



DGL

Deutsche Gesellschaft
für Limnologie e. V.

(German Limnological Society)

Ergebnisse der Jahrestagung 2021

der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL)
und der deutschen und österreichischen Sektion der
Societas Internationalis Limnologiae (SIL)

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ)
Leipzig

Leipzig, 27. September – 1. Oktober 2021

Impressum:

Deutsche Gesellschaft für Limnologie e.V.:
vertreten durch das Präsidium der DGL;
Rellinghauser Str. 334f, 45136 Essen
Ergebnisse der Jahrestagung in Leipzig 2021
Eigenverlag der DGL, Essen 2022

Redaktion und Layout:

Geschäftsstelle der DGL, Tanja Pottgiesser

Druck:

Hubert & Co. GmbH & Co. KG
Robert-Bosch-Breite 6, 37079 Göttingen

ISBN-Nr. 978-3-9818302-6-2

Bezug über die Geschäftsstelle der DGL:
Rellinghauser Str. 334f
45136 Essen
Tel.: 0201 – 61 76 30 51
Fax: 0201 – 61 76 30 53
E-Mail: geschaeftsstelle@dgl-ev.de
Homepage: www.dgl-ev.de

Kosten inkl. Versand: Druckversion: € 25,--

Metabarcoding für Phytoplankton- und benthische Diatomeenarten durch das Projekt Eco-AlpsWater – Erfahrungen für bayerische Gewässer

Ute Mischke¹, Rainer Kurmayer², Nico Salmaso³, Tina Elersek⁴, Fabio Lepori⁵, Jochen Schaumburg¹, Frederic Rimet⁶, Valentin Vasselon^{7,6} & Isabelle Domaizon⁶

¹ Bayerisches Landesamt für Umwelt, DS Wielenbach, ute.mischke@lfu.bayern.de, ² Universität Innsbruck, Mondsee, rainer.kurmayer@uibk.ac.at, ³ Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, nico.salmaso@fmach.it, ⁴ Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology, National Institute of Biology, Ljubljana, Tina.Elersek@nib.si, ⁵ University of Applied Sciences and Arts of Southern Switzerland (SUPSI), Canobbio, fabio.lepori@supsi.ch, ⁶ INRAE, CARTELE, Pole Ecla, Thonon les bains, isabelle.domaizon@inra.fr, ⁷ SCIMABIO, valentin.vasselon@scimabio-interface.fr

Keywords: metabarcoding, genetische Nachweise, Plankton, Phytobenthos, eDNA

Einleitung

In dem Interreg-Projekt Eco-AlpsWater wurden Artenlisten von Gewässerorganismen sowohl mit einem Metabarcoding-Ansatz als auch durch Lichtmikroskopie ermittelt, um diese miteinander zu vergleichen und den Mehrwert durch das genetische Verfahren zu evaluieren. Es wurden Plankton- und Phytobenthos-Proben aus mehr als 50 Gewässern im Alpenraum nach einheitlichen Methoden analysiert. Das Landesamt für Umwelt hat sich als einer von 12 Projektpartnern an der Beprobung von 6 Seen und dem Fluss Wertach und sowie an der Datenanalyse beteiligt.

Der neuartige Metabarcoding-Ansatz zur Ermittlung von Gewässerorganismen wurde im Projektkonsortium unter Nutzung der Schnelldurchsatz-Sequenzierung (HTS) für DNA aus Umweltproben (eDNA) erarbeitet und in Anleitungen dokumentiert (Eco-AlpsWater webpage, 2021). Dies erfolgte aufbauend auf vorangegangenen Pilotstudien (Kurmayer et al. 2017, Salmaso et al. 2020, Vasselon et al. 2017, Rimet et al. 2019). Es wurden Beprobungskits, Markergene, Extraktionskits, PCR- und Bioformatik-Verfahren ausgewählt und teils getestet, die für die Zielgruppen Phytoplankton, Phytobenthos sowie Fische geeignet sind. Im vorliegenden Beitrag wird die Taxonomiezuordnung der ermittelten DNA-Sequenzen mit den Ergebnissen aus den lichtmikroskopischen Analysen vergleichend beurteilt.

