

TEXTE

142/2023

Abschlussbericht

Bewertung der biologischen Vielfalt mittels DNA-Extraktion aus Bodenproben von BDF

von:

Stephan Jänsch, Adam Scheffczyk, Jörg Römbke
ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim (Deutschland)

Verónica Rojo, Joaquín Vierna, Antón Vizcaíno
AllGenetics & Biology SL, A Coruña (Spanien)

Tiago Natal da Luz, Daniela Alves, Pedro Martins, Sara Mendes, Leticia Scopel, José Paulo Sousa
CloverStrategy Lda., Coimbra (Portugal)

Paul Henning Krogh, Rumakanta Sapkota
Universität Aarhus (Dänemark)

Rüdiger M. Schmelz
A Coruña (Spanien)

Herausgeber:

ECT

TEXTE 142/2023

Ressortforschungsplan des Bundesministeriums für
Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und
Verbraucherschutz

Forschungskennzahl 3717 74 234 0

FB001131

Abschlussbericht

Bewertung der biologischen Vielfalt mittels DNA-Extraktion aus Bodenproben von BDF

von

Stephan Jänsch, Adam Scheffczyk, Jörg Römbke
ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim (Deutschland)

Verónica Rojo, Joaquín Vierna, Antón Vizcaíno
AllGenetics & Biology SL, A Coruña (Spanien)

Tiago Natal da Luz, Daniela Alves, Pedro Martins, Sara
Mendes, Letícia Scopel, José Paulo Sousa
CloverStrategy Lda., Coimbra (Portugal)

Paul Henning Krogh, Rumakanta Sapkota
Universität Aarhus (Dänemark)

Rüdiger M. Schmelz
A Coruña (Spanien)

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
buergerservice@uba.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

Durchführung der Studie:

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
65439 Flörsheim

AllGenetics & Biology SL
Cubelos, 21, bajo A2, Perillo
15172 Oleiros (A Coruña)
Spanien

Dr. Rüdiger M. Schmelz
Paseo Marítimo 3, 7°C
15002 A Coruña
Spanien

Aarhus University,
Department of Ecoscience
C.F. Møllers Allé 4
8000 Aarhus C
Dänemark

CloverStrategy Lda.
Instituto Pedro Nunes,
Rua Pedro Nunes
Edifício C - INC 1.31, 1.32
3030-199 Coimbra, Portugal
Portugal

Abschlussdatum:

Februar 2023

Redaktion:

Fachgebiet II 2.7 Bodenzustand, Bodenmonitoring
Frank Glante

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, Oktober 2023

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Kurzbeschreibung: Bewertung der biologischen Vielfalt mittels DNA-Extraktion aus Bodenproben von BDF

In Deutschland fehlt eine flächendeckende und standardisierte Erfassung der Bodenorganismen, obwohl mit den ca. 800 Boden-Dauerbeobachtungsflächen (BDF) eine umfassende Infrastruktur dafür zur Verfügung steht. Allerdings führen bisher nicht alle Bundesländer eigene bodenbiologische Untersuchungen auf ihren BDF durch. Wichtigster Grund dafür dürfte die aufwändige und teure Bestimmung der Bodeninvertebraten sein. Zur Lösung dieses Problems sollte das vorliegende Vorhaben beitragen. An 25 Standorten wurden Regenwürmer, Enchytraeiden und Collembolen erfasst, die Tiere morphologisch und per DNA-Metabarcoding bestimmt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Das Ziel war, Empfehlungen für ein effizientes und routinemäßig umsetzbares Monitoring der Bodenfauna im Rahmen des deutschen BDF-Programms zu entwickeln. Die Ergebnisse zeigten, dass die genetischen Bestimmungsmethoden hierfür grundsätzlich geeignet sind. Vor einer Einführung in die behördliche Praxis müssen noch einige Voraussetzungen erfüllt werden. Die DNA-Referenzdatenbanken müssen umfassend, gut kuratiert und qualitätskontrolliert sein. DNA-basierte Methoden müssen standardisiert werden. Es müssen belastbare Indizes für die Bodengesundheit, basierend auf Daten zu Bodenorganismen entwickelt werden. Es wird empfohlen, dass die Erhebungen bezüglich der Bodenfauna in allen Bundesländern im gleichen Umfang und mit gleichen Methoden erfolgen. Bodenorganismen sollten zunächst mit klassisch morphologischen Methoden regelmäßig erfasst werden, mindestens Regenwürmer, Enchytraeiden und Collembolen. Die Aufnahme weiterer Gruppen sollte geprüft werden. Die Einführung genetischer Methoden sollte, beginnend mit den Regenwürmern, schrittweise erfolgen. Die erhobenen Daten sollten zentral zusammengeführt und der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden. Langfristig sollte Umwelt-DNA-Metabarcoding standardmäßig zur Untersuchung und Bewertung der biologischen Vielfalt des Bodens eingesetzt werden.

Abstract: Biodiversity assessment using DNA extraction from soil samples from permanent soil monitoring sites

Germany lacks a nationwide and standardised survey of soil organisms, although a comprehensive infrastructure for this is available with the approx. 800 Permanent Soil Monitoring Sites (BDF). However, not all federal states conduct their own soil biology surveys on their BDF. The most important reason for this is probably the time-consuming and expensive identification of soil invertebrates. The present project should contribute to solving this problem. Earthworms, enchytraeids and collembolans were sampled at 25 sites, the animals were determined morphologically and by DNA metabarcoding, and the results were compared with each other. The aim was to develop recommendations for an efficient and routinely implementable monitoring of soil fauna within the German BDF programme. The results showed that genetic identification methods are basically suitable for this purpose. Before they can be introduced into official practice, several preconditions still must be met. DNA reference databases must be comprehensive, well curated and quality controlled. DNA-based methods need to be standardised. Robust indices of soil health based on soil organism data need to be developed. It is recommended that soil fauna surveys be carried out to the same extent and using the same methods in all federal states. Soil organisms should first be regularly recorded using classical morphological methods, at least earthworms, enchytraeids and collembolans. The inclusion of further groups should be examined. Genetic methods should be introduced gradually, starting with earthworms. The data collected should be compiled centrally and made available to the public. In the long term, environmental DNA metabarcoding should be used as standard for investigating and assessing soil biodiversity.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	13
Tabellenverzeichnis.....	26
Abkürzungsverzeichnis.....	38
Zusammenfassung.....	40
Summary.....	46
1 Einleitung.....	52
2 Erkenntnisstand.....	54
3 AP 1: Literaturobwertung zum Stand der Forschung.....	58
3.1 Bestehende nationale und internationale Boden-Monitoringprogramme.....	58
3.1.1 Boden-Dauerbeobachtung in Deutschland.....	58
3.1.2 Landwirtschaftliche Dauerfeldversuche (DFV) / Boden als nachhaltige Ressource für die Bioökonomie („BonaRes“).....	64
3.1.3 Umweltprobenbank / Projekt TrendDNA.....	64
3.1.4 „Soil Biodiversity Observation Network“ (Soil BON).....	65
3.1.5 „EU Soil Observatory“ (EUSO) / „Land Use and Coverage Area frame Survey“ (LUCAS).....	66
3.2 Kenntnisstand zur Bodenbiodiversität.....	67
3.2.1 Beitrag von Bodenorganismen zu Ökosystemfunktionen und -dienstleistungen.....	67
3.2.2 Beeinflussung von Bodeninvertebraten durch anthropogene abiotische und biotische Faktoren sowie Landnutzung.....	69
3.3 Metabarcoding der Bodenfauna.....	72
3.3.1 Was ist Gemeinschafts-DNA (comDNA)?.....	73
3.3.2 Was ist Umwelt-DNA (eDNA)?.....	73
3.3.2.1 Vorteile.....	75
3.3.2.2 Fallstricke.....	76
3.3.3 DNA-Metabarcoding als Instrument zur Untersuchung biologischer Gemeinschaften.....	78
3.3.3.1 Was ist DNA-Metabarcoding?.....	78
3.3.3.2 Anwendungen.....	79
3.3.3.3 Technische Herausforderungen.....	80
3.3.4 Einführung von eDNA-Analyse und Metabarcoding in das routinemäßige Biomonitoring.....	81
4 AP 2: Auswahl von Standorten im BDF-Programm – Probenahme.....	84
4.1 Ausgewählte Standorte.....	84

4.2	Ausgewählte Organismengruppen	88
4.3	Pilotstudie	88
4.3.1	Probenahme und Arbeitsablauf.....	89
4.3.2	Regenwürmer	94
4.3.2.1	Erfassung im Freiland.....	94
4.3.2.2	Probenaufbereitung und morphologische Bestimmung	94
4.3.2.3	Herstellung der comDNA-Proben	94
4.3.3	Enchytraeiden	94
4.3.3.1	Erfassung im Freiland.....	94
4.3.3.2	Probenaufbereitung und morphologische Bestimmung	95
4.3.3.3	Herstellung der comDNA-Proben	95
4.3.4	Collembolen	95
4.3.4.1	Erfassung im Freiland.....	95
4.3.4.2	Probenaufbereitung und morphologische Bestimmung	96
4.3.4.3	Herstellung der comDNA-Proben	96
4.3.5	eDNA-Extraktion aus Bodenproben.....	96
4.3.6	DNA-Metabarcoding-Analyse von eDNA-Bodenextrakten und comDNA-Proben beim Unterauftragnehmer AllGenetics	97
4.3.6.1	Material und Methoden	97
4.3.6.2	Ergebnisse.....	101
4.3.7	DNA-Metabarcoding-Analyse von eDNA-Bodenextrakten und comDNA-Proben beim Unterauftragnehmer Universität Aarhus.....	115
4.3.7.1	Material und Methoden	115
4.3.7.2	Ergebnisse.....	116
4.3.8	Fazit aus der Pilotstudie.....	116
4.4	Hauptstudie.....	117
4.4.1	Probenahme und Arbeitsablauf.....	117
4.4.2	DNA-Metabarcoding-Analyse von eDNA-Bodenextrakten und comDNA-Proben für Lumbriciden und Enchytraeiden beim Unterauftragnehmer AllGenetics	119
4.4.2.1	Probenannahme und DNA-Isolierung.....	119
4.4.2.2	Vorbereitung und Sequenzierung von DNA-Metabarcoding-Bibliotheken.....	119
4.4.2.3	Qualitätskontrolle von Sequenzierungsdaten	120
4.4.2.4	Verarbeitung von Sequenzierungsdaten und Ableitung von ASVs.....	120
4.4.2.5	Verarbeitung der Negativkontrollproben.....	121
4.4.2.6	Taxonomische Zuordnung	121

4.4.3	DNA-Metabarcoding-Analyse von eDNA-Bodenextrakten und comDNA-Proben für Collembolen beim Unterauftragnehmer Universität Aarhus	122
4.4.3.1	Proben für DNA-Isolation.....	122
4.4.3.2	Erstellung einer DNA-Metabarcoding Bibliothek und Sequenzierung	123
4.4.3.3	Vorverarbeitung von Sequenzierungsdaten.....	123
4.4.3.4	Taxonomische Zuordnung	123
5	AP 3: Methodenvergleiche – Auswertung.....	125
5.1	Vergleich von morphologischen, comDNA- und eDNA-Analysen.....	125
5.1.1	Methodik.....	125
5.1.1.1	Bereinigung von Artenlisten zum Methodenvergleich.....	125
5.1.1.2	Grafische Darstellung des Methodenvergleichs.....	127
5.1.2	Regenwürmer	129
5.1.2.1	Artenreichtum pro Methode an allen Standorten	130
5.1.2.2	Diversität (Shannon-Index) pro Methode über alle Standorte.....	131
5.1.2.3	Bland-Altman-Plot-Analyse.....	133
5.1.2.4	Nachweishäufigkeit pro Art und Methode	135
5.1.2.5	Hauptkoordinatenanalyse	136
5.1.2.6	Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von Arten und der relativen Anzahl von eDNA-Metabarcoding-Reads	138
5.1.2.7	Zusammenfassung des Regenwurm-Methodenvergleichs.....	145
5.1.3	Enchytraeiden	145
5.1.3.1	Artenzahl.....	146
5.1.3.2	Artenzusammensetzung	147
5.1.3.3	Artenabundanz	153
5.1.3.4	Abundanz ökologischer Gruppen	156
5.1.3.5	Zusammenfassung des Enchytraeiden-Methodenvergleichs.....	158
5.1.4	Collembolen	159
5.1.4.1	Positivkontrollen.....	159
5.1.4.2	Artenzahl.....	160
5.1.4.3	Artenzusammensetzung	163
5.1.4.4	Zusammenfassung des Collembolen-Methodenvergleichs.....	163
5.1.5	Mögliche Gründe für Diskrepanzen zwischen den Bestimmungsmethoden.....	164
5.2	Vergleich mit Erwartungswerten nach Bodennutzung.....	165
5.2.1	Methodik.....	165
5.2.2	Regenwürmer	169

5.2.3	Enchytraeiden	172
5.3	Kostenabschätzung pro Bestimmungsmethode	177
6	AP 4: Bewertung der Methoden für den Routinebetrieb	180
6.1	Zwecke, Nutzung/Anwendungsbereiche und Einschränkungen der Boden-Dauerbeobachtung	180
6.2	Bewertung der Methoden für den Routinebetrieb in der Boden-Dauerbeobachtung	181
7	AP 5: Fachgespräch (Workshop) – Vorschläge für das weitere Vorgehen.....	183
7.1	Fachgespräch (Workshop)	183
7.2	Empfehlungen für das weitere Vorgehen und Forschungsbedarf.....	184
8	Öffentlichkeitsarbeit.....	186
8.1	Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 14th Special Science Symposium (SESS) on Soil Biodiversity.....	186
8.2	Abstract: Marktredwitzer Bodenschutztagung.....	186
8.3	SETAC Europe, Kopenhagen.....	186
8.4	14th International Symposium on Enchytraeidae (ISE 14)	186
8.5	12th International Symposium on Earthworm Ecology (ISEE 12)	186
8.6	The 3 rd Global Soil Biodiversity Conference.....	186
9	Quellenverzeichnis	187
A	Ergebnisse der drei Bestimmungsmethoden in der Hauptstudie.....	202
A.1	Morphologische Bestimmung.....	202
A.1.1	Regenwürmer	202
A.1.2	Enchytraeiden	208
A.1.3	Collembolen.....	214
A.2	Bestimmung mittels comDNA-Metabarcoding.....	220
A.2.1	Regenwürmer	220
A.2.2	Enchytraeiden	223
A.2.3	Collembolen.....	230
A.3	Bestimmung mittels eDNA-Metabarcoding.....	233
A.3.1	Regenwürmer	233
A.3.2	Enchytraeiden	235
A.3.3	Collembolen.....	242
B	Vergleich der Artengemeinschaft pro Methode und Standort.....	249
B.1	Regenwürmer.....	249
B.1.1	ALM: Almesbach Stallkoppel (Weiden i.d. Oberpfalz), Bayern.....	249
B.1.2	BIM: Bad Bramsted (Bimöhlen), Schleswig-Holstein	251

B.1.3	BOV: Bovenden, Niedersachsen	252
B.1.4	BRU: Bruchsal (Forst), Baden-Württemberg.....	253
B.1.5	EUT: Wüstenfelde (Eutin), Schleswig-Holstein	254
B.1.6	FIS: Fichte Süd (Monschau), Nordrhein-Westfalen	255
B.1.7	GAL: Galgenberg (Elbingerode), Sachsen-Anhalt.....	256
B.1.8	GHU: Großenhül In der Huh (Thurnau), Bayern	257
B.1.9	KAN: Kandel/Schaidt, Rheinland-Pfalz	258
B.1.10	KLK: Klein-Krauscha (Neißeau), Sachsen.....	259
B.1.11	KUM: Kümmelwiese (Braunlage), Sachsen-Anhalt	260
B.1.12	LIS: Saarlouis-Lisdorf, Saarland	261
B.1.13	MER: Merzalben, Rheinland-Pfalz	262
B.1.14	NEU: Neuhäuserfelde (Neuhaus), Niedersachsen	263
B.1.15	PAU: Paulinenaue, Brandenburg	264
B.1.16	POS: Possen (Sondershausen), Thüringen	265
B.1.17	SBU: Schlegeler Buchberg (Zittau-Schlegel), Sachsen.....	266
B.1.18	SHG: Schwanheim II (Kelsterbach), Hessen	267
B.1.19	SHW: Schwanheim 1 (Kelsterbach), Hessen	268
B.1.20	SLT: Sülstorf, Mecklenburg-Vorpommern	269
B.1.21	TRO: Trochtelfingen, Baden-Württemberg	270
B.1.22	WBU: Wächterbuche (Monschau), Nordrhein-Westfalen.....	271
B.1.23	WOL: Wolferschwenda, Thüringen.....	272
B.1.24	ZEC: Zeckerin, Brandenburg.....	273
B.1.25	ZIN: Zingst, Mecklenburg-Vorpommern	274
B.2	Enchytraeiden	275
B.2.1	ALM: Almesbach Stallkoppel (Weiden i.d. Oberpfalz), Bayern.....	275
B.2.2	BIM: Bad Bramsted (Bimöhlen), Schleswig-Holstein	277
B.2.3	BOV: Bovenden, Niedersachsen	279
B.2.4	BRU: Bruchsal (Forst), Baden-Württemberg.....	281
B.2.5	EUT: Wüstenfelde (Eutin), Schleswig-Holstein	283
B.2.6	FIS: Fichte Süd (Monschau), Nordrhein-Westfalen	285
B.2.7	GAL: Galgenberg (Elbingerode), Sachsen-Anhalt.....	286
B.2.8	GHU: Großenhül In der Huh (Thurnau), Bayern	288
B.2.9	KAN: Kandel/Schaidt, Rheinland-Pfalz	290
B.2.10	KLK: Klein-Krauscha (Neißeau), Sachsen.....	292

B.2.11	KUM: Kümmelwiese (Braunlage), Sachsen-Anhalt	294
B.2.12	LIS: Saarlouis-Lisdorf, Saarland	296
B.2.13	MER: Merzalben, Rheinland-Pfalz	298
B.2.14	NEU: Neuhäuserfelde (Neuhaus), Niedersachsen	300
B.2.15	PAU: Paulinenaue, Brandenburg	302
B.2.16	POS: Possen (Sondershausen), Thüringen	304
B.2.17	SBU: Schlegeler Buchberg (Zittau-Schlegel), Sachsen.....	306
B.2.18	SHG: Schwanheim II (Kelsterbach), Hessen	308
B.2.19	SHW: Schwanheim 1 (Kelsterbach), Hessen	310
B.2.20	SLT: Sülstorf, Mecklenburg-Vorpommern	312
B.2.21	TRO: Trochtelfingen, Baden-Württemberg	314
B.2.22	WBU: Wächterbuche (Monschau), Nordrhein-Westfalen.....	316
B.2.23	WOL: Wolferschwenda, Thüringen.....	318
B.2.24	ZEC: Zeckerin, Brandenburg.....	319
B.2.25	ZIN: Zingst, Mecklenburg-Vorpommern	321
B.3	Collembolen	323
B.3.1	ALM: Almesbach Stallkoppel (Weiden i.d. Oberpfalz), Bayern.....	323
B.3.2	BIM: Bad Bramsted (Bimöhlen), Schleswig-Holstein	325
B.3.3	BOV: Bovenden, Niedersachsen	328
B.3.4	BRU: Bruchsal (Forst), Baden-Württemberg.....	331
B.3.5	EUT: Wüstenfelde (Eutin), Schleswig-Holstein	333
B.3.6	FIS: Fichte Süd (Monschau), Nordrhein-Westfalen	336
B.3.7	GAL: Galgenberg (Elbingerode), Sachsen-Anhalt.....	339
B.3.8	KAN: Kandel/Schaidt, Rheinland-Pfalz.....	341
B.3.9	KLK: Klein-Krauscha (Neißeau), Sachsen.....	344
B.3.10	LIS: Saarlouis-Lisdorf, Saarland	346
B.3.11	MER: Merzalben, Rheinland-Pfalz	348
B.3.12	NEU: Neuhäuserfelde (Neuhaus), Niedersachsen	351
B.3.13	PAU: Paulinenaue, Brandenburg	353
B.3.14	SBU: Schlegeler Buchberg (Zittau-Schlegel), Sachsen.....	355
B.3.15	SHG: Schwanheim II (Kelsterbach), Hessen	357
B.3.16	SHW: Schwanheim 1 (Kelsterbach), Hessen	359
B.3.17	SLT: Sülstorf, Mecklenburg-Vorpommern	362
B.3.18	TRO: Trochtelfingen, Baden-Württemberg	364

B.3.19	WBU: Wächterbuche (Monschau), Nordrhein-Westfalen.....	366
B.3.20	WOL: Wolferschwenda, Thüringen.....	369
B.3.21	ZEC: Zeckerin, Brandenburg.....	371
B.3.22	ZIN: Zingst, Mecklenburg-Vorpommern.....	373

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Verbindungen zwischen der EU-Bodenstrategie und anderen EU-Initiativen	55
Abbildung 2:	Wichtige Pfade, über die funktionale Gruppen von Regenwürmern bodenbezogene Prozesse und Ökosystemleistungen beeinflussen. Die Dicke der Pfeile steht für die relative Bedeutung (Keith & Robinson 2012)	69
Abbildung 3:	Quellen von eDNA in Böden	74
Abbildung 4:	Mögliche Fehler bei falsch-positiven und falsch-negativen Nachweisen bei eDNA-Analysen	78
Abbildung 5:	Arbeitsablauf beim DNA-Metabarcoding	79
Abbildung 6:	Lage, Kürzel und Landnutzung der 25 ausgewählten Standorte in Deutschland (Rot = Acker, Grün = Grünland, Blau = Wald; Standortkürzel siehe Tabelle 4)	85
Abbildung 7:	Schematische Darstellung einer Probenahme­fläche in der Pilotstudie	90
Abbildung 8:	Probenahmeschema der Bodenkerne in der Pilotstudie. Abstand der Punkte: 1 m	91
Abbildung 9:	Erläuterung zum schematisierten Arbeitsablauf bei der Probenahme in der Pilotstudie (siehe folgende Abbildung)	91
Abbildung 10:	Schematisierter Arbeitsablauf bei der Probenahme in der Pilotstudie	92
Abbildung 11:	Auftrennung der eDNA-Proben in einzelne Bodenschichten und Herstellung von Mischproben	93
Abbildung 12:	Schematische Darstellung der für PCR1 und PCR2 verwendeten Primer. Die Positionen der Illumina-Adapter, Indizes und Sequenzierprimer sind ebenfalls dargestellt	98
Abbildung 13:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl und die Identität der Enchytraeidentaxa zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding am Standort Kümmelwiese (KUM) identifiziert wurden	102
Abbildung 14:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl und die Identität der Lumbricidentaxa zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding am Standort Kümmelwiese (KUM) identifiziert wurden	105
Abbildung 15:	Artenzahl der Regenwürmer (links) und Enchytraeiden (rechts) in Abhängigkeit von der Anzahl einzelner Bodenkerne (4, 8, 12, 16, 20) für die eDNA-Mischproben an den drei Standorten der Pilotstudie (Standortkürzel siehe Tabelle 4)	107

