melden Sie sich bis zum **30.04.2022** zur Veranstaltung an, bitte nutzen sie dazu den Anmeldelink:

Bitte nutzen Sie ebenfalls bis zum **30.04.2022** folgenden Link für eine erste Zuordnungsmöglichkeit zu den angebotenen Workshops I bis IV (die finale Festlegung erfolgt vor Ort):

### **COVID 19-Hinweise und Hygienemaßnahmen:**

Es gelten die jeweiligen Regeln der Corona-Verordnung Baden-Württemberg und die Hygiene und Schutzkonzepte des Bildungshauses Kloster Schöntal:

<https://www.kloster-schoental.de>

### **Anreise:**

siehe Homepage Kloster Schöntal:

<https://www.kloster-schoental.de/meta/anreise.html>

## Programm

01. Juni 2022

---

*Individuelle Anreise*

18.00 - 19.30      *Gemeinsames Abendessen*

20.00                *Begrüßung, Vorstellungsrunde, Ausblick auf die nächsten Tage,  
Übersicht über Ziele der vier parallelen Workshops*

02. Juni 2022

---

07.30 – 08:30      *Frühstück*

### **I Themenblock: Plenarvorträge**

08:30      *Begrüßung*

08.40      *DNA-Metabarcoding im behördlichen Natur- und Umweltschutz – Stand  
und Perspektiven  
Wiebke Züghart, BfN Bonn; Jan Koschorreck, UBA Berlin*

09.00      *Methoden und Entwicklung: Wie können wir Biodiversitäts-Veränderungen  
erfassen? Was benötigen wir von der Forschung (FINKA)? Christoph  
Scherber, ZFMK Bonn*

09:20      *Chancen und Risiken der (noch nicht-standardisierten) DNA-basierten  
Methoden für ein umfassendes Biodiversitätsmonitoring.  
Florian Leese, Universität Duisburg-Essen, Essen*

**09.40      Kaffeepause**

## II Themenblock: Praxisbeispiele

- 10.10 *Erfahrungen aus anderen Bereichen, die mit genetischem Material arbeiten, Beispiel Wildtiergenetik, Lösung: Monopolisierung  
Dr. Carsten Nowak, Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum Frankfurt*
- 10.30 *Boden: Metagenomische Erhebungen, Standardisierung und technologische Entwicklung  
Prof. Miklós Bálint, Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum Frankfurt, Biodiversität, Klimaforschungszentrum*
- 10.50 *Insektenmonitoring,  
1. Fallbeispiele aus dem LTER-D-Projekt / Nationalpark Bayerischer Wald, Johannes Uhler Nationalpark Bayerischer Wald, Grafenau  
2. Fallbeispiele vom Entomologischen Verein Krefeld, Thomas Hörren, Entomologischen Verein Krefeld*
- 11.20 *Anwender/Kundensicht: AIM Advanced Identification Methods, Erfahrung und Bedarf  
Kirsten Morinière, AIM; Leipzig; Michael Traugott, SINSOMA, Innsbruck, Österreich*
- 11.50 *Diskussion*
- 12:15 *Übersicht über vier parallele Nachmittags-Workshops und Aufteilung in Arbeitsgruppen*
- 12.30-13.30 Mittagessen**
- 13.30-14.30 *Rahmen-Programm: Führung durch das Kloster Schöntal*



### **III Workshops: Wie kommen wir zu verlässlichen und vergleichbaren Artenlisten?**

15.00 Aufteilung in Arbeitsgruppen, Aufsuchen der Workshop-Räume

15.15-18.30 Workshops 1 bis 4

16:15 Kaffeepause

#### **Workshop 1 Probenahme und Medien (Wasser, Boden, Luft, Land)**

**Moderation:** Miklós Bálint; Carsten Nowak, Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum Frankfurt

**Ziel:** Zusammenfassung der Probenarten für alle vier Medien, die derzeit gesammelt werden und zukünftigen Bedarfs an Probentypen.

**Inhalt:** Folgende Punkte möchten wir diskutieren:

1. Was ist die Diversität der wissenschaftlichen und behördlichen Probenahmen für Wasser, Boden, Luft, Land?
2. Ist es möglich, Probenahmen für bestimmte Medien zu standardisieren, z.B. analog WRRL? Malaisefallen? Was ist standardisierbar? Zusammenfassung bestehender standardisierter Probenahme-Methoden.
3. Abgleich von Überschneidungen mit klassischen Methoden
4. Bewertung, ob die mit klassischen Methoden genommenen Proben für das Metabarcoding geeignet sind.