Material und Methoden

Untersuchungsgebiet, Probenumfang und Probenahme

Im Jahr 2019 wurden in Bayern 46 Plankton-Integralproben aus 6 Seen und 60 Phytobenthos-Proben von Steinen aus 3 Seen und dem Fluss Wertach entnommen, sowie weitere aus 41 Seen und 5 Flüssen des Alpenraumes. Die eDNA-Beprobung erfolgte aus Teilproben, die gemäß der traditionellen bzw. WRRL Beprobungsvorschriften in den 6 beteiligten Ländern entnommen wurden. Es wurde mit einer

Einwegspritze eine Teilprobe (0,5-1,1 Liter) der planktischen Integralprobe (euphotische Zone) auf eine steril-verpackte Sterivex-Filterkapsel (Porenweite 0,22µm) gezogen und die Filterkapsel tiefgefroren, bzw. für Phytobenthos der abgebürstete Biofilm von je 5 Steinen mit sterilem Wasser abgespült und von dieser Suspension 10ml mittels 40ml unvergälltem, absoluten Ethanol in Falcon-Tubes fixiert. Die mikroskopische Analyse (LM) erfolgte nach den Vorgaben der nationalen Methoden PhytoSee (Utermöhl-Methode) und dem Diatomeen-Modul im PHYLIB-Verfahren gemäß Wasserrahmenrichtlinie.

DNA workflow

Die DNA aus der Probe wurde extrahiert (Kits: PowerWaterSterivex bzw. NucleoSpinSoil M&N), amplifiziert und mit den Markergenen 16S-rRNA (V3-V4 Region; Primer 341Fmod und 806Rmod) für Cyanobakterien, 18S-rRNA (V4 Region; Primer V4F-18S_ILL und V4R-18S_ILL) für Eukaryoten und zusätzlich mit rbcL (Plastidgen 312 bp; Primer Diat_rbcL_708F_1_2_3 und R3_1_2) für benthische Diatomeen sequenziert. Die mit der Plattform DADA 2 ermittelten Sequenzen (ESVs) wurden mit den Gendatenbanken (Silva 138, Protist Ribosomal Reference database-PR2, Diat.barcode s. Rimet et al 2019) zur Taxonomiezuordnung abgeglichen. Die Ergebnisse wurden in Sample-Sequence-Matrix-Tabellen ausgegeben (HTS). Um die 16S Taxonomie zu verbessern, wurden die BLAST-Methode eingesetzt und damit einige Cyanobakterien-Taxa abweichend zum ersten HTS-Output zugeordnet. Weiterhin wurden „Chloroplast“-Sequenzen in den 16S-Output ergänzend genutzt, einige weitere Eukaryoten wie *Colacium* nachzuweisen. Der gesamte DNA workflow mit Extraktion, PCR Amplifikation der gewählten Barcodes, die Nasslabormethoden zur Erstellung der DNA library für das nachgeschaltete MiSeq Sequencing sowie die Taxonomiezuordnung ist in Anleitungen dokumentiert (s. vorletztes Kapitel) und wurde durch Projektpartner durchgeführt.

Datenanalyse

Der MS-Access-basierte „EAW taxa analysis tool“ wurde im Projekt entwickelt (Mischke et al. 2021) und umfasst die DNA-Sequenzen aller ESVs, die HTS-Ergebnis sowie die lichtmikroskopischen Analyseergebnisse (LM). Das Tool erzeugt automatisiert vergleichende Taxalisten (HTS zu LM und vice versa) auf Ebene „Art“ sowie „Gattung“ für auswählbare Proben und berücksichtigt die Synonyme und aggregiert die Mehrfachnennung einer Art im Fall, dass mehrere Genotypen vorhanden sind. Alle HTS und LM-Artenlisten wurden um einen gemeinsamen Taxacode nach „Rebecca-Code“ für Phytoplankton bzw. nach „Validcode“ für Diatomeen ergänzt (Schmidt-Kloiber A. & Hering D, Stand 11.12.2019). Mit dem Tool wurden sowohl die Wiederfindungsraten der durch LM ermittelten Taxa mittels HTS sowie die Erweiterung der Artenlisten durch HTS extrahiert. Taxa, die mit mindestens einer Sequenz in einer Probe des gesamten EAW-Datensatzes detektiert wurden, wurden in der HTS-Taxonomie des Markergens als „detectable by HTS“ im Tool gekennzeichnet.