Abbildung 16:	Venn-Diagramme, die die Anzahl der ausschließlich und gemeinsam durch den 16S-Marker und den COI-Marker nachgewiesenen Enchytraeiden- (links) und Regenwurmarten (rechts) zeigen, wenn die DNA-Metabarcoding-Analysen im AU eDNA-Center oder bei AllGenetics (AG) durchgeführt wurden	109
Abbildung 17:	Probenahmeschema der Bodenkerne in der Hauptstudie. Abstand der Punkte: 1 m	118
Abbildung 18:	Box-Whisker-Plot, der die Verteilung des Artenreichtums der Regenwürmer pro Bestimmungsmethode über alle Standorte zeigt	130
Abbildung 19:	Artenreichtum der Regenwürmer pro Bestimmungsmethode und Standort (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	131
Abbildung 20:	Box-Whisker-Plot, der die Verteilung der Diversität (Shannon-Index) der Regenwürmer pro Bestimmungsmethode über alle Standorte zeigt	132
Abbildung 21:	Diversität (Shannon-Index) der Regenwürmer pro Bestimmungsmethode und Standort (Standortkürzel siehe Tabelle 4)	132
Abbildung 22:	Bland-Altman-Plot-Analyse zur Illustration der Unterschiede zwischen der morphologisch bestimmten und anhand comDNA-Metabarcoding festgestellten Artenzahl pro Standort (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	134
Abbildung 23:	Bland-Altman-Plot-Analyse zur Illustration der Unterschiede zwischen der morphologisch bestimmten und anhand eDNA-Metabarcoding festgestellten Artenzahl pro Standort (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	134
Abbildung 24:	Anzahl der Standorte, an denen jede Regenwurmart mit allen Bestimmungsmethoden bzw. mit jeder einzelnen Bestimmungsmethode nachgewiesen wurde	136
Abbildung 25:	Hauptkoordinatenanalyse auf Grundlage der Ähnlichkeit (Jaccard-Koeffizient) zwischen Standorten und Bestimmungsmethoden bezüglich der Regenwurm-Artenzusammensetzung (Präsenz/Absenz).....	137
Abbildung 26:	Hauptkoordinatenanalyse auf Grundlage der Unähnlichkeit (Bray-Curtis-Koeffizient) zwischen Standorten und Bestimmungsmethoden bezüglich der Regenwurm-Artenzusammensetzung und Abundanz	138
Abbildung 27:	Korrelation zwischen der relativen Abundanz der Regenwurmarten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	139

Abbildung 28:	Korrelation zwischen der relativen Biomasse der Regenwurmarten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	139
Abbildung 29:	Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von <i>Allolobophora chlorotica</i> und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)	141
Abbildung 30:	Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von <i>Aporrectodea caliginosa</i> und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)	141
Abbildung 31:	Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von <i>Aporrectodea rosea</i> und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	142
Abbildung 32:	Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von <i>Aporrectodea longa</i> und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	142
Abbildung 33:	Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von <i>Lumbricus terrestris</i> und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	143
Abbildung 34:	Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse epigäischer Arten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	143
Abbildung 35:	Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse endogäischer Arten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	144
Abbildung 36:	Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse anektischer Arten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	144
Abbildung 37:	Box-Whisker-Plot (vgl. 5.1.1.2.2), der die Verteilung des Artenreichtums der Enchytraeiden pro Bestimmungsmethode über alle Standorte zeigt. Links: comDNA, Mitte: eDNA, rechts: Morphologie	146
Abbildung 38:	Artenreichtum der Enchytraeiden pro Bestimmungsmethode und Standort. Nutzungstypen sind farblich, Bestimmungsmethoden mit Symbolen unterschieden (Standortkürzel siehe Tabelle 4).....	147
Abbildung 39:	Box-Whisker-Plot, der die Verteilung der Diversität (Shannon-Index) der Enchytraeiden pro Bestimmungsmethode über alle Standorte zeigt	148

Abbildung 40:	Hauptkoordinatenanalyse auf Grundlage der Ähnlichkeit (Jaccard-Koeffizient) zwischen Standorten und Bestimmungsmethoden bezüglich der Enchytraeiden-Artenzusammensetzung (Präsenz/Absenz).....	148
Abbildung 41:	Venn-Diagramm zur Veranschaulichung der Übereinstimmungen und Unterschiede der drei Methoden hinsichtlich von Enchytraeiden-Artenfunden am Standort Großenhül (GHU).....	149
Abbildung 42:	Venn-Diagramm zur Veranschaulichung der Übereinstimmungen und Unterschiede der drei Methoden hinsichtlich von Enchytraeiden-Artenfunden am Standort Zingst (ZIN).....	151
Abbildung 43:	<i>Enchytronia pratensis</i> Chalupský, 1994. Links, Habitus; Mitte, mikroskopische Details der Spermathekenregion; Rechts, Zeichnung der Spermatheke aus der Originalbeschreibung ..	153
Abbildung 44:	Hauptkoordinatenanalyse auf Grundlage der Unähnlichkeit (Bray-Curtis-Koeffizient) zwischen Standorten und Bestimmungsmethoden bezüglich der Enchytraeiden-Artenzusammensetzung plus Artenabundanz	154
Abbildung 45:	Korrelation zwischen der relativen Biomasse der Enchytraeiden-Arten und der relativen Anzahl der comDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)	155
Abbildung 46:	Relative Artenabundanz der Enchytraeiden am Standort Wächterbuche (WBU).....	156
Abbildung 47:	Relative Biomasse der Enchytraeiden am Standort Wächterbuche (WBU).....	157
Abbildung 48:	Relative comDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden am Standort Wächterbuche (WBU).....	157
Abbildung 49:	Relative eDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden am Standort Wächterbuche (WBU).....	158
Abbildung 50:	Positivkontrolle („mock community“) aus sieben Collembolenarten aus permanenten Laborkulturen des „Department of Ecoscience“ der Universität Aarhus.....	159
Abbildung 51:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der erfassten Collembola-Arten von allen 22 Standorten nach morphologischer Bestimmung (Morph), comDNA- und eDNA-Metabarcoding zeigt	161
Abbildung 52:	Venn-Diagramm der Collembolenarten von allen 22 Standorten, das die morphologische Bestimmung mit den beiden DNA-basierten Methoden comDNA- und eDNA-Metabarcoding vergleicht	162

Abbildung 53:	Vergleichende Leistung in Bezug auf die Anzahl an Collemboles-Taxa durch Morphospezies-Bestimmung, eDNA- und comDNA-Metabarcoding (Standortkürzel siehe Tabelle 4)	162
Abbildung 54:	NMDS-Biplot der Abstandsmatrix des Jaccard-Ähnlichkeitskoeffizienten der mit den drei Methoden ermittelten Daten über die Anwesenheit/Abwesenheit von Arten. Gestrichelte Linien zeigen Habitat-Cluster innerhalb der Methoden-Cluster an	163
Abbildung 55:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden	249
Abbildung 56:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden	251
Abbildung 57:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden	252
Abbildung 58:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden	253
Abbildung 59:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden	254
Abbildung 60:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden	255

Abbildung 61:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden256
Abbildung 62:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.) und durch COI comDNA-Metabarcoding in der GHU-Probenahmestelle identifiziert wurden257
Abbildung 63:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden258
Abbildung 64:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden259
Abbildung 65:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.) und durch COI comDNA-Metabarcoding in der KUM-Probenahmestelle identifiziert wurden260
Abbildung 66:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden261
Abbildung 67:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden263
Abbildung 68:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden264
Abbildung 69:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.) und durch COI comDNA-Metabarcoding in der POS-Probenahmestelle identifiziert wurden265

Abbildung 70:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	266
Abbildung 71:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden	267
Abbildung 72:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden	268
Abbildung 73:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden	269
Abbildung 74:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden	270
Abbildung 75:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	271
Abbildung 76:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden	272
Abbildung 77:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden	273

Abbildung 78:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden274
Abbildung 79:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden275
Abbildung 80:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden277
Abbildung 81:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden279
Abbildung 82:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden281
Abbildung 83:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden283
Abbildung 84:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden285
Abbildung 85:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden286

Abbildung 86:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der GHU-Probenahmestelle identifiziert wurden288
Abbildung 87:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden290
Abbildung 88:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden292
Abbildung 89:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der KUM-Probenahmestelle identifiziert wurden294
Abbildung 90:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden296
Abbildung 91:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden298
Abbildung 92:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden300
Abbildung 93:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden302

Abbildung 94:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der POS-Probenahmestelle identifiziert wurden304
Abbildung 95:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden306
Abbildung 96:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden308
Abbildung 97:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden310
Abbildung 98:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden312
Abbildung 99:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden314
Abbildung 100:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden316
Abbildung 101:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden318

Abbildung 102:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden	319
Abbildung 103:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden	321
Abbildung 104:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden	323
Abbildung 105:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden	325
Abbildung 106:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden	328
Abbildung 107:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden	331
Abbildung 108:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden	333
Abbildung 109:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden	336

Abbildung 110:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden	339
Abbildung 111:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden	341
Abbildung 112:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden	344
Abbildung 113:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden	346
Abbildung 114:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden	348
Abbildung 115:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden	351
Abbildung 116:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden	353
Abbildung 117:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	355

Abbildung 118:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden	357
Abbildung 119:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden	359
Abbildung 120:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden	362
Abbildung 121:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden	364
Abbildung 122:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	366
Abbildung 123:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden	369
Abbildung 124:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden	371
Abbildung 125:	UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden	373

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Bodenbiologische Datenerhebungen auf BDF in den Bundesländern Deutschlands.....	59
Tabelle 2:	Übersicht über die im bodenbiologischen Monitoring in den Bundesländern verwendeten Methoden basierend auf einer Umfrage des Landesamtes für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein im Jahr 2021	60
Tabelle 3:	Die wichtigsten anthropogenen Bedrohungen für die Bodenbiodiversität (FAO 2020)	70
Tabelle 4:	Liste der 25 ausgewählten Standorte unter Angabe von Kürzel, Status (BDF = Boden-Dauerbeobachtungsfläche; EB = „Edaphobase“-Projekt), Bezeichnungen, Bundesland (BL), Landnutzung (LN: A = Acker, G = Grünland, W = Wald), Standort, Datum der Beprobung, Koordinaten, Boden-pH (CaCl ₂), C/N-Verhältnis, organischer Kohlenstoff [%], Gesamtstickstoff [%] und Bodenart (BA).....	86
Tabelle 5:	Proben, die in den vergleichenden COI/16S-DNA-Metabarcoding-Analysen verwendet wurden, die am AU eDNA-Zentrum durchgeführt wurden (Standortkürzel siehe Tabelle 4)	101
Tabelle 6:	Enchytraeidentaxa, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding am Standort Kümmelwiese (KUM) identifiziert wurden	103
Tabelle 7:	Lumbricidentaxa, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding am Standort Kümmelwiese (KUM) identifiziert wurden	106
Tabelle 8:	Liste der Regenwurmartens, die an der Probenahmestelle GHU mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 20 cm) unter Verwendung des COI-Markers.....	110
Tabelle 9:	Liste der Regenwurmartens, die an der Probenahmestelle KUM mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 20 cm) unter Verwendung des COI-Markers und DNA-Metabarcoding einer Untergruppe von eDNA aus 0 – 5 cm Bodentiefe unter Verwendung des 16S-Markers.....	110

Tabelle 10:	Liste der Regenwurmarten, die an der Probenahmestelle POS mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-(0 – 20 cm) unter Verwendung des COI-Markers und DNA-Metabarcoding einer Untergruppe von eDNA aus 0 – 10 cm Bodentiefe unter Verwendung des 16S-Markers111
Tabelle 11:	Liste der Enchytraeidenarten, die an der Probenahmestelle GHU mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 10 cm) unter Verwendung des COI-Markers.....112
Tabelle 12:	Liste der Enchytraeidenarten, die an der Probenahmestelle KUM mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 10 cm) unter Verwendung des COI-Markers und DNA-Metabarcoding einer Untergruppe von eDNA aus 0 – 5 cm Bodentiefe unter Verwendung des 16S-Markers.....113
Tabelle 13:	Liste der Enchytraeidenarten, die an der Probenahmestelle POS mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 10 cm) unter Verwendung des COI-Markers und DNA-Metabarcoding einer Untergruppe von eDNA aus 0 – 10 cm Bodentiefe unter Verwendung des 16S-Markers.....114
Tabelle 14:	Anzahl der Proben bei Zusammenführung von comDNA-Proben bei gleichzeitiger Maximierung der Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Arten mit geringer Biomasse oder seltenen Arten119
Tabelle 15:	Nukleotid-Identitätsmatrix zwischen COI ASV-Sequenzen am Standort Almesbach Stallkoppel (ALM), die <i>Aporrectodea caliginosa</i> und <i>A. trapezoides</i> zugeordnet sind.....126
Tabelle 16:	Nukleotid-Identitätsmatrix zwischen COI ASV-Sequenzen am Standort Zeckerin (ZEC), die <i>Aporrectodea caliginosa</i> und <i>A. trapezoides</i> zugeordnet sind126
Tabelle 17:	Methodenvergleich zum Artennachweis am Standort Großenhül (GHU), Bayern.....150
Tabelle 18:	Methodenvergleich zum Artennachweis am Standort Zingst (ZIM) in Mecklenburg-Vorpommern151
Tabelle 19:	In Prozentwerte umgerechnete Daten zu Abundanz, Biomasse, comDNA-Reads, eDNA-Reads der am Standort Großenhül (GHU) gefundenen Arten.....155

Tabelle 20:	Eine comDNA-Positivprobe durchlief alle Schritte der Metabarcoding-Pipeline von der DNA-Extraktion bis zur Bibliotheksvorbereitung und Sequenzierung in zwei Verdünnungen, dem 10- und 100-fachen des DNA-Extrakts der ursprünglichen, unverdünnten Proben-DNA, hergestellt mit dem „NucleoSpin® Soil“ Kit160
Tabelle 21:	Stetigkeit, mittlere Gesamtabundanz und mittlere Artenzahl der Lumbriciden, getrennt nach den vier Landnutzungen bzw. Hauptbiotoptypen gemäß Jänsch et al. 2013 (Basis: nur bis zur Art bestimmte Tiere). n = Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Standorte, SD = Standardabweichung. Fett gedruckt: Arten mit einer Stetigkeit $\geq 50\%$166
Tabelle 22:	Stetigkeit, mittlere Gesamtabundanz und mittlere Artenzahl der Enchytraeiden, getrennt nach den vier Landnutzungen bzw. Hauptbiotoptypen gemäß Römbke et al. 2013 (Basis: nur bis zur Art bestimmte Tiere). n = Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Standorte, SD = Standardabweichung. Fett gedruckt: Arten mit einer Stetigkeit $\geq 50\%$167
Tabelle 23:	Beurteilungskriterium für den Vergleich der nachgewiesenen Oligochätenfauna mit den Erwartungswerten (vgl. z. B. Schaefer & Tischler 1983).....168
Tabelle 24:	Klassifizierungsschema beobachteter Übereinstimmungen mit oder Abweichungen von den Erwartungswerten, getrennt nach den Endpunkten Präsenz/Absenz sowie Siedlungsdichte bzw. Artenzahl. SD = Standardabweichung169
Tabelle 25:	Vergleich der Regenwurmgemeinschaft an den beprobten Ackerstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Jänsch et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4170
Tabelle 26:	Vergleich der Regenwurmgemeinschaft an den beprobten Grünlandstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Jänsch et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4.....171
Tabelle 27:	Vergleich der Regenwurmgemeinschaft an den beprobten Waldstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Jänsch et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4172
Tabelle 28:	Vergleich der Enchytraeidengemeinschaft an den beprobten Ackerstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Römbke et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4174

Tabelle 29:	Vergleich der Enchytraeidengemeinschaft an den beprobten Grünlandstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Römbke et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4.....	175
Tabelle 30:	Vergleich der Enchytraeidengemeinschaft an den beprobten Waldstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Römbke et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4	176
Tabelle 31:	Abschätzung der Kosten pro Bestimmungsmethode in Abhängigkeit von der Standortzahl sowie der Gesamtkosten pro Standort	178
Tabelle 32:	Tagesordnung des Fachgesprächs am 12. Oktober 2022 als Videokonferenz; Moderation: Dr. Frank Glante (Umweltbundesamt), Dr. Jörg Römbke (ECT Oekotoxikologie GmbH).....	183
Tabelle 33:	Abundanz der Regenwürmer [Ind./m ²] an den beprobten Ackerstandorten	202
Tabelle 34:	Biomasse der Regenwürmer [g/m ²] an den beprobten Ackerstandorten	203
Tabelle 35:	Abundanz der Regenwürmer [Ind./m ²] an den beprobten Grünlandstandorten	204
Tabelle 36:	Biomasse der Regenwürmer [g/m ²] an den beprobten Grünlandstandorten	205
Tabelle 37:	Abundanz der Regenwürmer [Ind./m ²] an den beprobten Waldstandorten.....	206
Tabelle 38:	Biomasse der Regenwürmer [g/m ²] an den beprobten Waldstandorten.....	207
Tabelle 39:	Abundanz der Enchytraeiden [Ind./m ²] an den beprobten Ackerstandorten	208
Tabelle 40:	Abundanz der Enchytraeiden [Ind./m ²] an den beprobten Grünlandstandorten	210
Tabelle 41:	Abundanz der Enchytraeiden [Ind./m ²] an den beprobten Waldstandorten.....	212
Tabelle 42:	Abundanz der Collembolen [Ind./m ²] an den beprobten Ackerstandorten	214
Tabelle 43:	Abundanz der Collembolen [Ind./m ²] an den beprobten Grünlandstandorten	216
Tabelle 44:	Abundanz der Collembolen [Ind./m ²] an den beprobten Waldstandorten.....	218
Tabelle 45:	Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Ackerstandorten	220
Tabelle 46:	Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Grünlandstandorten	221

Tabelle 47:	Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Waldstandorten.....	222
Tabelle 48:	Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Ackerstandorten.....	223
Tabelle 49:	Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Grünlandstandorten.....	225
Tabelle 50:	Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Waldstandorten	228
Tabelle 51:	Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolenarten an den beprobten Ackerstandorten.....	230
Tabelle 52:	Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolenarten an den beprobten Grünlandstandorten ...	231
Tabelle 53:	Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolenarten an den beprobten Waldstandorten.....	232
Tabelle 54:	Anzahl der 16S eDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Ackerstandorten.....	233
Tabelle 55:	Anzahl der 16S eDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Grünlandstandorten	234
Tabelle 56:	Anzahl der 16S eDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Waldstandorten.....	234
Tabelle 57:	Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Ackerstandorten.....	235
Tabelle 58:	Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Grünlandstandorten	237
Tabelle 59:	Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Waldstandorten.....	240
Tabelle 60:	Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolen an den beprobten Ackerstandorten.....	242
Tabelle 61:	Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolen an den beprobten Grünlandstandorten	244
Tabelle 62:	Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolen an den beprobten Waldstandorten.....	246
Tabelle 63:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden	250
Tabelle 64:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden	251

Tabelle 65:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden	252
Tabelle 66:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden	253
Tabelle 67:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden	254
Tabelle 68:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden	255
Tabelle 69:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden	256
Tabelle 70:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung und durch comDNA-Metabarcoding in der GHU-Probenahmestelle identifiziert wurden	257
Tabelle 71:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden	258
Tabelle 72:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden	259
Tabelle 73:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung und durch comDNA-Metabarcoding in der KUM-Probenahmestelle identifiziert wurden	260
Tabelle 74:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden	261

Tabelle 75:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden	262
Tabelle 76:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden	263
Tabelle 77:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden	264
Tabelle 78:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung und durch comDNA-Metabarcoding in der POS-Probenahmestelle identifiziert wurden	265
Tabelle 79:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	266
Tabelle 80:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden	267
Tabelle 81:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden	268
Tabelle 82:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden	269
Tabelle 83:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden	270
Tabelle 84:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	271

Tabelle 85:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden	272
Tabelle 86:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden	273
Tabelle 87:	Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden	274
Tabelle 88:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden	276
Tabelle 89:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden	278
Tabelle 90:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden	279
Tabelle 91:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden	282
Tabelle 92:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden	283
Tabelle 93:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden	285
Tabelle 94:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden	287

Tabelle 95:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der GHU-Probenahmestelle identifiziert wurden	289
Tabelle 96:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden	291
Tabelle 97:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden	293
Tabelle 98:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KUM-Probenahmestelle identifiziert wurden	294
Tabelle 99:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden	297
Tabelle 100:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden	299
Tabelle 101:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden	301
Tabelle 102:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden	303
Tabelle 103:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der POS-Probenahmestelle identifiziert wurden	305
Tabelle 104:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	307

Tabelle 105:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden	309
Tabelle 106:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden	311
Tabelle 107:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden	313
Tabelle 108:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden	315
Tabelle 109:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	317
Tabelle 110:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden	318
Tabelle 111:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden	320
Tabelle 112:	Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden	322
Tabelle 113:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden	324
Tabelle 114:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden	326

Tabelle 115:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden	329
Tabelle 116:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden	332
Tabelle 117:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden	334
Tabelle 118:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden	337
Tabelle 119:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden	340
Tabelle 120:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden	342
Tabelle 121:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden	345
Tabelle 122:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden	347
Tabelle 123:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden	349
Tabelle 124:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden	352

Tabelle 125:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden	353
Tabelle 126:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	355
Tabelle 127:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SWG-Probenahmestelle identifiziert wurden	357
Tabelle 128:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SWW-Probenahmestelle identifiziert wurden	360
Tabelle 129:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden	362
Tabelle 130:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden	365
Tabelle 131:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden	367
Tabelle 132:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden	370
Tabelle 133:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden	371
Tabelle 134:	Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden	374

Abkürzungsverzeichnis

16S	16S mitochondriale rDNA
AG	AllGenetics & Biology SL, A Coruña (Spanien)
AITC	Allylisothiocyanat
AP	Arbeitspaket
AU	Universität Aarhus (Dänemark)
ASV	Amplicon Sequence Variant
BBodSchG	Bundes-Bodenschutzgesetz
BBodSchV	Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung
BDF	Boden-Dauerbeobachtungsfläche
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
BOLD	Barcode of Life Data System
BonaRes	Boden als nachhaltige Ressource für die Bioökonomie
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CEN	Europäisches Komitee für Normung
COI	Cytochrom-c-Oxidase I
comDNA	Gemeinschafts-DNA
COST	European Cooperation in Science and Technology
DFV	Landwirtschaftliche Dauerfeldversuche
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECT	ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim
eDNA	Umwelt-DNA
EN	Europäische Norm
ESDAC	European Soil Data Centre
EU	Europäische Union
EUSO	EU Soil Observatory
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
HTS	Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologie
IDS	Identification Engine System
ISO	Internationale Organisation für Normung, Genf (Schweiz)
JRC	Joint Research Centre, Ispra (Italien)
LUCAS	Land Use and Coverage Area frame Survey
MSCT	Minimum Sequence Copy Threshold
NC	Negativkontrolle
NMDS	Nicht-metrische multidimensionale Skalierung
OTU	Operational Taxonomic Unit

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SETAC	Society of Environmental Toxicology and Chemistry
Soil BON	Soil Biodiversity Observation Network
UBA	Umweltbundesamt, Dessau
UPB	Umweltprobenbank des Bundes
UV	Ultraviolettstrahlung
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e. V.