## **Workshop 2**    **Laborarbeit und Datenanalyse**

**Moderation:**    *Henrik Krehenwinkel, Universität Trier;  
Philipp Rausch, Universität Kiel, Institute of Clinical  
Molecular Biology (IKBM), Kiel*

**Ziel:**    *Ziel des Workshops ist die Identifikation von Minimalstandards für die molekulare und bioinformatische Prozessierung von Metabarcodingdaten. Darüber hinaus sollen besonders kritische Arbeitsschritte, die sich maßgeblich auf die detektierte Diversität auswirken, identifiziert werden.*

**Inhalt:**    *Folgende Punkte möchten wir diskutieren:*

1. *Welche Analyseschritte sind wenig sensibel und standardisierbar? Welche sind sehr spezifisch für bestimmte Fragestellungen und Probenarten oder besonders fehleranfällig?*
2. *Können Minimalstandards für die Laborarbeit und Datenprozessierung identifiziert werden, die über verschiedene Probenarten und Fragestellungen Gültigkeit haben?*
3. *Können/sollen Analyseschritte auch in behördlichen Laboren durchgeführt werden?*

## **Workshop 3**    **Referenz-Datenbanken und Infrastruktur**

**Moderation:**    *Vera Rduch, LIB / Museum Koenig, Bonn; Jonas Zimmermann, FU Berlin / BGBM*

**Ziel:**    *Ziel des Workshops ist es einen Überblick über die verschiedenen Referenz-Datenbanken bezüglich ihrer Kuratierungs-/Datenstandards zu bekommen und Qualitätsanforderungen sowie benötigte Leistungsanforderungen zu identifizieren, um die Grundlage für DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Kontext eines behördlichen Monitorings zu gewährleisten.*

**Inhalt:**    *Folgende Punkte möchten wir diskutieren:*

1. *Welche Datenbank ist für welche Organismengruppe geeignet? Welche Standards liegen in den Datenbanken zugrunde? Existieren Daten-/Metadatenstandards?*
2. *Welche Ansprüche bestehen an die Dokumentation genetischer Biodiversitätsanalysen? Welche taxonomische Auflösung wird angestrebt*

*(Ordnung/Familie/Gattung/Art/Population)? Welche Ansprüche bestehen an die Qualitätssicherung der Taxa-Listen?*

3. *Welche Anforderungen bestehen an Referenzdatenbanken für ein behördliches Monitoring (vgl. Entwicklung Rote Listen, Bundestaxaliste)? Wie häufig bräuchte es Aktualisierungen oder Anpassungen?*
4. *Wie steht es um die Kompatibilität verschiedener Datenbanken?*
5. *Welche Rolle spielt NFDI4Biodiversity und welche Potenziale bietet sie?*

#### **Workshop 4**     **Qualitätssicherung für DNA-basiertes Monitoring**

**Moderation:**     *Florian Leese, Universität Duisburg-Essen; Jan Koschorreck, Umweltbundesamt, Berlin; Kristian Meissner, Finish Environment Institute (SYKE),*

**Ziel:**     *Ziel des Workshops ist es, konkrete Qualitätssicherungsoptionen für DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Kontext eines behördlichen Monitorings zu identifizieren und diese hinsichtlich ihrer Machbarkeit zu bewerten.*

**Inhalt:**     *Folgende Punkte möchten wir diskutieren:*

1. *Was sind die Bewertungsgrundlagen verschiedener behördlicher Umwelt / Bio(diversitäts)-Monitoring-Programme? Welche Daten stehen zur Verfügung (Arten/Taxalisten/ Populationsgrößen etc.) und wofür werden Sie genutzt.*
2. *Was sind Verfahren der Qualitätssicherung für bestehende Erhebungen (Ringtests, Expertenevaluation von Rückstellproben, Fotodokumentation, Zertifizierung, proficiency tests, Blindproben etc.)?*
3. *Welche Mindestanforderungen bestehen hinsichtlich der Qualitätssicherung bestehender Monitoringprogramme?*
4. *Welche Qualitätssicherungsmaßnahmen eignen sich unmittelbar für DNA-basierte Erhebungen? Wo werden weitere, standardisierte Verfahren benötigt und wo kann man auf eine „Selbstregulation“ hoffen oder vertrauen?*

18.30             *Abendessen*

19.30             *Zusammenfassung 1. Tag, gemütliches Beisammensein*

*03. Juni 2022*

---

*07.30 - 08.30 Frühstück*

*08.30 Standardisierung: Qualität und Innovation sind kein Widerspruch  
Florian Leese, Kristian Meissner, Ljuba Woppowa, Jonas Zimmermann;*

*08.50 Aufsuchen der Workshop-Räume*

*09.00 Fortführung der vier parallelen Workshops*

*10:30 Kaffeepause*

*11.00 Präsentation der Workshop Ergebnisse*

*12.00 Zusammenfassung, nächste Schritte, Fazit und Abschluss*

**12.30-13.30 Gemeinsames Mittagessen**

**Kontaktadressen:**

Dr. Ljuba Woppowa, VDI Verein Deutscher Ingenieure e.V., Düsseldorf  
Telefon: +49 211 / 6214-314, E-Mail: woppowa@vdi.de

Dr. Wiebke Züghart, Bundesamt für Naturschutz (BfN), Bonn  
Telefon: +49 228 / 8491-1460, E-Mail: wiebke.zueghart@bfm.de

Die „BfN-Schriften“ sind eine seit 1998 unperiodisch erscheinende Schriftenreihe in der institutionellen Herausgeberschaft des Bundesamtes für Naturschutz (BfN) in Bonn. Sie sind kurzfristig erstellbar und enthalten u.a. Abschlussberichte von Forschungsvorhaben, Workshop- und Tagungsberichte, Arbeitspapiere oder Bibliographien. Viele der BfN-Schriften sind digital verfügbar. Printausgaben sind auch in kleiner Auflage möglich.

**DOI 10.19217/skr666**