Ergebnisse

Insgesamt wurden aus dem Probensatz (N=322) des Projektes über 50.000 verschiedene Genotypen mit über 350.000 Signalen durch die 3 Marker-Gene in den Primerregionen ermittelt (s. Tabelle 1). Diese enorme genetische Vielfalt wurde zum einen durch die Vielfalt an beprobten Gewässern (Teiche bis große alpine Seen und Flüsse), zum anderen durch die Erfassung weiterer Gruppen z. B. heterotrophe Bakterien und Ciliaten aus den beiden Habitaten Plankton und Biofilm gesteigert, wobei viele Arten im Alpenraum eine hohe genetische Variabilität zeigten. Die Art *Ceratium hirundinella* war zum Beispiel mit 59 verschiedene Genotypen (ASVs) im Datensatz vertreten. Ein Großteil der

Genotypen konnte jedoch durch den Genbankenvergleich nur einer biologischen Großgruppe oder Familie zugeordnet werden, und der genaueste Identifikationslevel mittels HTS reichte je nach Primer unterschiedlich entweder nur bis zur Gattung, oder zur Art (s. Tabelle 1).

Für die vergleichende taxonomische Auswertung diente ein Extrakt von Genotypen, die der Bio-komponente Phytoplankton bzw. den benthischen Diatomeen angehören und mindestens als Gattung spezifiziert wurden. Insgesamt ergaben die genetischen Nachweise (HTS Ermittlung) 670 Phytoplanktontaxa incl. Cyanobakterien und 226 Diatomeentaxa, nachdem die gleichsinnigen Genotypen auf Art- oder Gattungsniveau zusammengeführt wurden (Tabelle 1). Ermittelt durch die Lichtmikroskopie stand demgegenüber eine ähnlich hohe Anzahl an Phytoplanktontaxa bzw. eine doppelt höhere Anzahl bei Diatomeen (Tabelle 1, letzte Zeile).

Tab. 1: Anzahl nachgewiesener Zielarten (N Taxa, Zeile 5) als Extrakt aus der Gesamtheit aller Genotypen (ASVs, Zeile 4) einer Primerregion (Kopfzeilen) und vergleichend das Ergebnis der lichtmikroskopischen Analyse (N Taxa, Zeile 6) in allen Proben des Eco-AlpsWater-Projektes

Biokomponente für WRRL	Cyanobakterien	Phytoplankton „Eukaryoten“	Diatomeen
Primerregion	16S rRNA Gen	18S rRNA Gen	rbcL
Identifikationslevel HTS	Gattungen, wenige Arten	Gattungen, wenige Arten	Arten, teils Varietäten und Gattungen
Erfasste weitere Organismen	Bakterien, Pilze, Krankheitserreger; Chloroplast-RNA	Viele Klassen e. g. Zooplankton, Ciliaten, höhere Pflanzen etc.	Selten: marine Arten zugeordnet - Fehlerquellen
Anzahl Genotypen (ASVs)	37.530	20.781	1.602
N Taxa HTS Ermittlung	88 (Cyanobacteria)	582 (Phytoplankton)	226 (Diatomeen)
N Taxa Lichtmikroskop	93 (Cyanobakterien)	417 (Phytoplankton o. Cyano.)	492 Diatomeen-Taxa

In den Phytobenthos-Proben aus den bayerischen Gewässern wurden 12.017 Genotypen von Bakterien und Pilzen mittels 16S nachgewiesen, von denen nur ein kleiner Anteil den Cyanobakterien angehörte (N=788). Der rbcL-Marker wies 757 verschiedene Genotypen an Diatomeen nach. Mittels des Markers für Eukaryoten (18S) wurden 3062 Genotypen gefunden.

In den Planktonproben aus den bayerischen Seen wurden 3.333 16S-Genotypen von Bakterien und Pilzen und mittels des Markers für Eukaryoten (18S) 1.976 Genotypen nachgewiesen.

Insgesamt war die genetische Vielfalt im Steinaufwuchs der Seen (Phytobenthos) am höchsten (>300 Genotypen je Probe), gefolgt von denen aus der Wertach und am geringsten in den Planktonproben. Beim Vergleich der Anzahl an gemeinsam durch HTS und LM nachgewiesenen Arten ergaben sich große Unterschiede, wie im Folgenden dargestellt.

Benthische Diatomeen

In den 13 Phytobenthosproben aus der Wertach wurden im Mittel 50% der LM-Arten auch mit der HTS-Methode mittels rbcL Gen nachgewiesen (s. Abbildung 1). Weitere 55 Diatomeenarten wurden durch HTS zusätzlich nachgewiesen, und für 23 lichtmikroskopisch nachgewiesene 23 Taxa fehlte der genetische Nachweis.

