



**Dr. Andrea Barco &
Dr. Thomas Knebelsberger GbR**

Emsstraße 20
26382 Wilhelmshaven

Tel.: +49 4421 7795 564
Email: identify@biome-id.com
Internet: www.biome-id.com

**An:
Dr. Volkmar Kuschka
Talstraße 10
D-09557 Flöha**

Date: 31.08.2021
Project N.: 2021-159

Ergebnisbericht

Projektnummer 2021-159

biome-id Dr. Andrea Barco & Dr. Thomas Knebelsberger GbR	Anschrift Emsstrasse 20 26382 Wilhelmshaven	E-mail identify@biome-id.com	Ust.-IdNr. DE314476713
	Telefon +49 4421 7795 564	Internet www.biome-id.com	Bankverbindung IBAN: DE45 2824 0023 0331 4739 00 BIC: COBADEFFXXX

1 Probenvorbereitung

Insgesamt wurden 4 Sterivex Filterproben (siehe Tabelle 1) unter einer Labor-Workbench geöffnet. Das Filtergewebe wurde mit sterilen Skalpellklingen zerkleinert und bei Raumtemperatur getrocknet.

Tabelle 1. Probenliste

Proben-Nr.	Probe	Beschreibung
1	AK01	Bahntrasse
2	AK02	Gewerbegebiet
3	AK03	Teich im Bürgergarten
4	AK04	Gartenteich

2 DNA-Extraktion

Das zerkleinerte Filtergewebe wurden in einem Reaktionsvolumen von 5 ml mit 3 ml T1-Lysepuffer (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und 0,3 ml Proteinase über Nacht bei 56°C inkubiert. Die eDNA wurden mit dem NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aus dem Lysat extrahiert aufgereinigt.

3 PCR und Erstellung der Illumina Libraries

Für jede Probe wurde ein ca. 55-bp-Fragment des mitochondrialen 12S Gens mit amphibienspezifischen Primern durch PCR vervielfältigt. Die Qualität der PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese auf einem mit GelRed® (Biotium Inc. Fremont, CA, USA) gefärbten 2%-igen Agarosegel visuell überprüft. Die Illumina®-Libraries wurden mit einer zweiten PCR hergestellt, um die PCR-Produkte mit probenzpezifischen Doppelindizes und Illumina®-Sequenzierungsadaptern zu versehen. Die Konzentration der einzelnen PCR-Produkte wurde mit einem fluorometrischen Assay gemessen (QuantiFluor®, Promega GmbH Walldorf, Germany) und die Libraries anschließend in äquimolaren Konzentrationen gemischt. Die gepoolte Libraries wurden mit einer Illumina® NovaSeq-Plattform in zwei Läufen (2 × 150 bp *Paired-End*-Modus) sequenziert.

4 Datenanalyse

Die Anzahl der *paired-end*-Sequenzen pro Probe variierte zwischen 166.034 und 312.610. Die folgende bioinformatische Analyse wurde mit dem Programm *vsearch* durchgeführt (Rognes et al., 2016). Jedes Sequenz-Paar mit einem Mindestüberlappungswert von 50 bp wurden zusammengeführt. Alle übrigen nicht zusammengeführten Sequenzen wurden verworfen. Alle Sequenzen mit mindestens einer unbekannten Base (N) und alle die, die in allen Proben nur einmal vorkommen, wurden in der Filterstufe entfernt. Identische Sequenzen wurden zusammengeführt (oder „derepliziert“). Alle potentiellen Chimärensequenzen (Artefaktsequenzen, die von mehreren Ursprungssequenzen stammen) wurden erkannt und aus der Probe entfernt. Jede eindeutige Sequenz repräsentiert eine Molecular Operational Taxonomic Unit (MOTU) (Tabelle 2, *Number of MOTUs*).

Tabelle 2. Liste der bearbeiteten Proben, Ergebnisse der Sequenzierung und bioinformatischen Verarbeitung.