Zusammenfassung

Einleitung

Die Erfassung und Beurteilung der Diversität der Bodenorganismen hat in den letzten Jahren in der Europäischen Union (EU) und Deutschland große Fortschritte gemacht. Dabei wurde vor allem der große Einfluss der Bodenorganismen für die Bereitstellung der ökologischen Funktionen des Bodens herausgearbeitet. Hervorzuheben ist, dass für diese Funktionen nicht nur ‚Schlüsselarten‘, sondern auch die Interaktionen vieler Invertebraten-Arten verantwortlich sind. In Deutschland fehlt jedoch eine flächendeckende und standardisierte Erfassung der Bodenorganismen, obwohl mit den ca. 800 Boden-Dauerbeobachtungsflächen (BDF) eine umfassende Infrastruktur dafür zur Verfügung steht. Allerdings führen bisher nicht alle Bundesländer eigene bodenbiologische Untersuchungen auf ihren BDF durch. Wichtigster Grund dafür dürfte die aufwändige und mangels ausgebildeter Taxonomen teure Bestimmung der Bodeninvertebraten sein. Zur Lösung dieses Problems sollte das in diesem Bericht beschriebene Vorhaben beitragen, indem an ausgewählten Standorten wichtige Bodenorganismengruppen erfasst und diese Tiere dann sowohl mittels ‚klassischer‘ morphologischer als auch ‚moderner‘ genetischer Methoden bestimmt wurden. Das Ziel dieses Vorhabens war es also, Empfehlungen für ein effizientes und routinemäßig umsetzbares Monitoring von ausgewählten Bodenorganismengruppen im Rahmen des deutschen BDF-Programms zu entwickeln.

Erkenntnisstand

Im Gegensatz zu anderen Umweltkompartimenten wurde die in Böden vorkommende Diversität von Organismen und die von ihnen erbrachten Funktionen lange vernachlässigt. Speziell in den letzten 20 Jahren wurde die Forschung zur Rolle der Bodenbiodiversität bei der Erbringung ökosystemarer Leistungen erheblich verstärkt. Dabei wurde auch die hohe funktionale Wertigkeit dieser häufig sehr komplexen Gemeinschaften herausgearbeitet. Parallel zu dieser wissenschaftlichen Intensivierung gab es auf politischer Ebene seit einigen Jahren Aktivitäten z. B. mit dem Ziel, im Rahmen der „EU-Bodenstrategie für 2030“ eine eigene Boden-Richtlinie zu erstellen, in der verschiedenste Aspekte des Bodenschutzes adressiert werden. Diese Bodenstrategie hat das Ziel, dass sich bis 2050 alle Bodenökosysteme in der EU in einem gesunden Zustand befinden und somit widerstandsfähiger sind und dauerhaft möglichst viele Ökosystemdienstleistungen erbringen können.

Seit geraumer Zeit gibt es klare Belege dafür, dass menschliche Aktivitäten die Diversität und Abundanz von Bodenorganismen und damit zugleich deren Beiträge zu den oben genannten ökosystemaren Leistungen verringern. Allerdings ist der Schutz des Bodenlebens bisher nur in wenigen Staaten gesetzlich geregelt. Eine wichtige Voraussetzung für einen solchen Schutz ist eine ausreichende Kenntnis zum Vorkommen von Bodenorganismen an einem bestimmten Standort bzw. im jeweiligen Boden. Wichtige Gründe für die bisher vernachlässigte Erfassung der Bodenbiodiversität dürften einerseits die enorme Anzahl an Organismen als auch an Arten im Boden sein. Allerdings ist die Erfassung dieser hohen Biodiversität mit ‚klassischen‘ morphologischen Methoden schwierig, teils wegen des großen Zeitbedarfs (und damit hoher Kosten) bei der Bestimmung vieler Individuen, teils wegen des in den letzten 20 Jahren immer mehr zunehmenden Mangels an gut ausgebildeten Taxonomen. Dieses Problem könnte durch die Anwendung ‚moderner‘ genetischer Methoden zumindest verringert werden. Hierfür ist es dringend notwendig, die bisher primär eingesetzten genetischen Verfahren, insbesondere das Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Barcoding, weiterzuentwickeln. DNA-Barcoding verwendet Fragmente eines ‚Standard-Gens‘ zur molekularen Identifizierung von Arten; bei Invertebraten ist dies zumeist Die Cytochrom-c-Oxidase I (COI). Für die Weiterentwicklung gibt es zwei Möglichkeiten: einmal die Verwendung weiterer Gene (vor allem aus dem Zellkern), andererseits die Entwicklung eines

Metabarcoding: Damit ist einerseits die gleichzeitige Untersuchung der DNA von mehreren Individuen verschiedener Arten (z. B. aus einer Familie) gemeint („Gemeinschafts-DNA“; comDNA), andererseits die Untersuchung von aus ganzen Bodenproben extrahierter DNA verschiedenster Arten der Bodenfauna sowie von Mikroorganismen (sogenannter „Umwelt-DNA“; eDNA).

Die Informationen zur Bodenbiodiversität können für die Ableitung von Referenzwerten (d. h. welche Bodenorganismengemeinschaft sollte an einem bestimmten Standort mit seinem jeweils typischen Boden vorkommen) und damit zur Beurteilung der biologischen Qualität von Böden genutzt werden. Damit wird es auch möglich, die im Bundes-Bodenschutzgesetz beschriebene Funktion des Bodens als Lebensraum für Bodenorganismen zu beurteilen, denn bisher fehlen genauere Angaben zur Umsetzung dieses Auftrags in den nachgeschalteten Regelwerken wie der Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung. Dies ist allerdings nur zu erreichen, wenn man die jeweiligen Organismen kennt bzw. über Methoden verfügt, mit denen sie erfasst und bestimmt werden können.

Arbeitspaket 1: Literatursauswertung zum Stand der Forschung

Eine umfangreiche Übersicht über die bestehenden Boden-Monitoringprogramme auf nationaler sowie teilweise internationaler Ebene ist in den UBA-Texte Bänden Nr. 52/2020 „Bodendaten in Deutschland – Übersicht über die wichtigsten Mess- und Erhebungsaktivitäten für Böden“ und 136/2021 „Integriertes Monitoring in der Agrarlandschaft – Erfassung der ökologischen Auswirkungen des chemischen Pflanzenschutzes“ enthalten. Monitoring-Aktivitäten auf nationaler Ebene, in denen auch bodenzoologische Parameter erhoben werden sind insbesondere die Boden-Dauerbeobachtung, die Landwirtschaftlichen Dauerfeldversuche (DFV) und die Umweltprobenbank des Bundes (UPB). Zudem fördert das Umweltbundesamt aktuell das Projekt „TrenDNA – Untersuchungen zur biologischen Vielfalt mit der Umweltprobenbank des Bundes“, in dem unter anderem die in der UPB gesammelten Bodenproben anhand von Metagenomik untersucht werden sollen. Auf internationaler Ebene sind derzeit mehrere Aktivitäten im Gange, um Netzwerke für das Monitoring unter anderem der Bodenbiologie zu etablieren. Hierbei sind insbesondere die im Aufbau befindlichen Initiativen „Soil Biodiversity Observation Network“ (Soil BON) und das „EU Soil Observatory“ (EUSO) zu nennen.

Bodenfunktionen beziehen sich auf natürliche biologische Prozesse, während Ökosystemdienstleistungen solche Funktionen beschreiben, die zum menschlichen Wohlergehen beitragen. Neben dem Einfluss externer abiotischer Faktoren wird das Vermögen des Bodens, seine Funktionen zu erfüllen und Leben aufrecht zu erhalten von Bodenorganismen gewährleistet, die in komplexen Nahrungsnetzen interagieren. Bodenorganismen können in funktionale Gruppen eingeordnet werden, um ihre Rolle innerhalb des Nahrungsnetzes bezüglich ökosystemarer Funktionen besser zu verstehen. Ein Beispiel für eine funktionale Gruppierung von Bodenorganismen ist die Einteilung von Regenwürmern in die drei ökologischen Gruppen epigäischer (Streubewohner), endogäischer (Flachgräber/Bodenfresser) und anektischer (Tiefgräber) Lebensformtyp. Die Anwesenheit von Regenwürmern wirkt sich durch die Kombination der von ihnen beeinflussten bodenbezogenen Prozesse im Allgemeinen positiv auf die Ökosystemdienstleistungen aus. Regenwürmer haben möglicherweise einen dominanten Einfluss auf diese Bodenprozesse und Ökosystemdienstleistungen, aber sie wirken nicht allein. Daher bedarf es eines besseren Verständnisses der gemeinsamen und einzigartigen Beiträge der verschiedenen Gruppen von Bodenorganismen zur Bereitstellung von Ökosystemdienstleistungen.

Die Bodenbiodiversität ist durch den Einfluss verschiedener anthropogener abiotischer und biotischer Faktoren sowie Landnutzung einer hohen Gefährdung ausgesetzt. Eine umfassende Übersicht über die wesentlichen Bedrohungen, ihre Treiber und Auswirkungen auf die Böden sowie ihr Einfluss auf die Bodenbiodiversität gibt der Bericht „State of knowledge of soil

biodiversity – Status, challenges and potentialities, Report 2020“ der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO). Die größten Bedrohungen für die Bodenbiodiversität werden durch vom Menschen verursachte Veränderungen hervorgerufen, und die negativen Auswirkungen können durch die synergetischen und additiven Effekte, die zwischen solchen Bedrohungen auftreten können, verstärkt werden.

Arbeitspaket 2: Auswahl von Standorten im BDF-Programm – Probenahme

Kernstück der praktischen Arbeit in diesem Projekt war die Beprobung von 25 Standorten in Deutschland, überwiegend BDF und zu etwa gleichen Anteilen Acker-, Grünland- und Waldstandorte, mittels standardisierter Methoden zur Erfassung der Bodenorganismen, gefolgt von der morphologischen Bestimmung des gefangenen Tiermaterials sowie der genetischen Bestimmung mittels comDNA- und eDNA-Metabarcoding. Kriterien für die Auswahl der zu untersuchenden Organismengruppen waren ihre taxonomische Diversität, ihre ökologische Rolle, das Vorkommen von Schlüsselarten, ihre Empfindlichkeit gegenüber anthropogenen Stressoren, der Stand der Bearbeitung sowie die Praktikabilität ihrer Erfassung und Bestimmbarkeit. Neben den vorab feststehenden Regenwürmern wurden die Collembolen und Enchytraeiden für die Untersuchungen ausgewählt, auch da diese bereits im Rahmen des deutschen BDF-Programms in einigen Bundesländern untersucht wurden.

Die technische Durchführung der Probenahme erfolgte mittels ISO-Standardmethoden. Es wurde zunächst eine Pilotstudie auf drei Probenahmeflächen mit jeweils unterschiedlicher Nutzung (Wald, Grünland, Acker) durchgeführt. Ausgehend von den dabei gemachten Erfahrungen wurde ein Standarddesign definiert, das an den übrigen 22 Probenahmeflächen angewandt wurde. Für das comDNA-Metabarcoding wurden Gewebe-Mischproben der zuvor aus dem Boden extrahierten und morphologisch identifizierten Individuen oder Teilen davon hergestellt und COI amplifiziert, unter Verwendung desselben Primers für alle drei Organismengruppen. Die eDNA wurde aus einer Mischprobe von 20 Bodenkernen pro Standort extrahiert. Für das eDNA-Metabarcoding der Regenwürmer wurde 16S mitochondriale, ribosomale DNA verwendet, da dieser Marker besser für die potenziell degradierte extrazelluläre DNA geeignet ist. Für die eDNA-Proben von Enchytraeiden und Collembolen wurde COI verwendet, da die Proben nicht nur extrazelluläre DNA, sondern auch ganze Individuen und damit eine höhere Konzentration des COI-Markers enthalten und da die 16S-Referenzdatenbanken noch nicht umfassend genug sind.

Arbeitspaket 3: Methodenvergleiche – Auswertung

Ausgehend von den in diesem Vorhaben erhobenen Daten wurden die Ergebnisse der morphologischen und der genetischen Artbestimmung vergleichend diskutiert. In einem zweiten Schritt wurden die Ergebnisse der morphologischen Bestimmung pro Standort unter Berücksichtigung der genetischen Bestimmungsergebnisse mit den für Regenwürmer bzw. Enchytraeiden publizierten Erwartungswerten für die Landnutzungsformen Acker, Grünland und Wald verglichen. Darüber hinaus wurde der jeweilige Kostenaufwand abgeschätzt, der in Abhängigkeit von der Gesamtstandortzahl pro Bestimmungsmethode notwendig wäre.

Durch comDNA-Metabarcoding wurden häufig mehr Regenwurmartentypen nachgewiesen als durch eDNA-Metabarcoding und durch morphologische Bestimmung. comDNA-Metabarcoding ist in der Lage, Individuen einer Art zuzuordnen, die morphologisch schwer zu bestimmen sind, z. B. Jungtiere, kryptische Arten und Fragmente. Im Durchschnitt wurden mittels eDNA-Metabarcoding ähnlich viele Regenwurmartentypen nachgewiesen wie bei der morphologischen Identifizierung. Einige Arten scheinen eine höhere oder geringere Wahrscheinlichkeit zu haben, durch eDNA-Metabarcoding entdeckt zu werden als andere. Kleine epigäische Arten wurden in einigen Fällen anhand klassischer Probenahme und morphologischer Bestimmung nicht nachgewiesen.

Alle drei Bestimmungsmethoden können zwischen Standorten mit unterschiedlicher Artenzusammensetzung differenzieren, der Grad der Trennung kann je nach Bestimmungsmethode unterschiedlich sein. Der relative Anteil der eDNA-Sequenzierungs-Reads zeigt Potenzial als Surrogat der relativen Abundanz oder Biomasse für endogäische Arten.

Die Artenzahl und Artenzusammensetzung eines Standortes bezüglich der Enchytraeiden werden mit jeder der drei Methoden angemessen beschrieben. Eine Kombination der Methoden führt zu besseren Resultaten. DNA-Metabarcoding-Methoden eignen sich nicht zur Vorhersage von Abundanz oder Biomasse einzelner Arten, aber es gibt Hinweise, dass sie den quantitativen Anteil ökologischer / funktioneller Gruppen angemessen beschreiben. Jede Methode hat ihre spezifischen Fehlerquellen. Ein Großteil ist mit Rekurs auf andere Methoden behebbar. Für die DNA-Metabarcoding-Methoden kann die Bedeutung einer kompletten und gut kuratierten Referenz-Datenbank nicht stark genug betont werden; mit ihr steht und fällt die Aussagekraft dieser Methode. Ebenso bleibt klassische Taxonomie unabdingbar: viele neue Enchytraeidenarten harren noch der Beschreibung, mittels Morphologie und DNA-Sequenzen.

Für die Collembolen war das comDNA-Metabarcoding in der Lage, Individuen aus Proben von Referenzarten von Laborkulturen nachzuweisen, aber die relative Anzahl der Metabarcoding-Reads stimmte erwartungsgemäß nicht mit der relativen Häufigkeit der Art überein. Im Durchschnitt entdeckte der eDNA-Ansatz eine höhere Anzahl von Arten als morphologische Identifizierungen und comDNA. Morphologische Bestimmungen und comDNA erkannten eine ähnliche Anzahl von Arten, aber unter Berücksichtigung der Referenzdatenbank wurden verschiedene Arten erkannt. Aufgrund der unvollständigen Collembolen-Referenzdatenbank können eDNA und comDNA zur Bestimmung des Artenreichtums verwendet werden, jedoch nicht zur Schätzung der Diversität, da die Anzahl der Reads möglicherweise nicht die Artverhältnisse widerspiegelt. Bevor die DNA-Ansätze als Alternative zu morphologischen Identifizierungen in Betracht gezogen werden, müssen die verfügbaren Referenzdatenbanken verbessert werden.

Anhand der Projektergebnisse wurde festgestellt, dass es häufig Unterschiede im mit den einzelnen Bestimmungsmethoden festgestellten Artenspektrum pro Standort gibt. Einige der Diskrepanzen, die in den mit den drei Methoden erstellten Taxonverzeichnissen festgestellt wurden, scheinen mit dem erreichten taxonomischen Auflösungsgrad zusammenzuhängen. comDNA-Metabarcoding kann die Artidentität von morphologisch nicht identifizierbaren Individuen, insbesondere von Jungtieren und Fragmenten, aufdecken. Morphologische Fehlbestimmungen können bei taxonomisch schwierigen oder schwer zu beobachtenden Taxa auftreten, z. B. bei schlecht erhaltenen Exemplaren, insbesondere wenn nur wenige Individuen zur Verfügung stehen. Weitere mögliche Gründe für Unterschiede zwischen den Bestimmungsmethoden sind: Kleine Individuen wie Jungtiere oder einige epigäische Arten können bei der Handauslese von Regenwürmern übersehen werden. Bei den Collembolen wurden zwei unterschiedliche Probensätze für die morphologische Bestimmung und das comDNA-Metabarcoding verwendet. Die Menge und Verteilung der eDNA, die von den verschiedenen Arten im Boden hinterlassen wird, variiert je nach Häufigkeit, Verhalten und Größe der Tiere. eDNA kann noch im Boden vorhanden sein, obwohl es keine lebenden Exemplare mehr gibt, z. B. aufgrund von Trockenheit oder dem Verlassen von Röhren durch anektische Regenwürmer. Diskrepanzen können auch durch das Vorhandensein von fehlerhaften oder falsch gekennzeichneten COI- oder 16S-Sequenzen in den Referenzdatenbanken entstehen. Arten mit einer geringen Anzahl von Sequenzierungs-Reads wurden möglicherweise fälschlich in der Metabarcoding-Bioinformatik-Pipeline ausgeschlossen.

An den im Rahmen des Projektes beprobten Acker- und Grünlandstandorten wurden weitestgehend die zu erwartenden Regenwurmgemeinschaften vorgefunden. An den Waldstandorten wurden dagegen vielfach Abweichungen von dem zu erwartenden Artenspektrum beobachtet.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist die starke Trockenheit an der überwiegenden Anzahl der Standorte im Untersuchungszeitraum, von der insbesondere epigäische Arten betroffen gewesen sein könnten. Die an den beprobten Acker- und Waldstandorten nachgewiesene Enchytraeidengemeinschaft entsprach überwiegend den bekannten Erwartungswerten. An den beprobten Grünlandstandorten wurde dagegen an einigen Standorten eine erhöhte Anzahl an Abweichungen von den Erwartungswerten der Enchytraeidengemeinschaft beobachtet.

Arbeitspaket 4: Bewertung der Methoden für den Routinebetrieb

Wie die im Rahmen dieses Vorhabens erhobenen Daten belegen, ist es möglich, mit genetischen Bestimmungsmethoden die Ziele der Boden-Dauerbeobachtung zu erreichen. Der aktuelle Bodenzustand, so wie ihn die jeweilige Gemeinschaft der Bodenfauna anzeigt, lässt sich mit diesen Methoden beschreiben. Dies gilt insbesondere für qualitative Parameter wie das Vorkommen bzw. Fehlen von Arten, ist mit Einschränkung aber auch auf quantitative Parameter (Artenzahl, Abundanz) anwendbar. Quantitativ können die Artenzahl pro Standort sowie die Anzahl der Metabarcoding-Reads pro Art bzw. Taxon angegeben werden. Aus den Ergebnissen dieses Vorhabens deutet sich an, dass zumindest für die Regenwürmer hieraus ebenfalls Rückschlüsse hinsichtlich der relativen Abundanz oder Biomasse gezogen werden könnten. Qualitativ kann für zu untersuchende Standorte die Artenzusammensetzung angegeben werden, ggf. unter Zuordnung von Arten zu verschiedenen ökologischen Gruppen. Die Standortdiversität kann anhand geeigneter Diversitätsindizes charakterisiert werden. Die an einem Standort erhobenen quantitativen und qualitativen Parameter können für die Überwachung von langfristigen Veränderungen in der Bodenbiologie herangezogen werden, sofern dieselben standardisierten Methoden verwendet werden, um die zu unterschiedlichen Zeitpunkten und an verschiedenen Standorten erhobenen Daten vergleichbar zu machen. Die Ableitung von Prognosen über zukünftige Entwicklungen ist somit auch mit den genetischen Bestimmungsmethoden grundsätzlich möglich, sofern ausreichende Kenntnisse über die Treiber solcher Entwicklungen vorliegen, was jedoch gleichermaßen auch für die klassisch morphologischen Methoden gilt. Genetische Bestimmungsmethoden können somit zu einer gesicherten Datengrundlage für umweltfachliche und umweltpolitische Entscheidungsprozesse beitragen. Für einige solcher Entscheidungen sind belastbare Bodengesundheitsindizes/Referenzwerte notwendig. Hinsichtlich der für die Anwendung der genetischen Bestimmungsmethoden anfallenden Kosten lässt sich feststellen, dass insbesondere bei Nutzung der eDNA sowie bei höheren Standortzahlen die DNA-basierten Methoden zum Teil erheblich geringere Kosten erzeugen als die klassisch morphologischen Probenahme- und Bestimmungsmethoden. Zudem bietet die eDNA den großen Vorteil, dass mit ihr gleichzeitig eine hohe Anzahl verschiedener Gruppen der Bodenfauna erfasst werden können. Einen limitierenden Faktor stellt aktuell noch die Qualität und Unvollständigkeit der genetischen Referenzdatenbanken dar. Während diese für die Regenwürmer sowohl für COI als auch 16S bereits als ausreichend genau angesehen werden können, besteht für andere Gruppen noch Nachholbedarf, wie insbesondere das Beispiel der Collembolen im vorliegenden Bericht zeigt.

Arbeitspaket 5: Fachgespräch (Workshop) – Vorschläge für das weitere Vorgehen

Die Ergebnisse des Vorhabens wurden in einem 1-tägigen Fachgespräch den Betreibern der BDF und weiteren Interessierten vorgestellt und diskutiert. Ziel des Workshops waren die Information der BDF-Betreiber zu den neuen Methoden, ihren Chancen, Kosten und Auswertungsmöglichkeiten und die Erfassung des weiteren Bedarfs an neuen/adaptierbaren Methoden aus dem Bodenmonitoring. Die Diskussionsbeiträge und Anregungen der Teilnehmer*innen wurden in den entsprechenden Kapiteln dieses Berichts berücksichtigt.

Basierend auf Ergebnissen dieses Projektes lässt sich feststellen, dass die genetischen Bestimmungsmethoden für ein routinemäßiges Monitoring der Bodenfauna geeignet sind. Es bestehen

kaum Zweifel daran, dass diese Methoden, insbesondere das eDNA-Metabarcoding, bei der künftigen Überwachung der biologischen Vielfalt des Bodens eine wichtige Rolle spielen wird. Molekulare Methoden werden bereits erfolgreich in anderen Umweltbereichen eingesetzt, z. B. bei der Bewertung der Qualität von Oberflächengewässern anhand von biologischen Qualitätsindizes, sodass einer routinemäßigen Anwendung auch im Bodenbereich nichts grundsätzlich im Wege stehen sollte. Vor einer Einführung in die behördliche Praxis müssen jedoch noch einige wesentliche Voraussetzungen erfüllt werden. Die DNA/Barcoding-Referenzdatenbanken müssen umfassend, gut kuratiert und qualitätskontrolliert sein, um Fehler bei der DNA-basierten Artenregistrierung zu vermeiden. DNA-basierte Methoden müssen standardisiert werden, z. B. im Rahmen der ISO, von der Probenahme im Feld, der Probenvorbereitung, der Metabarcoding-Leistung bis hin zur informatischen Auswertung für die Artenidentifizierung. Es müssen belastbare Schwellenwerte/Indizes für die Bodengesundheit, basierend auf Daten zur Gemeinschaft von Bodenorganismen entwickelt werden.