Die Wiederfindungsrate von LM Diatomeen in den Phytobenthosproben aus dem Starnberger See lag nur bei 25% (Abbildung 2), und dies traf auch auf Steinproben aus den Ammersee (25%) und Staffelsee (26%) zu. Im Gegensatz zu den Fließgewässerproben wurden mehr Arten (42) ausschließlich mit LM gefunden, und 28 Taxa allein durch HTS.

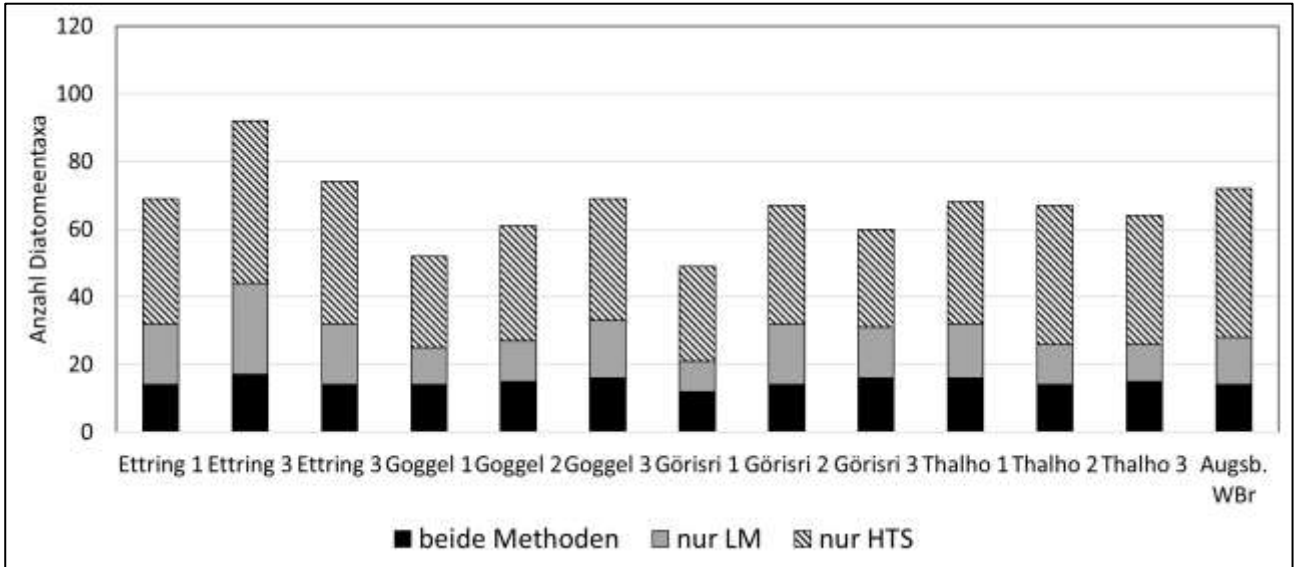


Abb. 1: Anzahl an Diatomeentaxa (Arten oder Gattungen) unterschieden in detektiert durch beide Methoden (schwarz) oder nur durch Lichtmikroskopie (LM, grau) oder nur mittels Gen-Marker (HTS, schraffiert) in Phytobenthosproben aus der Wertach