Sample	Marker	Read Pairs	Number of MOTUs	Taxonomically assigned MOTUs	Species
AK01	12S	307.998	6639	554	5
AK02	12S	312.610	6459	175	5
AK03	12S	166.034	3097	1519	5
AK04	12S	168.793	4371	814	6

5 Taxonomische Zuordnung

Eine Referenzdatenbank für die taxonomische Zuordnung der MOTUs wurde aus allen in GenBank öffentlich zugänglichen 12S-Sequenzen von Amphibienarten, die in Deutschland vorkommen, zusammengestellt. Die Sequenzen wurden dann mit Hilfe eines lokal installierten BLAST-Algorithmus (Camacho et al., 2008) mit den Referenzdaten abgeglichen und den am besten übereinstimmenden Arten zugeordnet. Alle Übereinstimmungen unter 98 % wurden verworfen (Tabelle 2, *Taxonomically assigned MOTUs*). Die Ergebnisse der taxonomischen Bestimmung der MOTUs sind in einer separaten Tabelle aufgelistet (angehängte Datei). Aufgrund der genetischen Variabilität der einzelnen Arten können mehrere MOTUs der gleichen Art zugeordnet werden. Die korrigierte Anzahl der identifizierten Arten wird daher durch das Zusammenfassen von MOTUs mit der gleichen taxonomischen Zuordnung berechnet (Tabelle 2, *Species*).

6 Ergebnistabellen und Dateninterpretation

Die folgenden Informationen helfen dabei die Ergebnisse in der angehängten Tabelle richtig zu interpretieren:

MOTU Nr: Nummer der vom Clustering-Algorithmus zugeordneten MOTU.

Match: taxonomische Zuordnung auf der Grundlage der am besten übereinstimmenden Sequenz in der Referenzdatenbank.

% match: Prozentsatz der Übereinstimmung zwischen der Sequenz und der Referenz.

Ref. Length: Länge der Referenzsequenzen (in Nukleotiden)

Overlap: Länge der zu identifizierenden Sequenzen (in Nukleotiden)

Ein Großteil der MOTUs aus den Wasserproben wurde keinem bekannten Taxon mit signifikantem Konfidenzniveau zugeordnet. Es besteht ein großer Unterschied zwischen detektierten MOTUs und taxonomisch zugeordneten MOTUs (Tabelle 1). Die meisten dieser nicht zugeordneten MOTUs stammen von einzelligen Eukaryoten, die zwangsläufig in der Wassersäule vorhanden sind und im Filtrationsprozess nicht eliminiert werden. Da die meisten dieser Organismen nicht in der Referenzdatenbank dokumentiert sind (zumindest nicht mit dem in dieser Studie verwendeten genetischen Marker), werden diese MOTUs bei der Auswertung der nachgewiesenen Amphibienarten verworfen.

7 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 3 sind die MOTUSs und die Anzahl der darin enthaltenen Sequenzen für jede Art pro Probe zusammengefasst. Die grüne Markierung zeigt Artpräsenz mit einer sehr hohen Vorkommenswahrscheinlichkeit an. Die gelbe Markierung kennzeichnet ungesicherte Vorkommen (weniger als 10 Sequenzen), da nur eine sehr geringe Zahl von Sequenzen für eine Art in einer Probe nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 3. Anzahl der Sequenzen pro Art und Probe.

Species	common name	AK01	AK02	AK03	AK04
<i>Alytes obstetricans</i>	Geburtshelferkröte	0	0	0	2
<i>Bufo bufo</i>	Erdkröte	1779	1887	145544	18178
<i>Lissotriton vulgaris</i>	Teichmolch	1120	80	1541	823
<i>Mesotriton alpestris</i>	Bergmolch	6686	59	312	274
<i>Rana temporaria</i>	Grasfrosch	16	15	214	786
<i>Triturus cristatus</i>	Kammolch	9	4	10	411

8 Häufigkeit der Arten

Die Gesamtzahl der Sequenzen kann verwendet werden, um die Biomasse jeder Art in der Probe abzuschätzen. Dies gilt nur unter der Annahme, daß die PCR-Primer für jede Art dieselbe Bindungsaffinität aufweisen.

9 Referenzen

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. 2008. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584.