Die folgenden Empfehlungen können für eine künftige Ausgestaltung der Boden-Dauerbeobachtung in Deutschland abgegeben werden. Die Erhebungen bezüglich der Bodenfauna sollten in allen Bundesländern im gleichen Umfang und anhand einheitlicher, standardisierter Methoden erfolgen. Bodenorganismen sollten zunächst mit klassisch morphologischen Methoden regelmäßig (z. B. alle fünf Jahre) erfasst werden, mindestens Regenwürmer, Enchytraeiden und Collembolen. Die Aufnahme weiterer Gruppen (z. B. Nematoden, Milben, Myriapoden, Isopoden) sollte geprüft werden. Die Einführung genetischer Methoden sollte schrittweise erfolgen. So sollte, beginnend mit den Regenwürmern, zunächst eine parallele Anwendung klassisch morphologischer Methoden und eDNA-Barcoding erfolgen. comDNA-Metabarcoding kann als Unterstützung der morphologischen Bestimmung oder bei speziellen Fragestellungen hinzugezogen werden. Die im Rahmen des BDF-Programms erhobenen Daten sollten zentral zusammengeführt werden (z. B. am Umweltbundesamt) und in einheitlich aufbereiteter Form der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden. Eine regelmäßige Übernahme in die bodenzoologische Datenbank „Edaphobase“ wird ebenfalls empfohlen. Langfristig sollte eDNA-Metabarcoding standardmäßig zur Untersuchung und Bewertung der biologischen Vielfalt des Bodens eingesetzt werden, da es die gesamte Bodenfauna erfassen kann.

Aus diesen notwendigen Voraussetzungen und Empfehlungen ergibt sich insbesondere der folgende Forschungsbedarf, der anhand von speziell auf diese Fragestellungen zugeschnittenen Untersuchungen bearbeitet werden sollte. Die Methodik z. B. hinsichtlich der Details des Probenahmedesigns, der Anzahl notwendiger eDNA-Einzelproben für eine Mischprobe sowie der Vorgehensweise bei der DNA-Extraktion und dem Metabarcoding muss verfeinert werden. Dies sollte im Rahmen der Standardisierung der jeweiligen Schritte erfolgen. Die Ableitbarkeit von Korrekturfaktoren zwischen Abundanz/Biomasse und Anzahl der Sequenzierungs-Reads zur Festlegung (vergleichbarer) Quantifizierungsmetriken sollte untersucht werden. Die Abhängigkeit der eDNA-Verfügbarkeit von Bodeneigenschaften sowie der Biologie und dem Verhalten von Bodenorganismen und die Verweildauer von DNA im Boden in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen sollten bestimmt werden. Die DNA-Referenzdatenbanken sollten verbessert, erweitert, kuratiert und qualitätsgesichert werden. Arten, die bereits morphologisch und genetisch charakterisiert sind, sollten baldmöglichst auch taxonomisch formal beschrieben und mit gültigen Namen versehen werden, um Diskrepanzen in der Namensgebung zwischen morphologisch bestimmten und sequenzierten Taxa zu beheben. Dasselbe gilt für neue zu entdeckende Arten und Genotypen. Zur genetischen Charakterisierung ist auf das klassische (individuenbasierte) Sanger-Sequenzierungsverfahren zurückzugreifen. Schwellenwerte/Indizes für die Bodengesundheit, z. B. anhand von Referenzwerten, sollten abgeleitet werden. Die Relevanz und Eignung weiterer Organismengruppen, insbesondere Nematoden, Milben, Myriapoden und Isopoden, für künftige Monitoringprogramme sollte überprüft werden.

Summary

Introduction

The recording and assessment of the diversity of soil organisms has made great progress in recent years in the European Union (EU) and Germany. In particular, the great influence of soil organisms for the provision of the ecological functions of the soil has been worked out. It should be emphasised that not only 'key species' but also the interactions of many invertebrate species are responsible for these functions. In Germany, however, there is no nationwide and standardised recording of soil organisms, although a comprehensive infrastructure is available in the form of the approximately 800 permanent soil monitoring sites (BDF). However, not all federal states conduct their own soil biological surveys on their BDF. The most important reason for this is probably the time-consuming and, due to the lack of trained taxonomists, expensive identification of soil invertebrates. The project described in this report was intended to contribute to solving this problem by recording important soil organism groups at selected sites and then identifying these animals using both 'classical' morphological and 'modern' genetic methods. The aim of this project was thus to develop recommendations for an efficient and routinely implementable monitoring of selected soil organism groups within the German BDF programme.

State of knowledge

In contrast to other environmental compartments, the diversity of organisms found in soils and the functions they provide have long been neglected. Especially in the last 20 years, research on the role of soil biodiversity in the provision of ecosystem services has been considerably increased. The high functional value of these often very complex communities has also been highlighted. In parallel to this scientific intensification, there have been activities at the political level for some years, e.g., with the aim of drawing up a separate soil health directive within the framework of the "EU Soil Strategy for 2030", in which diverse aspects of soil protection are addressed. The aim of this soil strategy is to ensure that all soil ecosystems in the EU are in a healthy condition by 2050 and are therefore more resilient and able to provide as many ecosystem services as possible in the long term.

For some time now, there has been clear evidence that human activities are reducing the diversity and abundance of soil organisms and, at the same time, their contributions to the above-mentioned ecosystem services. However, the protection of soil life has been regulated by law in only a few countries. An important prerequisite for such protection is sufficient knowledge about the occurrence of soil organisms at a particular site or in the respective soil. Important reasons for the so far neglected recording of soil biodiversity are probably the enormous number of organisms as well as species in the soil. However, the recording of this high biodiversity with 'classical' morphological methods is difficult, partly because of the large amount of time (and thus high costs) required for the identification of many individuals, and partly because of the increasing lack of well-trained taxonomists in the last 20 years. This problem could at least be reduced by the application of 'modern' genetic methods. For this, there is an urgent need to further develop the primary genetic methods used so far, especially deoxyribonucleic acid (DNA) barcoding. DNA barcoding uses fragments of a 'standard gene' for molecular identification of species; in invertebrates this is mostly cytochrome c oxidase I (COI). There are two possibilities for further development: first, the use of additional genes (mainly from the cell nucleus) and second, the development of metabarcoding: this means, on the one hand, the simultaneous examination of DNA from several individuals of different species (e.g. from one family) ('community DNA'; comDNA), on the other hand, the examination of DNA extracted from whole soil samples of a wide variety of soil fauna species as well as microorganisms (so-called 'environmental DNA'; eDNA).

The information on soil biodiversity can be used to derive reference values (i.e., which soil organism community should be present at a given site with its respective typical soil) and thus to assess the biological quality of soils. This will also make it possible to assess the function of soil as a habitat for soil organisms, as described in the German Federal Soil Protection Act, since more precise information on the implementation of this mandate is currently lacking in downstream regulations such as the German Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance. However, this can only be achieved if the respective organisms are known, or methods are available with which they can be recorded and determined.

Work package 1: Literature review on the state of research

A comprehensive overview of existing soil monitoring programmes at national and, in part, international level can be found in the "UBA-Texte" Volumes No. 52/2020 "Soil data in Germany - Overview of the most important measurement and survey activities for soils" and 136/2021 "Integrated monitoring in the agricultural landscape - Recording the ecological effects of chemical plant protection". Monitoring activities at the national level, in which soil zoological parameters are also collected, are in particular the Permanent Soil Monitoring Programme, the Long-term Agricultural Field Trials and the Federal Environmental Specimen Bank (UPB). In addition, the Federal Environment Agency is currently funding the project "TrenDNA - Studies on biological diversity with the Federal Environmental Specimen Bank", in which, among other things, the soil samples collected in the UPB are to be analysed using metagenomics. At the international level, several activities are currently underway to establish networks for monitoring soil biology, among other things. In particular, the Soil Biodiversity Observation Network (Soil BON) and the EU Soil Observatory (EUSO) are currently being established.

Soil functions refer to natural biological processes, while ecosystem services describe those functions that contribute to human well-being. In addition to the influence of external abiotic factors, the capacity of soil to fulfil its functions and sustain life is ensured by soil organisms interacting in complex food webs. Soil organisms can be classified into functional groups to better understand their role within the food web in terms of ecosystem functions. An example of a functional grouping of soil organisms is the classification of earthworms into three ecological groups: epigeic (litter dwellers), endogeic (shallow burrowers/soil eaters) and anecic (deep burrowers) life form type. The presence of earthworms generally has a positive effect on ecosystem services through the combination of soil-related processes they influence. Earthworms may have a dominant influence on these soil processes and ecosystem services, but they do not act alone. Therefore, a better understanding of the common and unique contributions of the different groups of soil organisms to the provision of ecosystem services is needed.

Soil biodiversity is under high threat due to the influence of various anthropogenic abiotic and biological factors as well as land use. A comprehensive overview of the main threats, their drivers and impacts on soils as well as their influence on soil biodiversity is provided in the report "State of knowledge of soil biodiversity - Status, challenges and potentialities, Report 2020" of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The greatest threats to soil biodiversity are caused by human-induced changes, and the negative impacts can be amplified by the synergistic and additive effects that can occur between such threats.

Work package 2: Selection of sites in the BDF programme - sampling

The core of the practical work in this project was the sampling of 25 sites in Germany, predominantly BDF and in roughly equal proportions arable, grassland and forest sites, using standardised methods for recording soil organisms, followed by the morphological identification of the captured animal material and genetic identification using comDNA and eDNA metabarcoding. Criteria for the selection of the organism groups to be studied were their taxonomic diversity,

their ecological role, the occurrence of key species, their sensitivity to anthropogenic stressors, the status of assessment and the practicability of their sampling and identification. In addition to the earthworms, which had been selected in advance, the collembolans and enchytraeids were selected for the study, also because they had already been studied in some federal states within the framework of the German BDF programme.

The technical performance of the sampling was carried out using ISO standard methods. Initially, a pilot study was carried out at three sampling sites, each with a different use (forest, grassland, arable land). Based on the experience gained, a standard design was defined, which was applied to the remaining 22 sampling sites. For comDNA metabarcoding, tissue composite samples of the individuals or parts thereof previously extracted from the soil and morphologically identified were prepared and COI was amplified, using the same primer for all three groups of organisms. The eDNA was extracted from a composite sample of 20 soil cores per site. For the earthworm eDNA metabarcoding, 16S mitochondrial ribosomal DNA was used, as this marker is better suited for potentially degraded extracellular DNA. For the eDNA samples of enchytraeids and collembolans, COI was used because the samples contained not only extracellular DNA but also whole individuals and thus a higher concentration of the COI marker and because the 16S reference databases are not yet comprehensive enough.

Work package 3: Method comparison - evaluation

Based on the data collected in this project, the results of morphological and genetic species identification were discussed comparatively. In a second step, the results of the morphological identification per site and considering the genetic identification results, were compared with the reference values published for earthworms and enchytraeids for the land use types arable land, grassland, and forest. In addition, the respective costs were estimated that would be necessary per identification method depending on the total number of sites.

More earthworm species were frequently detected by comDNA metabarcoding than by eDNA metabarcoding and morphological identification. comDNA metabarcoding can assign individuals to a species that are difficult to determine morphologically, e.g., juveniles, cryptic species, and fragments. On average, eDNA metabarcoding detected a similar number of earthworm species as morphological identification. Some species seem to have a higher or lower probability of being detected by eDNA metabarcoding than others. Small epigeic species were in some cases not detected by classical sampling and morphological identification. All three identification methods can differentiate between sites with different species compositions, and the degree of separation can vary depending on the identification method. The relative proportion of eDNA sequencing reads shows potential as a surrogate of relative abundance or biomass for endogeic species.

The species number and species composition of a site with respect to enchytraeids are adequately described with each of the three methods. A combination of the methods leads to better results. DNA metabarcoding methods are not suitable for predicting the abundance or biomass of individual species, but there is evidence that they adequately describe the quantitative proportion of ecological/functional groups. Each method has its specific sources of error. A large part can be corrected by recourse to other methods. For DNA metabarcoding methods, the importance of a complete and well-curated reference database cannot be emphasised strongly enough; the validity of this method stands and falls with it. Likewise, classical taxonomy remains indispensable: many new species of enchytraeids still await description, by means of morphology and DNA sequences.

For the collembolans, comDNA metabarcoding was able to detect specimens from reference species of laboratory cultures but the number of reads was not coherent with the relative abundance of the species, as expected. On average, the eDNA approach detected a higher number of

species than morphological identifications and comDNA. Morphological identifications and comDNA detected a similar number of species, but different species were detected considering the reference database. Due to the incomplete Collembola reference database, eDNA and comDNA can be used to determine species richness, but not to estimate diversity, as the number of reads may not reflect species proportions. Before considering DNA approaches as an alternative to morphological identifications, the available reference databases need to be improved.

Based on the project results, it was found that there are often discrepancies in the range of species identified per site using the different identification methods. Some of the discrepancies found in the taxon lists produced by the three methods seem to be related to the level of taxonomic resolution achieved. comDNA metabarcoding can reveal the species identity of morphologically unidentifiable individuals, especially juveniles and fragments. Morphological misidentifications can occur in taxonomically difficult or hard-to-observe taxa, e.g., in poorly preserved specimens, especially when only a few individuals are available. Other possible reasons for differences between identification methods are: Small individuals such as juveniles or some epigeic species may be overlooked in handsorting of earthworms. For collembolans, two different sets of samples were used for morphological identification and comDNA metabarcoding. The amount and distribution of eDNA left in the soil by different species varies according to the abundance, behaviour, and size of the animals. eDNA may still be present in the soil even though there are no living specimens left, e.g., due to drought or the abandonment of burrows by anecic earthworms. Discrepancies may also arise from the presence of erroneous or mislabelled COI or 16S sequences in the reference databases. Species with a low number of sequencing reads may have been incorrectly excluded in the metabarcoding bioinformatics pipeline.

At the arable and grassland sites sampled during the project, the expected earthworm communities were found for the most part. At the forest sites, however, deviations from the expected species spectrum were observed in many cases. A possible explanation for these observations is the severe drought at most of the sites during the study period, which may have affected epigeic species in particular. The enchytraeid community sampled at the arable and forest sites corresponded for the most part to the known reference values. At the sampled grassland sites, however, an increased number of deviations from the expected values of the enchytraeid community was observed at some sites.

Work package 4: Evaluation of the methods for routine use

As the data collected during this project prove, it is possible to achieve the goals of the BDF programme using genetic identification methods. The current soil condition, as indicated by the respective community of soil fauna, can be described with these methods. This applies in particular to qualitative parameters such as the presence or absence of species but can also be applied to quantitative parameters (number of species, abundance) with some restrictions. Quantitatively, the number of species per site and the number of metabarcoding reads per species or taxon can be given. The results of this project suggest that, at least for earthworms, conclusions could also be drawn regarding relative abundance or biomass. Qualitatively, the species composition can be indicated for sites to be investigated, if necessary, by assigning species to different ecological groups. Site diversity can be characterised using suitable diversity indices. The quantitative and qualitative parameters collected at a site can be used to monitor long-term changes in soil biology, provided the same standardised methods are used to make data collected at different times and sites comparable. The derivation of prognoses about future developments is thus also possible in principle with the genetic identification methods, provided that sufficient knowledge about the drivers of such developments is available, which, however, also applies equally to the classical morphological methods. Genetic identification methods can thus contribute to a secure data basis for environmental and environmental policy decision-making

processes. For some of these decisions, reliable soil health indices/reference values are necessary. Regarding the costs incurred for the application of genetic identification methods, it can be stated that, especially when using eDNA and with higher numbers of sites, the DNA-based methods sometimes generate considerably lower costs than the classic morphological sampling and identification methods. In addition, eDNA offers the great advantage that many different groups of soil fauna can be recorded at the same time. A limiting factor is currently still the quality and incompleteness of the genetic reference databases. While these can already be considered sufficiently accurate for earthworms, both for COI and 16S, there is still a need to catch up for other groups, as the example of collembolans in this report shows.

Work package 5: Expert discussion (workshop) - proposals for further action

The results of the project were presented to and discussed with the BDF operators and other interested parties in a one-day expert meeting. The aim of the workshop was to inform the BDF operators about the new methods, their chances, costs, and evaluation possibilities and to determine the further need for new/adaptable methods for soil monitoring. The participants' contributions to the discussion and suggestions were considered in the corresponding chapters of this report.

Based on the results of this project, it can be concluded that genetic identification methods are suitable for routine monitoring of soil fauna. There is little doubt that these methods, especially eDNA metabarcoding, will play an important role in future monitoring of soil biodiversity. Molecular methods are already being used successfully in other environmental areas, e.g., in the assessment of the quality of surface waters using biological quality indices, so that there should be no fundamental obstacles to their routine application in the soil sector. Before it can be introduced into official practice, however, several essential prerequisites still must be met. The DNA/barcoding reference databases must be comprehensive, well curated and quality controlled to avoid errors in DNA-based species registration. DNA-based methods need to be standardised, e.g., within ISO, from field sampling, sample preparation, metabarcoding performance to informatic evaluation for species identification. Robust thresholds/indices for soil health based on soil organism community data need to be developed.

The following recommendations can be made for a future design of the German BDF programme. Surveys of soil fauna should be carried out to the same extent in all federal states and using uniform, standardised methods. Soil organisms should initially be recorded regularly (e.g., every five years) using classical morphological methods, at least earthworms, enchytraeids and collembolans. The inclusion of other groups (e.g., nematodes, mites, myriapods, isopods) should be considered. The introduction of genetic methods should be gradual. Starting with earthworms, classical morphological methods and eDNA barcoding should be used in parallel. comDNA metabarcoding can be used to support the morphological identification or for special questions. The data collected within the framework of the BDF programme should be brought together centrally (e.g., at the Federal Environment Agency) and made available to the public in a uniformly processed form. A regular transfer to the soil zoological database "Edaphobase" is also recommended. In the long term, eDNA metabarcoding should be used as standard for investigating and assessing soil biodiversity, as it can record the entire soil fauna.

These necessary prerequisites and recommendations result in the following need for research, which should be dealt with by means of studies specifically tailored to these questions. The methodology, e.g., regarding the details of the sampling design, the number of individual eDNA samples required for a composite sample and the procedure for DNA extraction and metabarcoding, must be refined. This should be done as part of the standardisation of the respective steps. The derivability of correlation factors between abundance/biomass and number of

sequencing reads to define (comparable) quantification metrics should be investigated. The dependence of eDNA availability on soil properties and the biology and behaviour of soil organisms and the residence time of DNA in soil in relation to environmental conditions should be determined. DNA reference databases should be improved, expanded, curated and quality assured. Species that have already been morphologically and genetically characterised should also be formally described taxonomically as soon as possible and given valid names to eliminate discrepancies in naming between morphologically determined and sequenced taxa. The same applies to new species and genotypes to be discovered. For genetic characterisation, the classical (individual-based) Sanger sequencing procedure should be used. Thresholds/indices for soil health, e.g., based on reference values, should be derived. The relevance and suitability of further organism groups, especially nematodes, mites, myriapods and isopods, for future monitoring programmes should be reviewed.

1 Einleitung

Die Erfassung und Beurteilung der Diversität der Bodenorganismen, genauer gesagt der Bodeninvertebraten, hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, zum Beispiel auf europäischer Ebene im Rahmen des Vorhabens „EcoFinders“ (Griffiths et al. 2016) innerhalb des „Seventh Framework Programme“ (FP7) der Europäischen Union (EU). Dabei wurde vor allem der große Einfluss der Bodenorganismen für die Bereitstellung der ökologischen Funktionen des Bodens herausgearbeitet (z. B. die Aufrechterhaltung der Bodenstruktur bzw. der Nährstoffkreisläufe). Hervorzuheben ist, dass für diese Funktionen nicht nur ‚Schlüsselarten‘ (z. B. die tiefgrabende Regenwurmart *Lumbricus terrestris*), sondern auch die Interaktionen vieler, oft unscheinbarer Invertebraten-Arten (zusammen mit den in diesem Vorhaben nicht bearbeiteten Mikroorganismen) verantwortlich sind (Creamer et al. 2016). Auch in Deutschland hat das Wissen über Bodenorganismen in den letzten Jahren deutlich zugenommen, primär in wissenschaftlichen Untersuchungen (z. B. Römbke et al. 2012). Im Gegensatz zu, zum Beispiel, den Niederlanden (Rutgers et al. 2008) fehlt in Deutschland eine flächendeckende und standardisierte Erfassung der Bodenorganismen, obwohl mit den ca. 800 gut charakterisierten Boden-Dauerbeobachtungsflächen (BDF) eine umfassende Infrastruktur dafür zur Verfügung steht (Barth et al. 2000). Allerdings führen bisher nicht alle Bundesländer eigene bodenbiologische Untersuchungen auf ihren BDF durch. Wichtigster Grund dafür dürfte die aufwändige und mangels ausgebildeter Taxonomen teure Bestimmung der Bodeninvertebraten sein. Zur Lösung dieses Problems sollte das in diesem Bericht beschriebene Vorhaben beitragen, indem an ausgewählten Standorten (primär BDF) wichtige Bodenorganismengruppen erfasst und diese Tiere dann sowohl mittels ‚klassischer‘ morphologischer als auch ‚moderner‘ genetischer Methoden (Barcoding) bestimmt wurden. Das Ziel dieses Vorhabens war es also, Empfehlungen für ein effizientes und routinemäßig umsetzbares Monitoring von ausgewählten Bodenorganismengruppen im Rahmen des deutschen BDF-Programms zu entwickeln. Dazu waren die folgenden fünf Arbeitspakete (AP) umzusetzen:

- ▶ AP 1: Literatursurvey zum Stand der Forschung bezüglich des Monitorings, der Funktion, der Beeinflussung durch abiotische und biotische Faktoren sowie Landnutzung und Ökosystemfunktionen von Bodenorganismen. Aktualisierung des Kenntnisstands von bodenbiologischen Untersuchungen in der Boden-Dauerbeobachtung in Deutschland;
- ▶ AP 2: Auswahl von 25 Standorten im BDF-Programm in enger Kooperation mit Länderbehörden, wobei die Hauptnutzungstypen (Acker, Grünland, Wald) abzudecken waren. Auswahl, Probenahme, taxonomische Auswertung und Barcoding von drei Tierarten-Gruppen (Regenwürmer sowie zwei weitere Artengruppen);
- ▶ AP 3: Methodenvergleich aus dem Einsatz klassisch-morphologischer sowie genetischer Bestimmungsmethoden und Auswertung dieser Daten auch im Rahmen von bodenbiologischen Beurteilungsansätzen, speziell dem Referenzverfahren (Römbke et al. 2012);
- ▶ AP 4: Bewertung der Methoden für den Routinebetrieb und Erarbeitung von Vorschlägen für die methodische Weiterentwicklung des Monitorings von Bodenorganismen, insbesondere auf den BDF;
- ▶ AP 5: Durchführung eines Fachgesprächs (Workshop) mit an der Bodenbiologie Interessierten aus Behörden, Universitäten sowie den BDF-Betreibern. Erstellung dieses Abschlussberichts, Abgabe von Vorschlägen für das weitere Vorgehen sowie Identifizierung des Forschungsbedarfs.