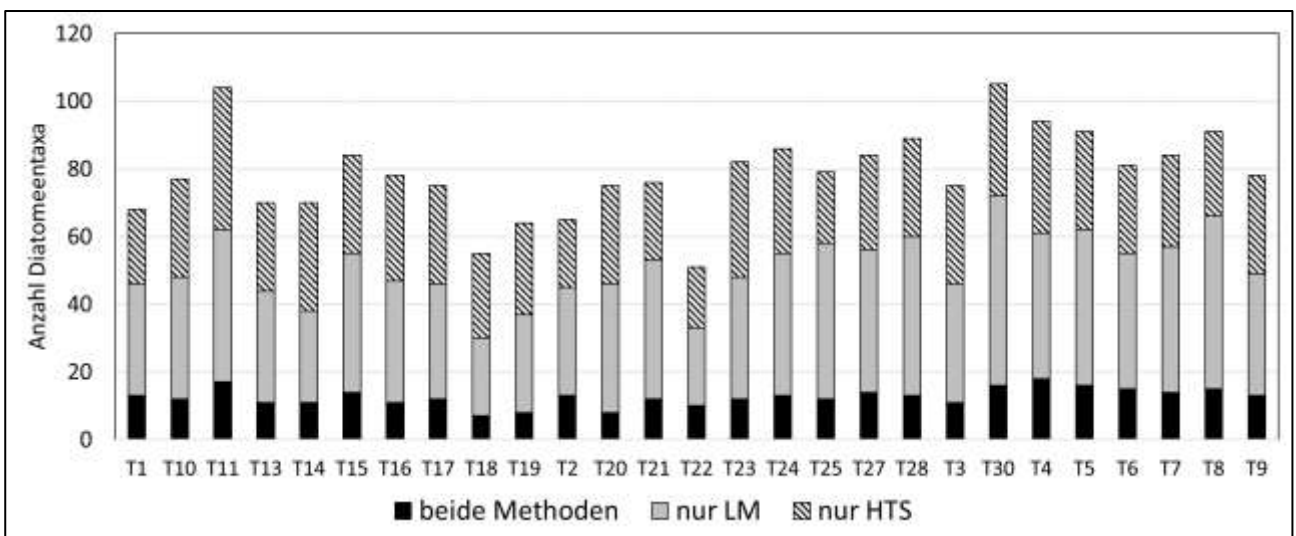


Abb. 2: Anzahl an Diatomeentaxa (Arten oder Gattungen) unterschieden in detektiert durch beide Methoden (schwarz) oder nur durch Lichtmikroskopie (LM, grau) oder nur mittels Gen-Marker (HTS, schraffiert) in Phytobenthosproben aus dem Starnberger See

Die erheblichen Abweichungen in der Bestimmung der benthischen Diatomeen umfassten insgesamt mehr als 50 Taxa. Davon wurden 45 Taxa einer überprüfenden Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) unterzogen (Goos, 2021) doch aus Kapazitätsgründen nur anhand einer Auswahl an Proben. Folgende genetischer Nachweise ohne Entsprechung in den LM-Nachweisen wurden durch den REM-Analysen bestätigt: *Achnantheidium delmontii*, die als invasive Art eingestuft ist (Peres et al. 2012), *Encyonema cespitosum* und *E. prostratum*, *Encyonopsis minuta* und *E. subminuta* sowie *Fistulifera saprophila*. 20 Taxa wiederum wurden im REM bestätigt, die in diesen Proben nur im Lichtmikroskop gefunden wurden. Insgesamt kam es häufig vor, dass bestimmte Diatomeenarten zwar grundsätzlich mit der HTS-Methode nachweisbar waren („detectable“, s. Methoden), aber deren Sequenzsignal in Proben fehlte, obwohl ihre prozentuale Schalenhäufigkeit mittels LM über 5% lag.

In manchen Fällen konnten derartige Miss-matches durch eine Datenprüfung unter Hinzuziehung eines Spezialisten geklärt werden: *Gomphonema olivaceum* var. *olivaceum* ((Hornemann) Ehrenberg 1838) häufig in der Wertach mittels LM bestimmt, fehlte im HTS Nachweis, doch es wurden anstelle dessen häufig das Sequenzsignal für *Gomphonella olivacea* (Hornemann) Rabenhorst 1853 ausgegeben, welche der aktuell akzeptierte Name der gleichen Art ist. In diesem Fall war der „EAW taxa analysis tool“ nicht korrekt für diese Synonymie vorbereitet.

Phytoplanktontaxa

Die Wiederfindungsraten von lichtmikroskopisch bestimmten Taxa war für Planktonproben auf Gattungsniveau zwischen 85 und 100%. Dafür wurden die genetischen Nachweise von 18S und 16S zusammengeführt. Hingegen wurden Arten in den HTS-Listen nur selten innerhalb der Gattungen unterschieden und deshalb lagen die Wiederfindungsraten auf Artniveau unter 10%. Während die Dinophyceen (z. B. *Asulcocephalium miricentonis*, *Prorocentrum spec.*) und Chrysophyceen taxonomisch mit vielen Gattungen und einigen neuen Arten durch HTS ausgewiesen wurden, detektierte das HTS-Verfahren nur sehr wenige Taxa der Grünalgen, Diatomeen, Desmidiaceen, Crpytophyceen und Euglenophyceen.

Für den genetischen Nachweis der bisher in Europa sehr selten nachgewiesenen Blaualge *Prochlorothrix* im Schliersee an Stelle der durch LM bestimmten *Limnothrix redeckei* steht noch eine Bestätigung durch eine Pigmentanalyse aus (Chlorophyll b). Die beiden Taxa sind phylogenetisch und morphologisch sehr ähnlich und eine Aufklärung der Zuordnung ohne eine mono-klonale Algenkultur ist schwierig. Die Gattung *Limnothrix* und eine andere Art *L. planctonica* wurden in anderen Planktonproben von 2 italienischen Seen genetisch nachgewiesen, diese Genotypen fehlten jedoch im Schliersee.

Phytobenthos ohne Diatomeen

Durch die Anwendung der 18S und 16S Genmarker auf alle Phytobenthosproben wurde eine hoch-diverse Aufwuchsgemeinschaft detektiert. Es wurden neben einigen Diatomeen alle weiteren Algenklassen inklusive Cyanokakterien, Schwefel- und weitere Bakterien sowie der Ciliaten erfasst, die im Detail durch den EAW Taxa Analysis Tool zugänglich sind.

Die genetischen Befunde weisen auf neue Taxa hin, die sonst in einer Probe möglicherweise übersehen werden. In den Wertachproben finden sich starke Signale für *Pleurocapsa sp.*, und in den Seen von *Cyanobium* und *Calothrix*. Insgesamt wurden in den Proben aus der Wertach im Mittel weniger Genotypen (ca. 20%) als in den sehr artenreichen Phytobenthos-Proben aus den Seen gefunden. Der genetische Nachweis der toxischen Blaualge *Tychonema* (benthischer Genotyp) im Lech-Stausee Mandichosee bestätigt Befunde von Bauer et al. (2020).

Diskussion

Der Zugang zu den komplexen genetischen Ergebnissen, bestehend aus den drei HTS-Matrices für 16S, 18S und *rbcL*-Makergenen und vergleichend dazu zu den lichtmikroskopischen Zähllisten, war für Anwender aus der Wasserwirtschaft schwierig. Unter anderem benutzen die Gendatenbanken eine andere, meist aktuellere Taxonomie und Systematik als die in der lichtmikroskopischen Routine. Fehlende Bestimmungsschlüssel für erst kürzlich genetisch abgegrenzte Arten konservieren wiederum die bisherige Benennung in den LM-Zähllisten. Die Schwierigkeit der Zuordnung gleichsinniger Taxanamen sollte in Zukunft durch Datentools ähnlich wie das „EAW taxa analysis tool“ gelöst und nomenklatorische Online-Datenbanken genutzt werden, um die aktuellen Synonymlisten zusammen mit den HTS-Taxonomie-Ausgaben bereitzustellen.

Hinsichtlich der Tiefe der Bestimmung muss beachtet werden, dass das angewendete Metabarcoding-Verfahren mit den gewählten Primern auf relativ kurzen Sequenzen beruht (312 - 401 Basenpaare) und die Länge durch den angewendeten Sequenzertyp MiSeq Sequencing limitiert ist. Diese kurzen DNA-Stücke erlauben nur eine begrenzte Anzahl an Unterscheidungen der Taxa und einige nahverwandte Taxa sind in dem Primerabschnitt zufällig identisch (Beispiel *Planktothrix rubescens* und *P. agardhii*). Durch neue Sequenzer-Typen, die längere DNA-Abschnitte verarbeiten können (doch viel kostenintensiver sind), sowie durch die Hinzunahme von weiteren Primern ist nach der derzeitigen, raschen Innovation auf dem Gebiet des Metabarcoding zu erwarten, dass in Zukunft die taxonomische Auflösung deutlich verbessert werden kann. Bereits jetzt lässt sich durch den vergleichenden Ansatz, die LM-Bestimmung für einige schwer bestimmbare Arten des Phytobenthos besonders außerhalb der Diatomeen genetisch überprüfen und Nachweise deutlich erweitern.

Den Ursachen für den fehlenden genetischen Nachweis von dominanten Taxa laut LM muss im Detail zum Beispiel mit weiteren Methoden (s. REM-Studie, Goos 2021) nachgegangen werden. Für die Datenprüfung der genetischen Befunde sind auch in Zukunft auf Taxonomie spezialisierte Bearbeiter unabdingbar, wie das oben erwähnte Synonymbeispiel *Gomphonema olivaceum* var. *olivaceum* (LM) zu *Gomphonella olivacea* (HTS) zeigt.