Diese Arbeitspakete wurden von der ECT Oekotoxikologie GmbH (ECT) federführend bearbeitet. Dazu gehörte auch die Auswahl der Probenahmestandorte, die Beprobung aller drei ausgewählten Tiergruppen auf diesen Standorten sowie die Bestimmung der Lumbriciden. Die taxonomische Bearbeitung der Enchytraeiden und Collembolen erfolgte durch zwei auf diesem Gebiet sehr erfahrene Unter-Auftragnehmer: für die Enchytraeiden war dies Dr. R.M. Schmelz (A Coruña, Spanien) und für die Collembolen die Firma CloverStrategy Lda. (Coimbra, Portugal).

Die genetische Charakterisierung des gesamten Tiermaterials, sowohl einzelner Arten als auch via Metabarcoding, wurde von zwei weiteren Unter-Auftragnehmern übernommen. Dafür wurden aufgrund ihrer wissenschaftlichen Expertise einerseits die Firma AllGenetics Ltd. (AG; A Coruña, Spanien) für die Regenwürmer und Enchytraeiden, andererseits die Universität Aarhus (AU; Dänemark) für die Collembolen, ausgewählt. Alle genannten Institutionen waren der ECT aus langjähriger Zusammenarbeit in verschiedenen Projekten zur Bodenbiodiversität, -ökologie und -ökotoxikologie) bekannt.

2 Erkenntnisstand

Im Gegensatz zu anderen Umweltkompartimenten wurde die in Böden vorkommende Diversität von Organismen und die von ihnen erbrachten Funktionen lange vernachlässigt. Dies ist erstaunlich, da ein erheblicher Teil der terrestrischen Biodiversität im Boden zu finden ist (Wagg et al. 2014). Speziell in den letzten 20 Jahren wurde die Forschung zur Rolle der Bodenbiodiversität bei der Erbringung ökosystemarer Leistungen erheblich verstärkt (Orgiazzi et al. 2016). Dabei wurde auch die hohe funktionale Wertigkeit dieser häufig sehr komplexen Gemeinschaften herausgearbeitet, z. B. bei der Aufrechterhaltung biogeochemischer Kreisläufe (Bardgett & Van der Putten 2014), aber auch beim Erhalt der Bodenstruktur (Griffiths et al. 2016). Allerdings sind andere Funktionen dieser Organismen (z. B. in Bezug auf die Kontrolle von Parasiten, ihr Einfluss auf klimatische Prozesse oder beim Abbau schädlicher Stoffe) noch unzureichend erforscht (Turbé et al. 2010). Parallel zu dieser wissenschaftlichen Intensivierung gab es auf politischer Ebene (vor allem in der EU; Königer et al. 2022) seit einigen Jahren Aktivitäten z. B. mit dem Ziel, im Rahmen der „EU-Bodenstrategie für 2030“ eine eigene Boden-Richtlinie zu erstellen, in der – bei enger Verzahnung mit weiteren EU-Initiativen, speziell zur Chemikalien-Sicherheit – verschiedenste Aspekte des Bodenschutzes adressiert werden (siehe Abbildung 1). Diese Bodenstrategie hat das Ziel, dass sich bis 2050 alle Bodenökosysteme in der EU in einem gesunden Zustand befinden und somit widerstandsfähiger sind und so dauerhaft möglichst viele der folgenden Ökosystemdienstleistungen erbringen können:

- ▶ Erzeugung von Lebensmitteln und Biomasse, auch in der Land- und Forstwirtschaft;
- ▶ Aufnahme, Speicherung und Filterung von Wasser und Umwandlung von Nährstoffen und Substanzen und somit Schutz der Grundwasserkörper;
- ▶ Bereitstellung der Grundlagen für Leben und Biodiversität, einschließlich Lebensräume, Arten und Gene;
- ▶ Fungieren als CO₂-Speicher;
- ▶ Bereitstellung einer physischen Plattform und Erbringung kultureller Dienstleistungen für Menschen und deren Aktivitäten;
- ▶ Fungieren als Rohstoffquelle;
- ▶ Fungieren als Archiv des geologischen, geomorphologischen und archäologischen Erbes.

Seit geraumer Zeit gibt es klare Belege dafür, dass menschliche Aktivitäten (z. B. Änderungen der Landnutzung, Chemikalienausbringung oder der Rückgang des organischen Gehalts in Oberböden (z. B. Ockleford et al. 2017, Römbke et al. 2017) die Diversität und Abundanz von Bodenorganismen und damit zugleich deren Beiträge zu den oben genannten ökosystemaren Leistungen verringern (Faber & Van Wensem 2012, Mendes et al. 2016, Orgiazzi et al. 2016). Schätzungen beziffern den Wert der von diesen Organismen erbrachten ökosystemaren Leistungen auf mehr als 1500 Milliarden Dollar pro Jahr (Pimentel et al. 1997). Allerdings sollte bei solchen Zahlen nicht vergessen werden, dass der Schutz der Biodiversität ein generelles Schutzziel ist bzw. sein sollte, unabhängig davon, ob es um die oft übersehenen Bodenorganismen oder um Vögel oder Säuger geht. Allerdings ist der Schutz des Bodenlebens bisher nur in wenigen Staaten gesetzlich geregelt (Römbke et al. 2016b).

Abbildung 1: Verbindungen zwischen der EU-Bodenstrategie und anderen EU-Initiativen



Quelle: Europäische Kommission (2021)

Eine wichtige Voraussetzung für einen solchen Schutz ist eine ausreichende Kenntnis zum Vorkommen (Diversität, Abundanz) von Bodenorganismen an einem bestimmten Standort bzw. im jeweiligen Boden; d. h. mittels standardisierter Methoden sind in umfassenden und repräsentativen Monitoringstudien robuste Daten zu erheben (Gardi et al. 2009, Faber et al. 2013). Wichtige Gründe für die bisher vernachlässigte Erfassung der Bodenbiodiversität dürften einerseits die enorme Anzahl an Organismen als auch an Arten im Boden sein (Jeffrey et al. 2010). So sind z. B. ca. 1000 Spezies pro Standort in mitteleuropäischen Buchenwäldern durchaus möglich (z. B. Beck 1983). Allerdings ist die Erfassung dieser hohen Biodiversität mit ‚klassischen‘ morphologischen Methoden schwierig, teils wegen des großen Zeitbedarfs (und damit hoher Kosten) bei der Bestimmung vieler Individuen, teils wegen des in den letzten 20 Jahren immer mehr zunehmenden Mangels an gut ausgebildeten Taxonomen. Dieses Problem könnte durch die Anwendung ‚moderner‘ genetischer Methoden zumindest verringert werden (z. B. Porco et al. 2013). In der Bodenbiologie sind diese neuen Verfahren bisher vor allem mit Regenwürmern angewandt worden (Bienert et al. 2012, Perez-Losada et al. 2012, Decaens et al. 2013). Zum Beispiel wurde in einem internationalen Ringversuch mittels COI-Untersuchung festgestellt, dass es in vielen ökotoxikologischen Laboratorien zu Verwechslungen der beiden in Standardtests eingesetzten Kompostwürmer *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* gekommen ist. Zudem wurde in diesem Ringversuch auch die Belastbarkeit der COI-Methode untersucht, indem Proben vom jeweils gleichen Individuum in fünf Laboratorien bestimmt wurden. Die sehr geringen Abweichungen zwischen den jeweils festgestellten COI-Sequenzen belegen die Praktikabilität und Belastbarkeit dieser Methodik (Römbke et al. 2016a).

Bei der Anwendung genetischer Methoden zur Bestimmung von Organismen sollte nicht vergessen werden, dass für jede Art eine ‚Validierung‘, d. h. eine vergleichende morphologische und genetische Bestimmung mit dem gleichen Individuum vorangehen sollte. Das Ergebnis beider Methoden ist, zusammen mit dem untersuchten Tier, als Referenzmaterial in einer öffentlich zugänglichen Datenbank abzulegen. Dies ist ein entscheidender Schritt bei der Anwendbarkeit genetischer Methoden, ohne den es nicht möglich ist, die bisher an einen Artnamen angehängte biogeographische und ökologische Information zu verwenden. Diese Verbindung von morphologischer und genetischer Information ist potenziell die größte Schwäche des ganzen Ansatzes. Dies zeigt sich z. B. daran, wenn bei entsprechenden Datenbank-Abfragen für eine genetische Sequenz mehrere, oft auf den ersten Blick unmöglich passende Artnamen ausgegeben werden. Solche, vor allem in der Frühzeit der Anwendung genetischer Methoden mehrfach vorkommenden Fälle wurden in den letzten Jahren durch entsprechende Maßnahmen zur Qualitätssicherung deutlich seltener. Zugleich nimmt auch die Standardisierung der praktischen Schritte, von der Probenahme über die eigentliche Laborarbeit bis hin zu den Rahmenbedingungen (z. B. die Lagerung der Proben) erheblich zu (z. B. Straube & Juen 2013, ISO 2017). Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass die rasche technologische Weiterentwicklung einer Standardisierung dieser Methodik (noch) Grenzen setzt. Noch nicht gelöst ist die Frage, inwieweit sich mittels genetischer Verfahren neben dem Vorkommen einer Art in einer Bodenprobe auch die jeweilige Anzahl der Organismen einer Art bestimmen lässt.

Aus diesen Gründen ist es dringend notwendig, die bisher primär eingesetzten genetischen Verfahren, insbesondere das Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Barcoding, weiterzuentwickeln. DNA-Barcoding verwendet Fragmente eines ‚Standard-Gens‘ zur molekularen Identifizierung von Arten; bei Invertebraten ist dies zumeist COI. Für eine Weiterentwicklung gibt es zwei Möglichkeiten: einmal die Verwendung weiterer Gene (vor allem aus dem Zellkern), andererseits die Entwicklung eines Metabarcoding (Taberlet et al. 2012b): Damit ist einerseits die gleichzeitige Untersuchung der DNA von mehreren Individuen verschiedener Arten (z. B. aus einer Familie) gemeint (‚Gemeinschafts-DNA‘; comDNA), andererseits die Untersuchung von aus ganzen Bodenproben extrahierter DNA verschiedenster Arten der Meso- und Makrofauna sowie von Mikroorganismen (sogenannter ‚Umwelt-DNA‘; eDNA) (Taberlet et al. 2012a, Thomsen & Willerslev 2015, Zinger & Philippe 2016, Taberlet et al. 2018). Die für Mikroben notwendige Extraktion und Bearbeitung ist bereits in einer internationalen Richtlinie beschrieben worden (ISO 2016). Methoden für das Metabarcoding der Bodenfauna sind dagegen noch nicht standardisiert, da es sich um ein relativ junges und sich schnell weiterentwickelndes Forschungsfeld handelt (Creer et al. 2016). Die Optimierung und Validierung der jeweiligen Methoden, insbesondere hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit traditionellen Verfahren (morphologische Einzelbestimmung der Individuen), ist noch im Fluss (Elbrecht et al. 2017); dies steht aber generell einem Einsatz des Metabarcoding für das Monitoring der Biodiversität nicht im Wege (Ji et al. 2013). In jedem Fall ist es äußerst wichtig, die so erarbeiteten wissenschaftlichen Informationen sowohl zur Morphologie als auch zur Genetik in zentrale Datenbanken einzupflegen.

Die Informationen zur Bodenbiodiversität können für die Ableitung von Referenzwerten (d. h. welche Bodenorganismengemeinschaft sollte an einem bestimmten Standort mit seinem jeweils typischen Boden vorkommen) und damit zur Beurteilung der biologischen Qualität von Böden genutzt werden (Beylich et al. 2005, Breure et al. 2005, Rutgers et al. 2008, Römbke et al. 2016b). Allerdings gibt es hinsichtlich der zu beprobenden Tiergruppen eine Vielzahl von Vorschlägen in der Literatur, wobei meist ein ‚Batterieansatz‘ mit verschiedenen Invertebratengruppen – identifiziert anhand vorab festgelegter Kriterien – verwendet wird (Griffiths et al. 2016). Damit wird es auch möglich, die im § 2 des Bundes-Bodenschutzgesetzes (BBodSchG 1998) beschriebene Funktion des Bodens als Lebensraum für Bodenorganismen zu beurteilen, denn bisher fehlen genauere Angaben zur Umsetzung dieses Auftrags in den nachgeschalteten

Regelwerken wie der Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV 1999). Zugleich würden mit einem solchen Ansatz wichtige Aspekte der Nationalen Strategie zur biologischen Vielfalt des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU 2011) aufgegriffen, in der es explizit heißt: „Deutschland beherbergt eine gebietstypische, natürlich und historisch gewachsene Vielfalt an Böden, die ihre Funktionen für Mensch und Natur erfüllen. Sie bieten günstige Lebensbedingungen für die standorttypischen Arten und Lebensgemeinschaften, die in, auf und von den Böden leben.“ Als Ziel dieser Strategie der Bundesregierung wird des Weiteren genannt: „Die Böden als Träger der natürlichen Funktionen bleiben langfristig in ihrer Funktionsfähigkeit erhalten (BMU 2011).“ Dieses Ziel ist allerdings nur zu erreichen, wenn man die jeweiligen Organismen kennt bzw., im Minimum, über Methoden verfügt, mit denen sie erfasst und bestimmt werden können. Ersteres ist seit der Verabschiedung der entsprechenden ISO-Richtlinien möglich, letzteres war das Anliegen des hier beschriebenen Vorhabens.

Seit fast 20 Jahren gibt es konkrete Vorschläge zur Messung biologischer Parameter auf den ca. 800 deutschen Bodendauerbeobachtungsflächen (Barth et al. 2000). Allerdings entscheidet jedes Bundesland selbst, ob, und wenn ja welche Untersuchungen wie oft auf den jeweils eigenen BDF durchgeführt werden (siehe Abschnitt 3.1.1). Trotz dieser Mängel sind die Bodendauerbeobachtungsflächen aufgrund ihrer großen Zahl und guten Charakterisierung eine hervorragende Basis für eine umfassende biologische Bewertung der Bodenqualität. Allerdings wurden die bisher erhobenen Daten weder regional noch zentral ausgewertet, was nicht zuletzt auf das Fehlen eines umfassenden Bewertungskonzepts zurückzuführen ist. Allerdings gibt es Bestrebungen, die zoologischen BDF-Daten über die zentrale deutsche Datenbank zur Bodenbiologie („Edaphobase“; Standort: Senckenberg-Museum Görlitz) verfügbar zu machen (Burkhardt et al. 2014). Zugleich gibt es auf europäischer Ebene Aktivitäten, vorhandene nationale Datenbanken zur Bodenbiologie zu vernetzen. Zu diesem Thema wurde unter Federführung des Senckenberg-Museums Görlitz die „European Cooperation in Science and Technology“ (COST)-Action „EUdaphobase“ ins Leben gerufen. Diese COST-Action zielt darauf ab, die Strukturen und Verfahren zu schaffen, die für die Entwicklung einer offenen europaweiten Dateninfrastruktur zur biologischen Vielfalt der Böden erforderlich sind. Oberstes Ziel von EUdaphobase ist die Schaffung eines europaweiten bodenbiologischen Daten- und Wissensspeichers, der für das Verständnis, den Schutz und die nachhaltige Bewirtschaftung von Böden, ihrer biologischen Vielfalt und ihrer Funktionen genutzt werden kann.

3 AP 1: Literaturlauswertung zum Stand der Forschung

3.1 Bestehende nationale und internationale Boden-Monitoringprogramme

Eine umfangreiche Übersicht über die bestehenden Boden-Monitoringprogramme auf nationaler sowie teilweise internationaler Ebene wurde parallel zum hier beschriebenen Vorhaben von Kaufmann-Boll et al. (2020) und Toschki et al. (2021b) im Auftrag des Umweltbundesamtes erstellt. Monitoring-Aktivitäten auf nationaler Ebene, in denen auch bodenzoologische Parameter erhoben werden sind insbesondere die Boden-Dauerbeobachtung, die Landwirtschaftlichen Dauerfeldversuche (DFV) und die Umweltprobenbank des Bundes (UPB), die in den folgenden Kapiteln kurz dargestellt werden. Zudem fördert das Umweltbundesamt aktuell das Projekt „TrenDNA – Untersuchungen zur biologischen Vielfalt mit der Umweltprobenbank des Bundes“, in dem unter anderem die in den vergangenen Jahrzehnten in der UPB gesammelten Bodenproben anhand von Metagenomik untersucht werden sollen. Auf internationaler Ebene sind derzeit mehrere Aktivitäten im Gange, um Netzwerke für das Monitoring unter anderem der Bodenbiologie zu etablieren. Hierbei sind insbesondere die im Aufbau befindlichen Initiativen „Soil Biodiversity Observation Network“ (Soil BON) und das „EU Soil Observatory“ (EUSO) zu nennen, die ebenfalls zusammenfassend beschrieben werden.

3.1.1 Boden-Dauerbeobachtung in Deutschland

Eine ausführliche aktuelle Darstellung der deutschen Boden-Dauerbeobachtung findet sich in Kaufmann-Boll et al. (2020). Darüber hinaus erfolgten im Zeitraum des Vorhabens eine Anfrage durch einen Vertreter des Umweltbundesamtes (UBA) (Dr. Marc Marx, Fachgebiet II 2.7 „Bodenzustand und europäischer Bodenschutz“) an die zuständigen Landesbehörden im Jahr 2018 sowie eine Umfrage des Landesamtes für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein (Dr. Eckhard Cordsen) im Jahr 2021, die in Absprache mit dem Auftraggeber für das vorliegende Vorhaben genutzt werden konnten. Diese ergaben zusätzliche Informationen zu den bodenbiologischen Datenerhebungen, die derzeit auf den BDF durchgeführt werden. Eine zusammenfassende Übersicht über die in den einzelnen Bundesländern erhobenen bodenbiologischen Parameter findet sich in Tabelle 1 sowie eine nähere Beschreibung der verwendeten Methoden in Tabelle 2.

Daraus geht hervor, dass bislang in 11 der 16 Bundesländern bodenbiologische Daten erhoben wurden. In allen Fällen wurden die Regenwürmer beprobt sowie (mit Ausnahme von Bayern) mikrobielle Parameter (in der Regel Basalatmung und Biomasse) erhoben. In sechs Bundesländern wurden bislang auch Enchytraeiden untersucht. Lediglich in Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz erfolgte bereits eine Untersuchung der Collembolen sowie in Nordrhein-Westfalen, Sachsen-Anhalt und Schleswig-Holstein die Datenerhebung zu Enzymaktivitäten im Boden.

Es kamen in den meisten Fällen die gleichen international standardisierten Methoden zum Einsatz. Die Enchytraeiden wurden stets gemäß DIN EN ISO 23611-3 inklusive Nassextraktion nach Graefe in Dunger & Fiedler (1998) untersucht. In Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz kam für die Erfassung der Lumbriciden im Unterschied zu der sonst üblichen Kombination aus Handauslese und Formalin-Austreibung (DIN EN ISO 23611-1) die Elektrofing-Methode zum Einsatz, entweder in Kombination mit Handauslese (BW) oder vergleichend mit der (nicht näher spezifizierten) Senfmethode (RP). Für die mikrobiellen Parameter Biomasse und Stickstoff wurden in der Regel das Durchflussverfahren nach Domsch 1962, beschrieben bei Heinemeyer et al. (1989), gemäß DIN EN ISO 16072 (Basalatmung), die substrat-induzierte Respiration nach Anderson & Domsch (1978) gemäß (Biomasse) bzw. die Chloroform Fumigation-Extraktion gemäß DIN ISO 14240-2 (Biomasse, Stickstoff) angewendet. Ausnahmen bildeten hier Mecklenburg-

Vorpommern bzw. Nordrhein-Westfalen, die hierfür auf das Methodenhandbuch des Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e. V. (VDLUFA; Basal-atmung, Biomasse) bzw. die (mittlerweile zurückgezogene) DIN 19737 (Basal-atmung) verwie-sen.