Bezüglich der Praktikabilität der eDNA-Probenahme-Anleitungen gab es bei der Anwendung in Bayern keine Probleme, doch es fiel relativ viel Verpackungsabfall an, da die Beprobungsmaterialien steril verpackt sind. Die Probenahme- und die Analysekosten für eDNA-Proben waren nicht oder etwas geringer als nach den lichtmikroskopischen Methoden. Die Vorteile bestanden darin, dass mit einer einzigen Probenahme eine Vielzahl weiterer Gewässerorganismen in kurzer Analysezeit erfasst wurde, und dafür keine taxonomisch geschulten Experten nötig waren. Dies erhöht die Objektivität der Taxanachweise und macht die Probenergebnisse aus einer großen Region (hier Alpenraum) untereinander besser vergleichbar.

Neben einer Dokumentation für die Öffentlichkeit, die das Metabarcoding-Verfahren allgemein verständlich erklärt (Eco-AlpsWater Broschüre 1, 2021), wurden in einer Zusammenstellung die Anleitungen für das eDNA-Monitoring in Alpengewässern für Endnutzer veröffentlicht (Eco-AlpsWater Broschüre 2, 2021), um die zukünftige Anwendung zu fördern.

Zusammenfassung/Schlussfolgerungen

Das EAW-Verfahren mittels HTS und Metabarcoding kann die mikroskopische Auswertung aktuell nicht ersetzen. Es bestehen deutliche Abweichungen in den ermittelten Arteninventaren zwischen den bisherigen Methoden und dem HTS Nachweisen. Phytoplanktontaxa werden mit den derzeitigen HTS-Listen zumeist nur auf Gattungsniveau identifiziert. Der genetische Nachweis von benthischen

Diatomeenarten gelingt bereits relativ gut und könnte durch Ergänzung von fehlenden Arten in den Gen-Referenzdatenbanken verbessert werden. Zweifelhafte Artnachweise sollten durch REM-Analysen und Anlegen von Kulturen geprüft werden.

Das getestete Metabarcoding-Verfahren wies eine Vielzahl an weiteren Gewässerorganismen nach, die ein großes Potential für die Biodiversitätsforschung und die Herleitung neuartiger und DNA-basierter Kenngrößen zur Bewertung von Gewässern bieten.

Danksagung

Für die Unterstützung bei der eDNA-Beprobung der Seen durch Mitarbeiter der Wasserwirtschaftsämter Weilheim und Rosenheim sowie durch Jutta Reichel wird gedankt. Die Phytobenthos-Beprobung an der Wertach wurde an Diana Schokrowski beauftragt, die dies exakt dokumentiert hat. Diese Untersuchung entstand im Rahmen des Projektes Eco-AlpsWater durch den Regionale Entwicklungsfond gefördert durch die EU und im INTERREG Alpine Transnational Cooperation Program für den Zeitraum 2014-2020 eingebunden. Die Arbeiten wurden durch das bayerische Projekt „Qualitätssicherung Phytoplankton - Prüfung neuer Methoden zur Bestimmung von Art und Biomasse“ (2018-2022; StMUV 78e0100000204JP) gefördert vom Ministerium für Umwelt und Verbraucherschutz unterstützt.

Liste der im Projekt erstellten Anleitungen (protocols)

Protokolle verfügbar auf protocols.io:

- Domaizon I. et al. 2019: Lake plankton sample collection from the field for downstream molecular analysis. Published in protocols.io: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.xn6fmhe
- Rimet F. et al. 2021: updated version- Lake biofilms sampling for both downstream DNA analysis and microscopic counts. Published in protocols.io: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.br2xm8fn
- Rimet F. et al. 2020: River biofilms sampling for both downstream DNA analysis and microscopic counts V.1. Published in protocols.io: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ben6jdhe
- Vautier M., C. Chardon, C. Capelli, R. Kurmayer, N. Salmaso, I. Domaizon (2021): Plankton DNA extraction from Sterivex filter units. Published in protocols.io: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bvgzn3x6
- Vautier M., V. Vasselon, C. Chardon, F. Rimet, A. Bouchez, I. Domaizon (2020): DNA extraction from environmental biofilm using the NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL), Published in protocols.io: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd52i88e
- Chardon C., V. Vasselon, M. Vautier, S. Lacroix, A. Bouchez, F. Rimet, I. Domaizon (2020): Diatom DNA library preparation for Illumina Miseq Sequencing using the rbcL marker gene. Published in protocols.io: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd94i98w

Protokolle verfügbar auf der Projektseite

- Pindo M., A. Boscaini, N. Salmaso, G. Riccioni (2020): Illumina library preparation protocol: eDNA metabarcoding analyses of bacterioplankton communities - Deliverable D.T1.3.1-10 - Interreg Alpine Space - Eco-AlpsWater project – WP1
- Pindo M., A. Boscaini, N. Salmaso, G. Riccioni (2020): Illumina library preparation protocol: eDNA metabarcoding analyses of eukaryotic microplankton communities - Deliverable D.T1.3.1-11 Interreg Alpine Space - Eco-AlpsWater project – WP1
- Vasselon, V. 2018: Diatom DNA metabarcoding bioinformatics pipeline “Mothur” software, Miseq, rbcL 312 bp - Deliverable D.T1.1.3 Interreg Alpine Space - Eco-AlpsWater project – WP1

Protokolle verfügbar auf Zenodo.org:

- Salmaso Nico; Giulia Riccioni; Massimo Pindo; Valentin Vasselon; Isabelle Domaizon; Rainer Kurmayer (2021): Metabarcoding protocol – Analysis of Bacteria (including Cyanobacteria) using the 16S rRNA gene and a DADA2 pipeline. Published in zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5232772>
- Salmaso Nico; Giulia Riccioni; Massimo Pindo; Rainer Kurmayer; Valentin Vasselon; Isabelle Domaizon (2021): Metabarcoding protocol – Analysis of protists using the 18S rRNA gene and a DADA2 pipeline. Published in zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5233527>

Literatur

- Bauer F, Fastner J, Bartha-Dima B, et al. (2020): Mass Occurrence of Anatoxin-a- and Dihydroanatoxin-a-Producing *Tychonema* sp. in Mesotrophic Reservoir Mandichosee (River Lech, Germany) as a Cause of Neurotoxicosis in Dogs. *Toxins*: 12(11):726.
- Eco-AlpsWater Broschüre 1 (2021): Alpine Gewässer & eDNA - Broschüre für die breite Öffentlichkeit (D). <https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/en/home>.
- Eco-AlpsWater Broschüre 2 (2021): Technische Leitlinien für das eDNA-Monitoring in Alpengewässern – für Interessenvertreter und Endnutzer (D). <https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/en/home>.
- Goos, C. (2021): Report “Validation of Diatom Species Identification by scanning electronic microscopy in the Framework of WP3 and WP4”. Service "Eco-AlpsWater REM Analysen Diatomeen" contracted by the Bavarian Environmental Agency (LfU) in the frame of the European Interreg-project Eco-AlpsWater.
- Keck, F., Vasselon, V., Rimet, F., Bouchez, A., & Kahlert, M. (2018). Boosting DNA metabarcoding for biomonitoring with phylogenetic estimation of operational taxonomic units' ecological profiles. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1299–1309
- Kurmayer, R., Sivonen, K., Wilmotte, A., and Salmaso, N. (2017). *Molecular Tools for the Detection and Quantification of Toxigenic Cyanobacteria*. Wiley, Chichester.
- Mischke U., Salmaso N., Kurmayer R., Elersek T, Riccioni G., Rund H., Domaizon I. (2021): Database for the classification and distribution of aquatic species accessible by stakeholders. Deliverable D.T1.2.3 in the frame of the European Interreg-project Eco-AlpsWater.
- Pérès, F., Barthès, A., Ponton, E., Coste, M., Ten-Hague, L. & Le-Cohu, R. (2012). *Achnantheidium delmontii* sp. nov., a new species from French rivers. *Fottea* 12(2): 189-198, 85 fig., 1 table.
- Salmaso N., Boscaini A., Pindo M. (2020): Unraveling the Diversity of Eukaryotic Microplankton in a Large and Deep Perialpine Lake Using a High Throughput Sequencing Approach, *Frontiers in Microbiology* Vol.11: 789, DOI=10.3389/fmicb.2020.00789
- Schmidt-Kloiber A. & Hering D. (eds.): www.freshwaterecology.info - the taxa and autecology database for freshwater organisms, (accessed on 11.12.2019).
- Vasselon, V., Domaizon, I., Rimet, F., Kahlert, M., & Bouchez, A. (2017). Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter? *Freshwater Science*, 36, 162–177
- Vasselon, V., Rimet, F., Tapolczai, K., & Bouchez, A. (2018). Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte Island, France). *Ecological Indicators*, 82, 1–12.