Tabelle 1: Bodenbiologische Datenerhebungen auf BDF in den Bundesländern Deutschlands

Bundesland	Collem-bola	Enchy-traeidae	Lumbri-cidae	Mikrobielle Pa-rameter	Enzymaktivität (ver-schiedene)
Brandenburg			X	X	
Berlin	Keine BDF				
Baden-Württemberg	X		X	X	
Bayern			X		
Bremen	Keine BDF				
Hamburg		X	X	X	
Hessen	Keine bodenbiologischen Erhebungen				
Mecklenburg-Vor-pommern			X	X	
Niedersachsen		X	X	X	
Nordrhein-Westfa-len		X	X	X	X
Rheinland-Pfalz	X	X	X	X	
Saarland	Keine bodenbiologischen Erhebungen				
Sachsen	Keine bodenbiologischen Erhebungen				
Sachsen-Anhalt			X	X	X
Schleswig-Holstein		X	X	X	X
Thüringen		X	X	X	

Tabelle 2: Übersicht über die im bodenbiologischen Monitoring in den Bundesländern verwendeten Methoden basierend auf einer Umfrage des Landesamtes für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein im Jahr 2021

Bundesland	Organismen- gruppe	Parameter	Methode	Richtlinie
Brandenburg	Lumbricidae	Abundanz, Bio- masse	Handauslese und Formalin-Austreibung	DIN EN ISO 23611-1
	Mikroorganis- men	Basalatmung	Durchflussverfahren nach Domsch 1962, beschrieben bei Heinemeyer et al. (1989)	DIN EN ISO 16072
		Biomasse	Substrat-induzierte Respiration nach Anderson & Domsch (1978), Heinemeyer et al. 1989	DIN ISO 14240-1
Baden-Württem- berg	Collembola	Abundanz	Austreibung (Wärme/Trockenheit)	Keine Angabe
	Lumbricidae	Abundanz, Bio- masse	Elektrofang mit Handauslese	Keine Angabe
	Mikroorganis- men	Biomasse	Substrat-induzierte Respiration nach Anderson & Domsch (1978)	DIN ISO 14240-1
Bayern	Lumbricidae	Abundanz, Bio- masse	Regenwurmaustreibung mit 0,2 %-iger Formaldehydlösung; danach seit 2010 mit ergän- zender Handauslese auf einem Teil der Austreibungsstelle	DIN EN ISO 23611-1
Hamburg	Enchytraeidae	Abundanz	Nassextraktion nach Graefe in Dunger & Fiedler (1998)	DIN EN ISO 23611-3
	Lumbricidae	Abundanz, Bio- masse	Handauslese und Formalin-Austreibung	DIN EN ISO 23611-1
	Mikroorganis- men	Basalatmung	Durchflussverfahren nach Domsch 1962, beschrieben bei Heinemeyer et al. (1989)	DIN EN ISO 16072
		Biomasse	Substrat-induzierte Respiration nach Anderson & Domsch (1978)	DIN ISO 14240-1

Bundesland	Organismen- gruppe	Parameter	Methode	Richtlinie
		Biomasse, Stickstoff	Chloroform – Fumigation-Extraktion	DIN ISO 14240-2
Mecklenburg-Vorpommern	Lumbricidae	Abundanz	Hausmethode Agrar- und Umweltanalytik GmbH Jena; Oberboden: Handauslese; Unterboden: Formalinaustreibung	Keine Angabe
	Mikroorganismen	Basalatmung	Methodenhandbuch VDLUFA Nr. 4.3.1	Keine Angabe
		Biomasse	Weckglas-Test mit Glukosezusatz, Methodenhandbuch VDLUFA Nr. 6.3	Keine Angabe
Niedersachsen	Enchytraeidae	Abundanz	Nassextraktion nach Graefe in Dunger & Fiedler (1998)	DIN EN ISO 23611-3
	Lumbricidae	Abundanz, Biomasse	Handauslese und Formalin-Austreibung	DIN EN ISO 23611-1
	Mikroorganismen	Basalatmung	Durchflussverfahren nach Domsch 1962, beschrieben bei Heinemeyer et al. (1989)	DIN EN ISO 16072
		Biomasse	Substrat-induzierte Respiration nach Anderson & Domsch (1978), Heinemeyer et al. 1989	DIN ISO 14240-1
Nordrhein-Westfalen	Enchytraeidae	Abundanz	Nassextraktion nach Graefe in Dunger & Fiedler (1998)	DIN EN ISO 23611-3
	Lumbricidae	Abundanz, Biomasse	Handauslese und Formalin-Austreibung	DIN EN ISO 23611-1
	Mikroorganismen	Arginin-Ammonifikation	Alef & Kleiner (1987)	Keine Angabe
		Dehydrogenase-Aktivität	Keine Angabe	DIN 19733-1

Bundesland	Organismen- gruppe	Parameter	Methode	Richtlinie
Rheinland-Pfalz		Basalatmung	Sapromat, O ₂ -Verbrauch	DIN 19737
		Biomasse	Substrat-induzierte Respiration, Sapromat, O ₂ -Verbrauch, Schinner et al. (1993)	DIN ISO 14240-1
	Collembola	Abundanz	Schätzung der Bodenfaunadichte aus Bodenstechproben mittels Kempson-Methode	Keine Angabe
	Enchytraeidae	Abundanz	Nassextraktion nach Graefe in Dunger & Fiedler (1998)	DIN EN ISO 23611-3
	Lumbricidae	Abundanz	Vergleichend mit der Senf- und Elektrofangmethode	Keine Angabe
	Mikroorganismen	Basalatmung	Keine Angabe	Keine Angabe
		Biomasse, Stickstoff	Chloroform – Fumigation-Extraktion	DIN ISO 14240-2
Schleswig-Holstein	Enchytraeidae	Abundanz	Nassextraktion nach Graefe in Dunger & Fiedler (1998)	DIN EN ISO 23611-3
	Lumbricidae	Abundanz, Biomasse	Handauslese und Formalin-Austreibung	DIN EN ISO 23611-1
	Mikroorganismen	Arginin-Ammonifikation	Alef & Kleiner (1987)	Keine Angabe
		Basalatmung	Durchflussverfahren nach Domsch 1962, beschrieben bei Heinemeyer et al. (1989)	DIN EN ISO 16072
		Biomasse, Stickstoff	Chloroform – Fumigation-Extraktion	DIN ISO 14240-2

Bundesland	Organismen- gruppe	Parameter	Methode	Richtlinie
		Biomasse	Substrat-induzierte Respiration nach Anderson & Domsch (1978), Heinemeyer et al. 1989	DIN ISO 14240-1
Sachsen-Anhalt	Lumbricidae	Abundanz	Handauslese und Formalin-Austreibung	DIN EN ISO 23611-1
	Mikroorganismen	Katalase-Aktivität	Beck (1971)	Keine Angabe
		Basalatmung	Durchflussverfahren nach Domsch 1962, beschrieben bei Heinemeyer et al. (1989)	DIN EN ISO 16072
		Biomasse	Substrat-induzierte Respiration nach Anderson & Domsch (1978), Heinemeyer et al. 1989	DIN ISO 14240-1
		β -Glucosidase-Aktivität	Hoffmann & Dedeken (1965)	Keine Angabe
Thüringen	Enchytraeidae	Abundanz	Nassextraktion	DIN EN ISO 23611-2
	Lumbricidae	Abundanz, Biomasse	Handauslese und Formalin-Austreibung	DIN EN ISO 23611-1
	Mikroorganismen	Basalatmung	Durchflussverfahren nach Domsch 1962, beschrieben bei Heinemeyer et al. (1989)	DIN EN ISO 16072
		Biomasse	Substrat-induzierte Respiration nach Anderson & Domsch (1978)	DIN ISO 14240-1

3.1.2 Landwirtschaftliche Dauerfeldversuche (DFV) / Boden als nachhaltige Ressource für die Bioökonomie („BonaRes“)

Bei den landwirtschaftlichen Dauerfeldversuchen (DFV) in Deutschland handelt es sich nicht um ein zentral organisiertes Monitoringprogramm. Vielmehr bilden die von verschiedenen Einrichtungen betriebenen und ursprünglich zu ganz unterschiedlichen Fragestellungen (vor allem Düngung, aber auch Bodenbearbeitung, Ökolandbau, etc.) eingerichteten Versuchsstandorte ein loses Netzwerk mit dem gemeinsamen Ziel der langfristigen Untersuchung des Einflusses landwirtschaftlicher Bewirtschaftungspraktiken auf die natürliche Ressource Boden. Dementsprechend heterogen sind die in den einzelnen DFVs erhobenen Daten, die Informationen über bestehende DFVs sind verstreut, und die Forschungsdaten sind nicht leicht zugänglich. Eine Initiative, die darauf abzielt, die DFVs besser zu vernetzen und gemeinsam auszuwerten ist die vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderte Förderinitiative „BonaRes“. Durch „BonaRes“ geförderte Forschungsarbeiten (derzeit zehn interdisziplinäre Projektverbünde und das „BonaRes“-Zentrum) haben zum Ziel, die Leistungs- und Ertragsfähigkeit des Bodens langfristig zu sichern und sofern möglich zu steigern. Die DFVs sind im Zusammenhang von „BonaRes“ definiert als landwirtschaftliche Experimente mit einer Mindestdauer von 20 Jahren in einem statischen Design und Forschung im Zusammenhang mit nachhaltiger Bodennutzung und Erträgen. Diese sollen genutzt werden, um Veränderungen der Bodeneigenschaften und der Erträge, wie sie z. B. durch den Klimawandel verursacht werden, zu erkennen. Es wurden insgesamt 205 DFVs identifiziert, die der obigen Definition entsprachen. Davon sind 140 DFVs aktuell noch laufend. Die Landnutzung ist in 168 DFVs Ackerbau, in 34 Versuchen Grünland, in 2 Versuchen Gemüse und in einem Versuch Obstbau. Ackerbau-DFVs werden in Düngung- (158), Bodenbearbeitungs- (38) und Fruchtfolgeversuche (32; Mehrfachnennungen möglich) unterteilt, während alle Grünlandversuche (34) die Düngung betreffen (Grosse et al. 2020). In dem im Rahmen von „BonaRes“ veröffentlichten „Steckbrief zur Beschreibung von Dauerfeldversuchen“ sind als einzige bodenzoologische Parameter Regenwürmer (Arten, Abundanz, Biomasse) vorgesehen (Grosse et al. 2019), jedoch ist nicht klar, an wie vielen der DFVs eine regelmäßige Erfassung erfolgt. Weitere Details zu den DFVs sind in Kaufmann-Boll et al. (2020) enthalten.

3.1.3 Umweltprobenbank / Projekt TrendDNA

Basierend auf den Erfahrungen eines erfolgreichen Pilotprojektes wurde im Jahre 1985 die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) als eine Daueraufgabe des Bundes unter der Koordinierung des Umweltbundesamtes und seit 1986 unter der Gesamtverantwortung des Bundesumweltministerium ins Leben gerufen (Koschorreck et al. 2016). Die UPB ist ein wichtiger Teil der Umweltbeobachtung in Deutschland und liefert wissenschaftliche Grundlagen zur Planung und Kontrolle von Maßnahmen des Umwelt- und Naturschutzes. Hierbei stehen unter anderem die Fragen im Mittelpunkt des Interesses seit wann und wo eine bestimmte Chemikalie in der Umwelt gefunden wird, wie sich die Chemikalienbelastungen über die Zeit entwickelt, wie diese Entwicklungen zu bewerten sind und ob gesetzliche Maßnahmen erforderlich sind. Außerdem wird der Erfolg der in der Vergangenheit getroffenen gesetzlichen Regelungen überprüft und wie sich freiwillige Verichtsvereinbarungen der Industrie auswirken. Schließlich werden auch etwaige Veränderungen der Biodiversität bewertet. Die UPB dient damit zugleich auch dem vorsorgenden Umwelt- und Verbraucherschutz.

Die 14 Probenahmegebiete liegen in den sechs Hauptökosystemtypen Deutschlands:

- ▶ Agrar-Ökosysteme;
- ▶ Ballungsraumnahe Ökosysteme;
- ▶ Fließgewässer-Ökosysteme;
- ▶ Forst-Ökosysteme;
- ▶ Marine Ökosysteme;
- ▶ Naturnahe terrestrische Ökosysteme.

Sie berücksichtigen die unterschiedliche Intensität der anthropogenen Beeinflussung und Flächennutzung und sind dadurch in ihrer Gesamtheit für die Umweltsituation in Deutschland weitgehend repräsentativ. Die Probenarten ermöglichen die Erfassung räumlicher und zeitlicher Belastungen und bieten Informationen über die Gesamtsituation in den unterschiedlichen Probenahmegebieten. Sie besitzen eine Indikatorfunktion für die unterschiedlichen Stufen der Nahrungskette und Schadstoffklassen, wobei zwischen vier verschiedenen Probenarten unterschieden wird:

- ▶ Limnische Proben: Schwebstoffe und tierische Proben aus Flüssen und Seen;
- ▶ Marine Proben: Proben von Meerestieren, Meerespflanzen und Seevögeln;
- ▶ Terrestrische Proben: Proben an Land lebender Tiere und an Land wachsender Pflanzen sowie Boden;
- ▶ Humanproben: Körperflüssigkeiten und Haare vom Menschen.

Die erfassten Parameter sind biometrische und anamnestische Kenngrößen und Stoffe oder Stoffgruppen, die entweder den physiologischen Grundzustand oder toxische oder kanzerogene Bedingungen beschreiben. Weitere Details zur UPB sind in Kaufmann-Boll et al. (2020) enthalten.

Bodenproben werden seit 2002 an 12 Standorten in 9 Probenahmegebieten im Abstand von 4 Jahren genommen. In dem vom Umweltbundesamt geförderten Projekt „TrendDNA – Genetische Untersuchungen zur biologischen Vielfalt mit der Umweltprobenbank“ (Laufzeit: 2021 – 2025) werden unter anderem Veränderungen in der Zusammensetzung und Funktion von Bodengemeinschaften über 20 Jahre hinweg anhand von Proben aus der UPB untersucht. Als Ansatz wird Shotgun-Metagenomik verwendet, die Daten über die Taxonomie und die ungefähren Biomasseverhältnisse aller Bodengruppen, von Bakterien bis zu Wirbeltieren, liefern soll. Im Rahmen des Projekts werden alle 12 UPB-Standorte in 5 Zeithorizonten seit Beginn der Bodenbeprobungskampagnen untersucht. Zusätzlich wird auch mit Metatranskriptomik experimentiert, die Informationen über die Aktivität von Organismen anstelle von Biomasse liefert (pers. Mittl., Prof. Dr. Miklós Bálint, Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, 02. Mai 2022).

3.1.4 „Soil Biodiversity Observation Network“ (Soil BON)

Die Soil BON Monitoring Plattform ist am Deutschen Zentrum für integrative Biodiversitätsforschung Halle-Jena-Leipzig, einem Forschungszentrum der Deutschen Forschungsgemeinschaft angesiedelt. Als globales Netzwerk zur Beobachtung der biologischen Vielfalt des Bodens arbeitet diese Gruppe mit der „Global Soil Biodiversity Initiative“ und anderen globalen und regionalen Partnern zusammen, um bodenbiologische und ökosystemare Beobachtungen zur Verfügung

zu stellen, die erforderlich sind, um sicherzustellen, dass die lebenden Bodenressourcen nachhaltig erhalten und bewirtschaftet werden und die grundlegenden menschlichen Bedürfnisse erfüllen können. Die Partner von Soil BON vertreten eine Reihe von Interessengruppen, darunter Forscher, Pädagogen und politische Berater aus dem akademischen, staatlichen und privaten Sektor. Ziel ist es, multinationale Partner und Initiativen weltweit zu vernetzen, um die biologische Vielfalt des Bodens zu verstehen, zu dokumentieren, wie sie sich verändert, wie sich diese Veränderungen auf Menschen auswirken, die für ihr Wohlergehen und ihren Lebensunterhalt auf die lebenden Ressourcen des Bodens angewiesen sind, und wie eine nachhaltige Nutzung von Ökosystemen die biologische Vielfalt des Bodens schützen kann. Soil BON zielt darauf ab, die Entwicklung einer globalen Gemeinschaft für die Beobachtung, das Verständnis und die Vorhersage der biologischen Vielfalt des Bodens zu unterstützen. Es ist ein Forum für die Vernetzung von Gruppen, um Methoden zur Beobachtung der biologischen Vielfalt des Bodens, einschließlich der Integration von Informationen über räumliche, zeitliche und taxonomische Maßstäbe hinweg, voranzutreiben. Dazu gehört auch der Aufbau von Kapazitäten von der Beobachtung bis zur Informatik und die Unterstützung bei der Integration vorhandener und neuer Felddaten nach vereinbarten internationalen Standards.

3.1.5 „EU Soil Observatory“ (EUSO) / „Land Use and Coverage Area frame Survey“ (LUCAS)

Die Vision der Europäischen Kommission für das EUSO (Europäische Kommission 2021) ist, dass es innerhalb der nächsten zwei Jahre zum wichtigsten Anbieter von Referenzdaten und Wissen auf EU-Ebene für alle bodenrelevanten Themen werden soll. Das EUSO soll sowohl die EU-Forschung und -Innovation im Bereich Böden unterstützen als auch davon profitieren und gleichzeitig das gesellschaftliche Bewusstsein für den Wert und die Bedeutung der Böden für das Leben der Bürger schärfen. Um diese Vision und diesen Auftrag zu verwirklichen, wurden für das EUSO fünf Hauptfunktionen vorgeschlagen:

1. Unterstützung der Entwicklung eines operationellen EU-weiten Bodenüberwachungssystems;
2. Einrichtung eines EU-Boden-Dashboards, das den Zustand der Bodengesundheit und Trends bei Belastungen, die die Bodengesundheit beeinflussen, widerspiegelt;
3. Weitere Konsolidierung und Verbesserung der Kapazität und Funktionalität des Europäischen Boden Datenzentrums („European Soil Data Centre“; ESDAC), um den sich entwickelnden Wissensbedarf und innovative Datenströme zu unterstützen;
4. Unterstützung von Forschung und Innovation durch die Umsetzung der Horizon Europe-Mission für Bodengesundheit und Lebensmittel;
5. Bereitstellung eines offenen und integrativen Forums, das die Bemühungen um einen gesellschaftlichen Wandel in der Wahrnehmung des Bodens unterstützt.

Das EUSO wird am „Joint Research Centre“ (JRC) im Rahmen seiner regulären institutionellen Arbeit zur Unterstützung des Europäischen Green Deal (insbesondere der EU-Bodenstrategie) und der Horizon Europe-Mission für Bodengesundheit und Ernährung angesiedelt. Es wird auf dem bestehenden ESDAC aufbauen, das seit über einem Jahrzehnt vom JRC betrieben wird. Für die Unterstützung der Entwicklung eines harmonisierten EU-weiten Bodenüberwachungssystems soll das derzeitige LUCAS-Bodenprogramm (Orgiazzi et al. 2018) mit nationalen oder regionalen Bodenüberwachungsaktivitäten integriert werden. Durch die Umsetzung der EU-Bodenstrategie und des Arbeitsprogramms der Bodenmission soll das EUSO die Mitgliedstaaten bei der Einrichtung und dem Betrieb nationaler oder regionaler Überwachungssysteme unterstützen, um den Austausch von harmonisierten Informationen über den Zustand der Böden anhand

von Indikatoren, die auf EU-Ebene integriert werden sollen, zu unterstützen. Die Ergebnisse der Bodenüberwachung sollen an das ESDAC weitergeleitet werden.

Im Jahr 2018 erfolgte erstmalig als Teil der LUCAS-Bodenerhebung die bislang umfangreichste EU-Bewertung der biologischen Vielfalt des Bodens auf der Grundlage von DNA-Metabarkodierung. Hierfür wurden 1000 Punkte ausgewählt. Die Analyse bezog sich auf die folgenden Merkmale: Bakterien und Archaea (16S mitochondriale ribosomale Desoxyribonukleinsäure; 16S rDNA), Pilze (Internal Transcribed Spacer'), Eukaryoten (18S mitochondriale rDNA), Mikrofauna (Nematoden), Mesofauna (Arthropoden), Makrofauna (Regenwürmer) und Metagenomik. Für das Jahr 2022 ist geplant, zunächst erneut Biodiversitäts- und genetischen Bewertungen für dieselben 1000 Punkte wie im Jahr 2018 durchzuführen (Jones et al. 2021):

- ▶ Wiederholung von DNA-Analysen für den Biodiversitätsindex;
- ▶ Identifizierung von Schlüsselgenen für eine funktionale Bewertung der Biodiversität (z. B. Ökosystemleistungen, wie Stickstoffkreislauf, Zersetzung usw.);
- ▶ Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen.

1000 zusätzliche Punkte sollen für die weitere Untersuchung der Bodenbiodiversität ausgewählt werden, wobei Standorte mit hohem Druck auf die biologische Vielfalt (aufgrund von landwirtschaftlicher Intensität, geringer organischer Kohlenstoffgehalt, Verdichtung, Erosion, Verschmutzung) berücksichtigt werden sollen, um die Dynamik der zeitlichen Veränderungen besser zu verstehen. Als Parameter für den Artenreichtum bzw. die genetische Vielfalt wurden neben DNA-/Metagenomik-Analysen die Untersuchung der Ribonukleinsäure (RNA), Meso- und Makrofauna-Analysen und die mikrobielle Atmung vorgeschlagen (Jones et al. 2021).

3.2 Kenntnisstand zur Bodenbiodiversität

Eine umfassende aktuelle Übersicht über den Kenntnisstand zur Bodendiversität geben die von der Europäischen Kommission bzw. dem JRC herausgegebenen Atlanten zur Bodenbiodiversität (Jeffery et al. 2010, Orgiazzi et al. 2016) sowie insbesondere ein 2020 veröffentlichter Bericht der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO 2020). In diesem wird auch ausführlich auf den Beitrag von Bodenorganismen zu Ökosystemfunktionen und -dienstleistungen und die Beeinflussung von Bodeninvertebraten durch abiotische und biotische Faktoren sowie Landnutzung eingegangen.

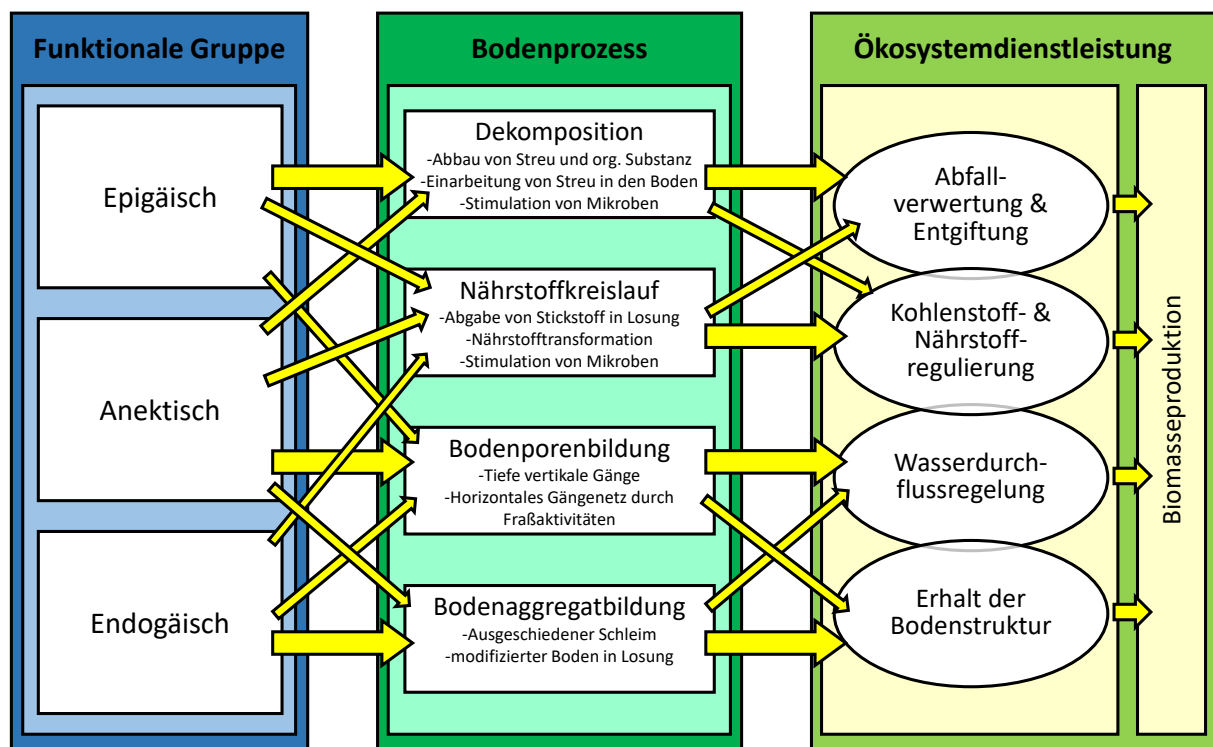
3.2.1 Beitrag von Bodenorganismen zu Ökosystemfunktionen und -dienstleistungen

Bodenfunktionen beziehen sich auf natürliche biologische Prozesse, während Ökosystemdienstleistungen („Ecosystem Services“) solche Funktionen beschreiben, die zum menschlichen Wohlergehen beitragen. Neben dem Einfluss externer Faktoren wie Bodenausgangsmaterial, Klima oder Topographie wird das Vermögen des Bodens, seine Funktionen zu erfüllen und Leben aufrecht zu erhalten von Bodenorganismen gewährleistet, die in komplexen Nahrungsnetzen interagieren (de Ruiter et al. 1994). Ein zentraler, komplexer ökosystemarer Prozess, der mehrere Bodenfunktionen umfasst und vom gesamten Boden-Nahrungsnetz getragen wird, ist der Abbau organischen Materials. Die vier wesentlichen auf der biologischen Vielfalt basierenden Bodenfunktionen sind die Kohlenstoffumwandlung, der Nährstoffkreislauf, die Bildung der Bodenstruktur und die Regulierung der biologischen Vielfalt (Kibblewhite et al. 2008). Sie bestimmen die Gesundheit des Bodens, erhalten die Ökosystemprozesse im Boden aufrecht, beeinflussen die oberirdische Vielfalt und tragen zur Klimaregulierung bei und bilden gleichzeitig die Grundlage für regulierende (z. B. Abfluss von Oberflächenwasser), unterstützende (z. B. Bodenbildung, Nährstoffkreislauf) und bereitstellende (z. B. von Nahrung) Ökosystemdienstleistungen, die für

das menschliche Wohlergehen unerlässlich sind (z. B. Jeffery et al. 2010, Bardgett & van der Putten 2014, Orgiazzi et al. 2016). Bodenorganismen können in funktionale Gruppen eingeordnet werden, um ihre Rolle innerhalb des Nahrungsnetzes bezüglich ökosystemarer Funktionen besser zu verstehen, z. B. basierend auf morphologischen oder ökologischen Charakteristika („Traits“) wie Ernährungsweise, Form, Größe oder trophische Ebene.

Ein Beispiel für eine funktionale Gruppierung von Bodenorganismen ist die Einteilung von Regenwürmern in die drei ökologischen Gruppen epigäischer (Streubewohner), endogäischer (Flachgräber/Bodenfresser) und anektischer (Tiefgräber) Lebensformtyp (Bouché 1977). Wie funktionale Gruppen von Regenwürmern über ihren Beitrag zu wesentlichen Bodenprozessen verschiedene Ökosystemdienstleistungen beeinflussen, skizzieren Keith & Robinson (2012; Abbildung 2): Epigäische Arten erleichtern vor allem die Zerkleinerung von Streu und den Abbau von organischem Material an der Oberfläche, steigern dabei aber auch die Nährstoffumwandlung und stimulieren die mikrobielle Aktivität. Anektische Regenwürmer beeinflussen ebenfalls die Zersetzung und den Nährstoffkreislauf, indem sie oberirdische Streu in das Bodenprofil einbringen, haben aber wohl den größten Einfluss auf die Porosität des Bodens durch ihre Tunnelaktivitäten und ihre tiefen vertikalen Gänge. Diese können eine Tiefe von 1 bis 2 m erreichen, wodurch die Wasserinfiltration in den tieferen Boden verbessert wird. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Sequestrierung von organischem Kohlenstoff in der Auskleidung ihrer Höhlen erhöht wird (Don et al. 2008). Endogäische Arten spielen als Bodenfresser eine Schlüsselrolle bei der Bildung von Bodenaggregaten. Das horizontale Gängenetz der Regenwürmer, das durch ihre Fraßaktivitäten entsteht, erhöht ebenfalls die Porosität, und die Nährstoffe werden aus ihren Ausscheidungen freigesetzt. Die Anwesenheit von Regenwürmern wirkt sich durch die Kombination der von ihnen beeinflussten bodenbezogenen Prozesse im Allgemeinen positiv auf die Ökosystemdienstleistungen aus. Die funktionelle Vielfalt und Aktivität der Regenwürmer unterstützt eine große Spannbreite von Ökosystemdienstleistungen, z. B. Abfallverwertung und Entgiftung, Kohlenstoffspeicherung, Regulierung des Wasserflusses und Aufrechterhaltung der Bodenstruktur, und all dies trägt zur Biomasseproduktion bei, wie in Abbildung 2 dargestellt. Die Regulierung der biologischen Vielfalt kann sich indirekt aus den Auswirkungen der Regenwürmer auf Bodenprozesse ergeben, durch Förderung anderer nützlicher Bodenorganismen oder durch eine verbesserte Nährstoffaufnahme der Pflanzen. Regenwürmer haben möglicherweise einen dominanten Einfluss auf diese Bodenprozesse und Ökosystemdienstleistungen, aber sie wirken nicht allein. Daher bedarf es eines besseren Verständnisses der gemeinsamen und einzigartigen Beiträge der verschiedenen Gruppen von Bodenorganismen zur Bereitstellung von Ökosystemdienstleistungen.

Abbildung 2: Wichtige Pfade, über die funktionale Gruppen von Regenwürmern bodenbezogene Prozesse und Ökosystemleistungen beeinflussen. Die Dicke der Pfeile steht für die relative Bedeutung (Keith & Robinson 2012)



Quelle: Basierend auf Keith & Robinson (2012) (neu gezeichnet und übersetzt)

3.2.2 Beeinflussung von Bodeninvertebraten durch anthropogene abiotische und biotische Faktoren sowie Landnutzung

Die Bodenbiodiversität ist durch den Einfluss verschiedener anthropogener abiotischer und biotischer Faktoren sowie Landnutzung einer hohen Gefährdung ausgesetzt. Eine Übersicht über die wesentlichen Bedrohungen, ihre Treiber und Auswirkungen auf die Böden sowie ihr Einfluss auf die Bodenbiodiversität gibt Tabelle 3. Die größten Bedrohungen für die Bodenbiodiversität werden durch vom Menschen verursachte Veränderungen hervorgerufen, und die negativen Auswirkungen können durch die synergetischen und additiven Effekte, die zwischen solchen Bedrohungen auftreten können, verstärkt werden (FAO 2020).

Tabelle 3: Die wichtigsten anthropogenen Bedrohungen für die Bodenbiodiversität (FAO 2020)

Bedrohung	Treiber und Auswirkungen auf die Böden	Einfluss auf die Bodenbiodiversität
Entwaldung	<ul style="list-style-type: none"> • Änderung der Landnutzung; • Verlust von organischer Substanz im Boden und Nährstoffen; • Veränderungen der physikalischen Bodeneigenschaften; • Störung von geeignetem Lebensraum; • Veränderungen des pH-Werts. 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust spezialisierter Arten und Zunahme von Generalisten-Taxa; • Rückgang räuberischer Arten; • Geringere Boden- und funktionelle Vielfalt; • Erholung könnte Jahrzehnte dauern.
Intensivierung der Landwirtschaft	<ul style="list-style-type: none"> • Stärkerer Einsatz von externen Einträgen (Pestizide, Düngemittel) und stärkere Beeinträchtigung des Bodens; • Größeres Risiko der Bodenerosion, Verunreinigung, Bodenverschlechterung, Verdichtung und Versalzung; • Veränderung der hydrologischen und biogeochemischen Kreisläufe; • Beeinträchtigung der Bodenstruktur; • Verlust organischer Substanz im Boden. 	<ul style="list-style-type: none"> • Verringerung der biologischen Vielfalt im Boden; • Kleinere und weniger komplexe unterirdische Nahrungsnetze; • Erholung der Bodengemeinschaften kann Jahre/Jahrzehnte dauern; • Weniger effiziente und funktionelle Nahrungsnetze im Boden; • Verlust von Bodenkohlenstoff und Nährstoffen durch Auswaschung.
Nährstoff-Ungleichgewichte	<ul style="list-style-type: none"> • Veränderung der Verfügbarkeit essenzieller Nährstoffe; • Übermäßiger Einsatz von Mineraldüngemitteln. 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduziert die Wachstumsfähigkeit von Mikroorganismen im Boden; • Verringert den Nährstofffluss durch das Nahrungsnetz des Bodens; • Veränderung des Nährstoffgehalts von Primärproduzenten und Streueinträgen.
Versauerung	<ul style="list-style-type: none"> • Unzureichende Düngung; • Schadstoffe; • Veränderungen in der Zusammensetzung der Pflanzengemeinschaft; • Veränderungen der Löslichkeit mehrerer Elemente in Böden. 	<ul style="list-style-type: none"> • Veränderung der Umwelt wo Bodenorganismen gedeihen; • Beeinträchtigung der Aktivität von Organismen, die am Stickstoffkreislauf beteiligt sind; • Veränderung der Nahrungsnetze im Boden; • Veränderungen der Nährstoffverfügbarkeit und Toxizität für Mikroorganismen.
Versalzung	<ul style="list-style-type: none"> • Beeinträchtigung der Wasseraufnahme durch Veränderungen der chemischen und physikalischen Bodeneigenschaften; • Bewässerung mit Brackwasser; • Eindringen von Salzwasser aufgrund Erschöpfung der Grundwasserleiter; • Ungeeignete Bewässerungspraktiken. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ionen-Ungleichgewicht und Nährstoffmangel verringern mikrobielle Funktionen und Biomasse; • Verschiebung in der Zusammensetzung von mikrobiellen, mikro- und mesofaunalen Gemeinschaften.
Verschmutzung	<ul style="list-style-type: none"> • Mikroplastik; • Ausbringung von Düngemitteln; • Persistente organische Schadstoffe; • Biozide und Pestizide; • Abfallentsorgung. 	<ul style="list-style-type: none"> • Akute und chronische Toxizität für Bodenbiota; • Kaskadeneffekte von einzelnen Arten auf Gemeinschaften und Ökosystemfunktionen; • Bioakkumulation in der Nahrungskette.

Bedrohung	Treiber und Auswirkungen auf die Böden	Einfluss auf die Bodenbiodiversität
Verdichtung	<ul style="list-style-type: none"> • Verringert das Makroporenvolumen; • Erhöht den Widerstand gegen Durchwurzelung; • Verringert die Wasserinfiltration und erhöht den Abfluss; • Beeinflusst die Sauerstoff- und CO₂-Flüsse sowie das Redoxpotential. 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust von Lebensraum und Porenräumen für Bodenbiota; • Beeinträchtigung der Aktivität der Fauna; • Rückgang der faunalen Biomasse und Populationsdichte.
Urbanisation	<ul style="list-style-type: none"> • Bodenversiegelung, erhöhter Wasserabflusses und reduzierte Infiltration; • Verschmutzung; • Abtragen oder Ersetzen von Mutterboden, Eintrag anthropogener Materialien. 	<ul style="list-style-type: none"> • Weniger Lebensraum für Bodenbiota, zunehmende räumliche Heterogenität und Fragmentierung; • Veränderung der Bodengemeinschaften und der Dynamik des Nahrungsnetzes; • Drastische Veränderung der Umwelt, in der Bodenorganismen leben.
Oberflächenversiegelung	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhter Wasserabfluss und reduzierte Infiltration; • Verändert den Nährstoff- und Kohlenstoffkreislauf; • Beeinflusst Klima- und Mikroklimaregulierung; • Bau von Straßen und anderen dauerhaften Infrastrukturen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust von Lebensräumen für Bodenorganismen.
Brände	<ul style="list-style-type: none"> • Waldbrände; • Anthropogenes Abbrennen zur Landrodung; • Entfernung organischer Substanz des Oberbodens. 	<ul style="list-style-type: none"> • Schwere Schädigung der biologischen Vielfalt im Oberboden; • Wiederbesiedlung, mit Verschiebung von einer bakterien- zu einer pilzgesteuerten Gemeinschaft; • Rückgang der Abundanz, Biomasse und Vielfalt von Bodenprotisten und wirbellosen Tieren; • Sehr langsame Erholung der Makroinvertebratenvielfalt und funktionalen Struktur (Jahrzehnte).
Erosion und Erdrutsche	<ul style="list-style-type: none"> • Ablösung, Transport und Ablagerung von Bodenpartikeln durch Wasser oder Wind; • Verlust organischer Substanz und Veränderungen der physikalischen und chemischen Eigenschaften; • Entstehung von degradierten und angereicherten Ablagerungsumgebungen. 	<p>Bewohner der oberen Bodenschichten können beseitigt oder verdrängt werden;</p> <p>Verlust von Lebensraum und Verschlechterung seiner Qualität für Bodenlebewesen;</p> <p>Ausbreitung von Schädlingen und Krankheitserregern;</p> <p>Verringerte Bodenbiodiversität und Funktion.</p>
Verlust von organischem Kohlenstoff/ organischer Substanz	<ul style="list-style-type: none"> • Verminderung von: <ul style="list-style-type: none"> - Bildung und Stabilisierung von Aggregaten; - Kationenaustauschkapazität; - Wasserinfiltration und -rückhalt; - Bodenfruchtbarkeit und C-Sequestrierung. 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringere mikrobielle Biomasse und Vielfalt (insbesondere in extremen Umgebungen); • Weniger Ressourcen für Nahrungsnetze im Boden.

3.3 Metabarcoding der Bodenfauna

Die Charakterisierung und Überwachung biologischer Gemeinschaften ist eine zentrale Aufgabe bei der Bewertung der Qualität und Gesundheit von Ökosystemen. Es gibt jedoch entscheidende Wissenslücken über den Erhaltungszustand der meisten Bodenorganismen und über die Auswirkungen von Naturschutzmaßnahmen auf Bodensysteme. Bislang basieren die meisten Bewirtschaftungsentscheidungen auf der Grundlage der Bodenchemie (z. B. Bodenkohlenstoff) oder der physikalischen Eigenschaften (z. B. Bodenerosion), und wenn sie in Betracht gezogen werden, konzentrieren sich die Ziele zur Erhaltung der biologischen Vielfalt im Boden auf Pflanzen und oberirdische Tiere (Guerra et al. 2021).

Unterirdische Bodenorganismen wie Oligochäten, Collembolen, Nematoden, Pilze und Bakterien sind jedoch für eine Kaskade von Bodenfunktionen verantwortlich, die wichtige Ökosystemleistungen wie Klimaregulierung und Bodenfruchtbarkeit gewährleisten (Bardgett & Van Der Putten 2014). Als solche müssen sie bei der Ausweisung von Schutzgebieten und bei der Festlegung geeigneter Schutzprioritäten und -maßnahmen ausdrücklich berücksichtigt werden (Guerra et al. 2021).

Leider kann eine Ausweitung des Monitorings auf ein breiteres Spektrum von Taxa eine große Investition von Zeit und Ressourcen bedeuten, insbesondere in großen Gebieten mit hoher biologischer Vielfalt. Zum Beispiel verlässt sich das Monitoring von Bodeninvertebraten traditionell auf die visuelle Bestimmung der Zielarten anhand eindeutiger morphologischer Merkmale und das Zählen von Individuen im Feld oder Labor. Dieser Überwachungsansatz ist arbeitsintensiv, oft auf eine begrenzte Anzahl von Organismengruppen konzentriert und in der Regel durch die Notwendigkeit spezieller Probenahmetechniken und taxonomischen Fachwissens begrenzt (Aylagas et al. 2016, Thomsen & Willerslev 2015). Zusätzliche Faktoren, wie z. B. die große kryptische Vielfalt, die häufige morphologische Stasis, das Fehlen diagnostischer Merkmale in juvenilen Stadien und das so genannte taxonomische Hindernis¹, machen die Identifizierung wirbelloser Taxa besonders schwierig, fehleranfällig und in hohem Maße von der Erfahrung des Forschers abhängig (Pearson et al. 2011, Yu et al. 2012). Daher wird in der Regel eine kleine Anzahl gut untersuchter Arten als Indikatoren verwendet, um Rückschlüsse auf Auswirkungen von Umweltveränderungen auf die Gesamtvielfalt abzuleiten, was möglicherweise die Diagnose der spezifischen Faktoren, die ein Ökosystem beeinflussen, behindert.

Daher besteht eine wachsende Nachfrage nach alternativen und effizienten Techniken, die dazu beitragen können, die Ergebnisse zu verbessern und die Kosten für routinemäßige und groß angelegte Monitoringprogramme zu senken. Die DNA-basierte Bewertung der biologischen Vielfalt birgt das Potenzial, viele der mit Standarduntersuchungsansätzen verbundenen Herausforderungen zu umgehen, weil sie in Bezug auf Kosten und Zeitaufwand erschwinglich ist, taxonomisch umfassender und weniger abhängig von taxonomischem Fachwissen ist (Baird & Hajibabaei 2012, Ji et al. 2013, Perring et al. 2015).

Die im letzten Jahrzehnt durchgeführten Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass DNA-basierte Ansätze eine effiziente und zuverlässige Quelle für Biodiversitätsinformationen für eine Vielzahl von Organismengruppen in terrestrischen, Süßwasser- und Meeresökosystemen sind (z. B. Elbrecht et al. 2017, Gibson et al. 2015, Hajibabaei et al. 2011, Leray & Knowlton 2015, Pansu et al. 2015). Insbesondere die Analyse von eDNA, gekoppelt mit einer genomischen Analysetechnik, die als DNA-Metabarcoding bezeichnet wird, hat bereits begonnen, die Art und Weise zu revolutionieren, wie Kosten und Aufwand für die Überwachung reduziert werden können, und wird in

¹ ‚Taxonomical impediment‘: Der weltweite Mangel an wichtigen taxonomischen Informationen, die Lücken in taxonomischem Wissen und der Mangel an ausgebildeten Taxonomen und Kuratoren.

den kommenden Jahren wahrscheinlich zu einem wichtigen ‚Werkzeugkasten‘ für die Überwachung der biologischen Vielfalt werden.

3.3.1 Was ist Gemeinschafts-DNA (comDNA)?

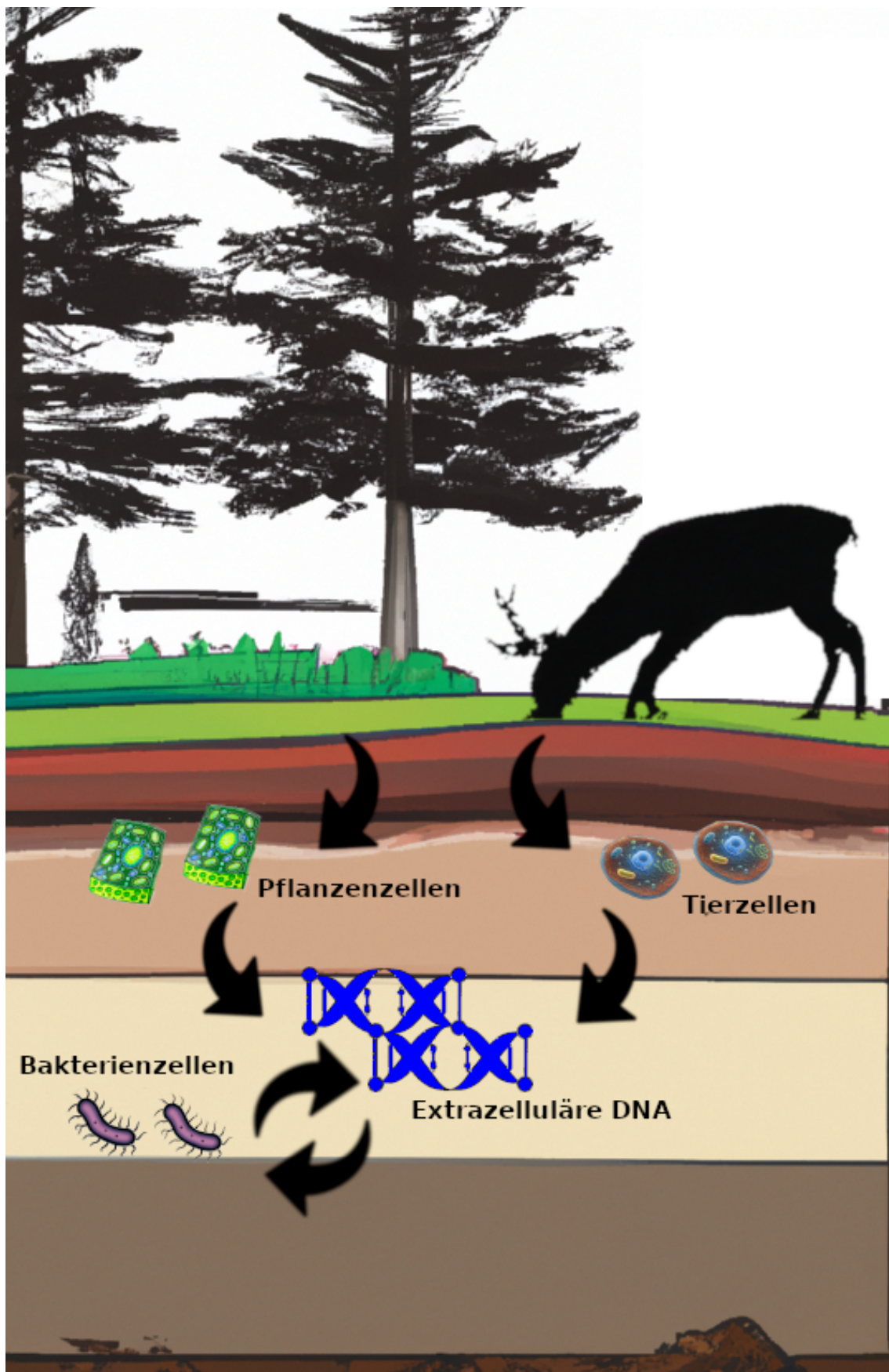
Gemeinschafts-DNA (comDNA) bedeutet Gewebe-Mischproben, die zuvor aus dem Boden extrahierte und morphologisch identifizierte Individuen oder Teile davon enthalten.

3.3.2 Was ist Umwelt-DNA (eDNA)?

Umwelt-DNA (eDNA) kann definiert werden als „eine komplexe Mischung genomischer DNA von vielen verschiedenen Organismen, die in einer Umweltprobe gefunden wird“ (Taberlet et al. 2018). Da Arten mit der Umwelt interagieren, geben sie kontinuierlich DNA an ihre Umgebung ab. Bei höheren Organismen kann diese DNA von sich zersetzenden Organismen, abgestoßenen Epidermiszellen und Haaren sowie Körpersekreten (z. B. Fäkalien, Urin, Gameten) stammen (Cristescu & Hebert 2018, Thomsen & Willerslev 2015). Die DNA von mikrobiellen Organismen (Prokaryonten und mikrobielle Eukaryonten) kann dagegen von ganzen lebenden Organismen stammen, die in den Proben vorhanden sind (Abbildung 3).

Die Tatsache, dass DNA von höheren Organismen in der Umwelt verbleibt und dort entnommen, extrahiert und sequenziert werden kann, war im letzten Jahrzehnt ein großer technologischer und wissenschaftlicher Durchbruch. Die Analyse und Identifizierung von eDNA ermöglicht es festzustellen, ob ein Organismus in der Umwelt vorhanden ist oder war, ohne dass der Organismus selbst gefangen werden muss. In Verbindung mit Hochdurchsatz DNA-Sequenzierungstechnologien kann die Analyse von eDNA potenziell Informationen über ganze biologische Gemeinschaften in einer einzigen Probe liefern, das Vorhandensein einer bestimmten Indikatorart nachweisen oder das Screening funktioneller Gene in einer bestimmten Umgebung.

Abbildung 3: Quellen von eDNA in Böden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL, in Anlehnung an Pedersen et al. (2015)

3.3.2.1 Vorteile

Wie bereits dargelegt, haben Methoden zur Überwachung der biologischen Vielfalt auf der Grundlage von eDNA einige klare Vorteile gegenüber den traditionellen, auf Morphologie basierenden Ansätzen:

- ▶ **Geringerer Überwachungsaufwand und geringere Kosten:** Ein wichtiges Merkmal der eDNA-basierten Methoden ist, dass die Umweltproben, die für die Analyse benötigt werden, im Allgemeinen schneller und technisch unkomplizierter zu sammeln sind als biotische Daten (z. B. Ficetola et al. 2008). Daher kann die eDNA-Analyse von besonderem Interesse sein, wenn traditionelle Probenahmeverfahren ressourcenintensiv sind.
- ▶ **Erhöhte Empfindlichkeit:** Die direkte Analyse von DNA aus der Umwelt ermöglicht den Nachweis von Organismen, die andernfalls nur schwer zu beproben wären (z. B. kleine, seltene oder schwer erfassbare Arten), oder die Identifizierung kryptischer Arten, die nur schwer von eng verwandten Arten zu unterscheiden sind, Larven- und Juvenilstadien sowie degradierter Exemplare (Biggs et al. 2015, Holdaway et al. 2017, Jerde et al. 2011). Dies ermöglicht die Einbeziehung zahlreicher Arten in Biodiversitätserfassungen, die mit herkömmlichen Methoden, die auf der direkten Beobachtung von Exemplaren beruhen, kaum untersucht werden können. Diese Arten, die traditionell in Verzeichnissen fehlen, können einen erheblichen Teil der Vielfalt einer biologischen Gemeinschaft ausmachen, stehen oft an der Basis der Nahrungskette und können früh auf Umweltstörungen reagieren.
- ▶ **Geringere Umweltbeeinträchtigung und Invasivität:** Die eDNA-Analyse ist eine nicht-invasive Methode, die keinen Fang und keine Handhabung von Arten erfordert, wodurch das Risiko einer Schädigung der untersuchten Arten oder Lebensräume, die untersucht werden, reduziert wird (Valentini et al. 2016).
- ▶ **Kosten und Zeiteffizienz:** Die Gesamtkosten der eDNA-Probenahme und -Analyse hängen von der Zielart ab, und daher kann nicht allgemein gesagt werden, dass sie in jedem Fall effizienter ist als herkömmliche Techniken (Smart et al. 2016). Allerdings haben mehrere Studien in den letzten Jahren über kürzere Bearbeitungszeiten und geringere Kosten von Biodiversitätserhebungen auf der Grundlage von eDNA berichtet (Biggs et al. 2015, Ji et al. 2013, Sigsgaard et al. 2015). Dies gilt insbesondere dann, wenn die Umweltproben verwendet werden, um Informationen von mehreren Arten zu erhalten, die zu verschiedenen taxonomischen Gruppen gehören und unterschiedliche Probenahmeverfahren erfordern. Darüber hinaus ermöglicht die Möglichkeit, mehrere Mischproben (über 200) in einem einzigen Lauf einer Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungsplattform (wie beim DNA-Metabarcoding-Ansatz) unterzubringen, die Verarbeitung von Hunderten von Proben in Wochen statt in Monaten, was die Kosten und die Dauer der Analyse pro Probe substantiell reduziert.
- ▶ **Standardisierung:** Auch wenn die Umsetzung von eDNA-basierten Analysen in regulären Bio-monitoring-Programmen noch Benchmarking und methodische Optimierung erfordert (Cristescu & Hebert 2018), kann die Sammlung von Umweltproben an verschiedenen Probenahmeorten und zu verschiedenen Probenahmezeiten auf sehr standardisierte Weise erfolgen (Thomsen & Willerslev 2015). Dies ist eine Herausforderung bei traditionellen Überwachungsprogrammen, bei denen die Datenerhebung hauptsächlich von den taxonomischen Kenntnissen und der Erfahrung des Personals abhängt, das die Untersuchungen durchführt. Darüber hinaus, und in der Regel im Gegensatz zu den direkten Beobachtungsdaten, auf die sich die traditionelle Überwachung stützt, können die Ergebnisse der eDNA-Analysen von unabhängigen Parteien verifiziert und geprüft werden (Yu et al. 2012).

3.3.2.2 Fallstricke

Wie alle Probenahme- und Analysetechniken ist auch die eDNA-Analyse mit Schwierigkeiten verbunden, die vor Beginn eines Biomonitoring-Projekts berücksichtigt werden müssen. Pilotstudien, die die Art der Lebensräume, die beprobt werden müssen, die Zieltaxa und die Fragen, die beantwortet werden müssen, berücksichtigen, sind immer erforderlich, um a priori fundierte Entscheidungen über den optimalen methodischen Ansatz zu treffen (Dickie et al. 2018).

Im Gegensatz zur konventionellen Feldforschung ist bei der Verwendung von eDNA zum Nachweis einer Zielart die tatsächliche Beobachtung der Organismen selbst nicht erforderlich. Daher ist es von größter Bedeutung, strengen Protokollen und validierten Methoden zu folgen. Dies gilt für Feldarbeit, Probenkonservierung, Nasslaborverfahren und bioinformatische Analysen. Das Verstehen der potenziellen Fehlerquellen und die Umsetzung geeigneter Maßnahmen zu deren Vermeidung oder Korrektur in jedem Schritt der Analyse sind entscheidend für zuverlässige Ergebnisse.

Wie in Abbildung 4 zusammengefasst, ist jede eDNA-Studie mit potenziellen Fehlern behaftet:

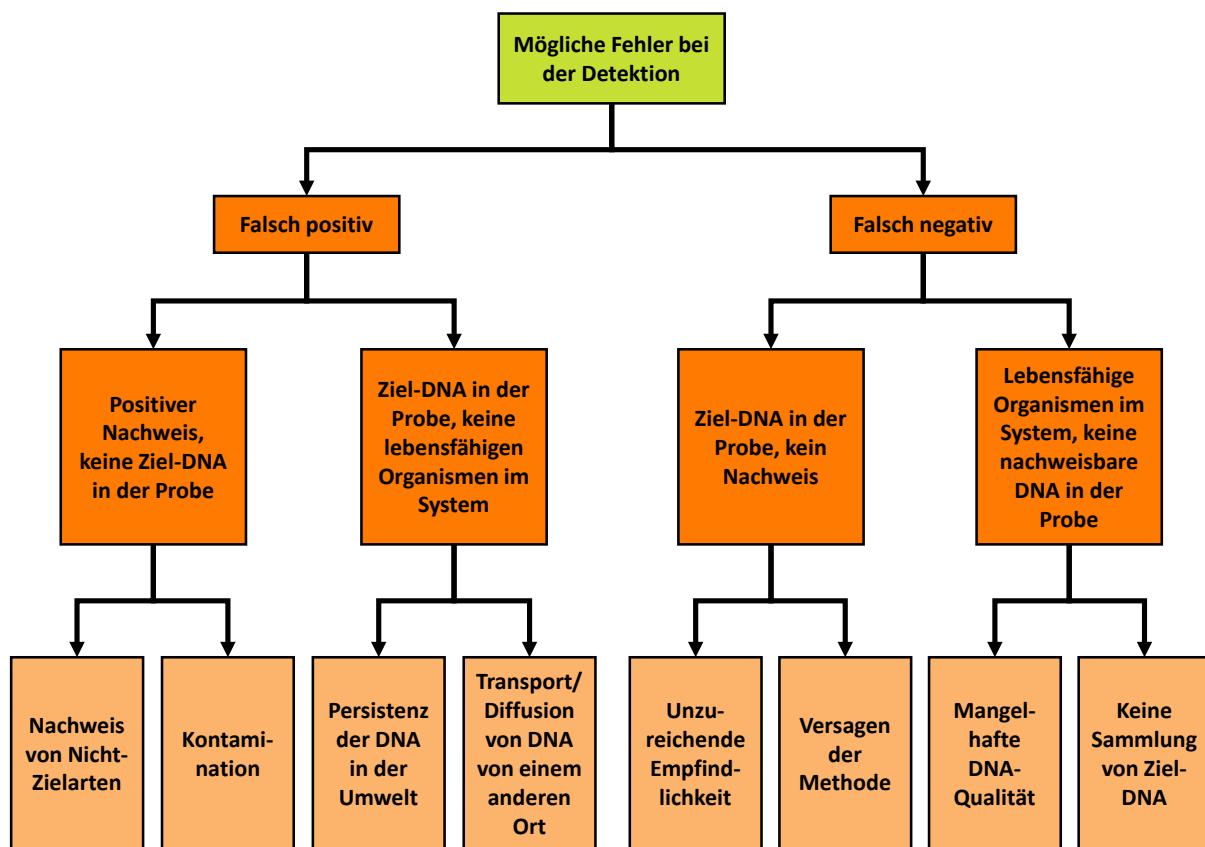
- ▶ **Kontamination:** Der größte Fallstrick bei der eDNA-Analyse ist das Risiko der Kontamination und folglich der Erzielung falsch positiver Ergebnisse (d. h. der Nachweis einer Zielart, die in einer Probe tatsächlich nicht vorhanden ist). Eine Kontamination der Proben kann von der Probenentnahme im Feld bis zu jedem Schritt der Nasslaborexperimente auftreten, entweder durch exogene DNA oder durch Verschleppung der Proben. Werden beispielsweise mehrere Orte nacheinander im Feld beprobt, besteht die Gefahr, dass unbeabsichtigt DNA von einem Ort auf einen anderen übertragen wird. Daher sollten die Feldarbeiter gut über die Kontaminationsrisiken aufgeklärt werden und strenge Richtlinien befolgen, um eine Kreuzkontamination zwischen Proben und Probenahmestandorten zu vermeiden. Eine Kontamination im Labor ist besonders problematisch, da bei der eDNA-Analyse häufig die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt wird. Die PCR erzeugt Milliarden von Kopien von DNA-Molekülen, die leicht in das gesamte Labormaterial und die Ausrüstung übertragen werden können. Die extreme Empfindlichkeit der PCR und die Fähigkeit von Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungsplattformen, Tausende von Sequenzen pro Probe zu gewinnen, bedeuten, dass selbst Spuren von Verunreinigungen im endgültigen Datensatz enthalten sein können. Daher ist es unerlässlich, die Probenkontamination durch Einbeziehung von Feld-, DNA-Extraktions- und PCR-Negativkontrollen zu überwachen und das Vorhandensein eines bestimmten Taxons in unabhängigen technischen Replikaten zu überprüfen, bevor der Nachweis dieses Taxons als positiv angesehen wird (Thomsen & Willerslev 2015).
- ▶ **Falsch-negative Ergebnisse:** Falsch-negative Ergebnisse (Nichtnachweis einer Art, wo sie vorhanden ist) sind ein großes Problem bei Analysen, die auf die Identifizierung seltener, gefährdeter oder invasiver Arten abzielen (Goldberg et al. 2016), da sie zu einer Unterschätzung des Vorkommens einer Art führen können. Wenn es nicht gelingt, eDNA von einer Zielart zu gewinnen, kann dies an ihrer geringen Populationsdichte (und damit an einer begrenzten Menge an eDNA in der Probe), an einem hohen Grad an Degradation der eDNA, aber auch an methodischen Einschränkungen liegen, wie z. B. an einer unzureichenden Probenahme oder einem unzureichenden Probenahmeaufwand, an einer geringen Effizienz der DNA-Extraktion oder an einer PCR-Hemmung. Letzteres kann bei Bodenproben besonders schwerwiegend sein, weil Huminsäuren, die in diesen Proben zusammen mit DNA extrahiert werden, das in PCR-Reaktionen verwendete Enzym zur Amplifikation hemmen (Matheson et al. 2010). Falsch-negative Ergebnisse lassen sich durch eine Erhöhung des Analyseaufwands reduzieren, z. B. Erhöhung der Anzahl der Proben pro Fundort, Analyse mehrerer DNA-Extrakte pro Probe und Durchführung von PCR technischen Wiederholungen. Wenn möglich,

ist es auch ratsam, Positivkontrollen einzubeziehen (d. h. Proben, die DNA der Zielart in guter Qualität enthalten), um sicherzustellen, dass das gesamte analytische Protokoll ordnungsgemäß durchgeführt wurde (Cristescu & Hebert 2018).

- ▶ Persistenz von eDNA in der Umwelt: Damit eDNA in der Praxis des Biodiversitätsmonitorings eingesetzt werden kann, ist es von größter Bedeutung, dass die Ergebnisse den aktuellen Zustand eines Ökosystems widerspiegeln (Thomsen & Willerslev 2015). Wenn die DNA in der Umwelt verbleibt, nachdem die Zielart verschwunden oder ausgestorben ist, könnte dies zu falsch positiven Ergebnissen führen. Die Persistenz von eDNA variiert um mehrere Größenordnungen zwischen verschiedenen Umweltproben, abhängig von den Umweltbedingungen, unter denen die DNA konserviert wird. Im Allgemeinen verlangsamen kalte und trockene Bedingungen den DNA-Abbau stark, während warme und feuchte Bedingungen den Abbau rasch fördern (Willerslev & Cooper 2005). Daher kann eDNA in der Umwelt von Wochen in gemäßigten Gewässern (Dejean et al. 2011) bis zu Tausenden von Jahren in kaltem, trockenem Permafrost (Willerslev et al. 2003) überdauern. Die Persistenz von DNA in Böden ist weniger gut erforscht, aber mehrere Studien haben gezeigt, dass ein geringer Anteil der DNA viel länger bestehen kann als in aquatischen Umgebungen (z. B. Willerslev et al. 2014, Yoccoz et al. 2012). Daher kann es schwierig sein, festzustellen, ob eine detektierte Art aktuell vorhanden ist, oder ob die eDNA aus älteren Quellen stammt. Wenn das Ziel einer eDNA-Monitoring-Erhebung darin besteht, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandene biologische Vielfalt zu ermitteln, wird empfohlen, die Probenahme auf die Bodenoberfläche zu beschränken, da dies das Risiko des Nachweises von Relikt-DNA verringern kann, da die DNA ausgewaschen (Andersen et al. 2012) oder mit der Zeit abgebaut wird (Levy-Booth et al. 2007).
- ▶ Räumliche Verteilung von eDNA: Eine weitere wichtige Problematik der Analyse von eDNA für die Überwachung der biologischen Vielfalt ist die Möglichkeit, vagabundierende eDNA zu beproben (d. h. DNA einer Art, die nicht an einem Probenahmeort ansässig ist), die aus Quellen wie von Raubtieren ausgeschiedener Beute-DNA, vorübergehender Anwesenheit von Individuen oder aus dem Transport oder der Diffusion von anderen Orten stammt. Während der Transport von eDNA über große Entfernungen in fließenden Gewässern und in der Meeresumwelt möglich ist (Thomsen et al. 2012), ist die Ausbreitung oder Diffusion von eDNA in Böden und Sedimenten im Allgemeinen eine unbedeutende Möglichkeit (Jerde et al. 2013). Dies verringert die Wahrscheinlichkeit, 'falscher' Nachweisergebnisse, beeinträchtigt aber umgekehrt die Effizienz der eDNA-Analyse in Böden, da die Proben genau an der Stelle entnommen werden müssen, an dem die Organismen ihre DNA freigesetzt haben.
- ▶ Schätzung der Populationsdichte und -struktur: In eDNA-Studien wurden zwei Näherungswerte verwendet, um den Zusammenhang zwischen der Abundanz von Arten und der eDNA-Menge zu schätzen: absolute Quantifizierung (Takahara et al. 2012, Thomsen et al. 2012) oder Anzahl positiver Proben (Biggs et al. 2015, Dejean et al. 2011). Die Beziehung zwischen der Menge an eDNA in einer Umgebung und den Dichten der Zielarten unter natürlichen Bedingungen wurde in mehreren Studien untersucht, wobei die Ergebnisse variierten: von positiven Beziehungen (Biggs et al. 2015, Evans et al. 2016, Thomsen et al. 2012) bis hin zu gar keiner Korrelation (Dejean et al. 2011, Mahon et al. 2013). Dies erklärt sich wahrscheinlich durch einige der oben genannten Faktoren, wie die DNA-Persistenz und -Verteilung in der Umwelt, die Effizienz der DNA-Extraktion oder die PCR-Hemmung. Außerdem wird die DNA-Menge in einer Probe eher von der Biomasse der Organismen beeinflusst als von der Populationsdichte (Andersen et al. 2012). Andere Faktoren wie das saisonale Laichen (De Souza et al. 2016) oder unterschiedliche DNA-Abgaberraten zwischen Organismen können die Fähigkeit zur Schätzung der Abundanzen von Populationen reduzieren (Dunn et al. 2017). Und

schließlich wird die Menge der eDNA in den Proben auch stark von der Probenahmestrategie beeinflusst (Herder et al. 2014): Da eDNA oft ungleichmäßig in der Umwelt verteilt ist, kann eine große Menge DNA in einer Probe einfach darauf zurückzuführen sein, dass die Probe zufällig in der Nähe eines Individuums gesammelt wurde; sie steht also nicht unbedingt im Zusammenhang mit hohen Populationsdichten. Diese Verzerrung ist auch bei traditionellen Monitoringansätzen häufig, bei denen es möglich ist, zufällig viele Individuen zu fangen, selbst bei niedrigen Populationsdichten, was zu ungenauen Annahmen über hohe Populationsdichten führt. Insgesamt ist es schwierig, genaue Schätzungen der Populationsdichte anhand von Schätzungen der DNA-Menge in Umweltproben zu erhalten. Werden die Proben jedoch in ähnlichen Lebensräumen und zu ähnlichen Jahreszeiten mit denselben Probenahmeprotokollen entnommen, kann es möglich sein, relative Abundanzunterschiede zu erkennen.

Abbildung 4: Mögliche Fehler bei falsch-positiven und falsch-negativen Nachweisen bei eDNA-Analysen



Quelle: Basierend auf Herder et al. (2014) (neu gezeichnet und übersetzt)

3.3.3 DNA-Metabarcoding als Instrument zur Untersuchung biologischer Gemeinschaften

3.3.3.1 Was ist DNA-Metabarcoding?

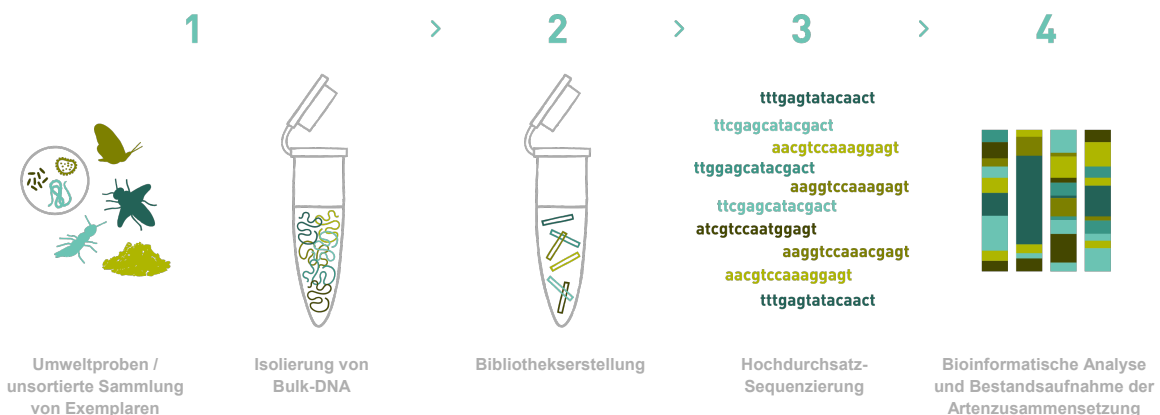
Das DNA-Metabarcoding ist eine Erweiterung des weit verbreiteten DNA-Barcoding-Ansatzes, bei dem eine kurze und standardisierte genomische Region (der DNA-Barcode) für die Identifizierung auf Artniveau verwendet wird (Hebert et al. 2003). Die DNA-Barcode-Region ist idealerweise innerhalb einer Art konserviert, aber variabel zwischen verschiedenen (sogar eng verwandten) Arten. Daher dient ihre Sequenz als artspezifische genetische Markierung. Die DNA-Barcode-Region wird aus genomischer DNA mit zwei kurzen Oligonukleotiden (Primern), die

komplementär zu flankierenden Sequenzen der Zielregion sind, in einem als Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bezeichneten Verfahren amplifiziert. Das PCR-Produkt wird mit der Sanger-Technologie sequenziert, und die resultierende Sequenz wird mit einer Referenzdatenbank mit DNA-Barcodes von Exemplaren mit bekannter Identität verglichen, um die passende Art zu finden.

In den letzten Jahren haben die stetig sinkenden Kosten und die jüngsten Entwicklungen der Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien (HTS) die Möglichkeit eröffnet, Tausende von DNA-Barcodes, die in einer Probe vorhanden sind, in einer einzigen Sequenzierungsreaktion parallel zu sequenzieren, was als DNA-Metabarcoding bezeichnet wird (Taberlet et al. 2012b). Während also beim DNA-Barcoding jedes Exemplar einzeln analysiert und identifiziert wird, ermöglicht das DNA Metabarcoding die automatische Identifizierung von mehreren Arten aus einer einzigen Probe. Die Probe kann entweder eine Massensammlung von Organismen (z. B. Fallenproben) oder eine eDNA-Probe sein (ohne vorherige Isolierung der Zielorganismen) (Taberlet et al. 2012b, Yu et al. 2012). Obwohl ursprünglich auf dem Gebiet der Mikrobiologie entwickelt, ist das DNA-Metabarcoding auch erfolgreich bei Untersuchungen von Pilz-, Pflanzen- und Tiergemeinschaften (z. B. Bik et al. 2012, Ji et al. 2013, Bohmann et al. 2014, Pawlowski et al. 2014, Cordier et al. 2021 und darin enthaltene Verweise).

Beim DNA-Metabarcoding wird die DNA in großen Mengen aus der gesamten Probe extrahiert, kurze DNA-Barcodes von mehreren Arten werden mit universellen Primern vervielfältigt, die dann in einer Sequenzierungsplattform der nächsten Generation sequenziert werden. Die Millionen von Proben-Reads werden mit Hilfe spezieller Bioinformatik-Pipelines qualitätsgefiltert und in Clustern in ‚Operational Taxonomic Units‘ (OTUs) oder ‚Amplicon Sequence Variants‘ (ASVs) geclustert und mit einer Referenzdatenbank mit DNA-Barcodes gut charakterisierter Arten zur taxonomischen Zuordnung verglichen (Abbildung 5).

Abbildung 5: Arbeitsablauf beim DNA-Metabarcoding



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

3.3.3.2 Anwendungen

Die Möglichkeit der gleichzeitigen Identifizierung mehrerer Organismen aus einem breiten Spektrum phylogenetischer Gruppen in ein und derselben Probe, macht das DNA-Metabarcoding zu einem leistungsfähigen Instrument zur Charakterisierung biologischer Gemeinschaften. Tatsächlich wurde das DNA-Metabarcoding in den letzten Jahren zunehmend für das Umwelt-Bio-monitoring eingesetzt (Deiner et al. 2017, Gibson et al. 2015, Seymour et al. 2020). Mehrere Studien haben auch gezeigt, dass das DNA-Metabarcoding in der Lage ist, taxonomische Informationen akkurat wiederzugeben (Carew et al. 2013, Ji et al. 2013, Lanzén et al. 2021, Santi et al.

2021), um den ökologischen Zustand von terrestrischen und aquatischen Lebensräumen zu beurteilen (Chariton et al. 2015, Cordier et al. 2017, Pansu et al. 2015, Vasselon et al. 2017, Yang & Zhang 2020), und um neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung und Struktur komplexer biologischer Gemeinschaften zu erlangen (Bush et al. 2019, Zhang et al. 2018). Darüber hinaus werden DNA-Metabarcoding-Daten bereits zur Berechnung von biotischen Indizes verwendet, die zur Bestimmung des ökologischen Qualitätsstatus von Meeres- und Süßwasserökosystemen dienen (Aylagas et al. 2018, Elbrecht et al. 2017), und es gibt noch weiteres Potenzial für die Entwicklung neuer molekularer Metriken und Indizes, die in naturschutzrelevante Entscheidungen einbezogen werden können (Bruce et al. 2021, Pawlowski et al. 2018, Seymour et al. 2020).

3.3.3.3 Technische Herausforderungen

Der DNA-Metabarcoding-Ansatz umfasst mehrere Labor- und Datenanalyseschritte, von denen jeder mit technischen Herausforderungen verbunden ist, die berücksichtigt werden müssen, um eine genaue taxonomische Schlussfolgerung zu gewährleisten:

1. Auswahl eines geeigneten DNA-Barcode-Markers: Die Genauigkeit des DNA-Metabarcoding hängt in hohem Maße von der als DNA-Barcode ausgewählten genomischen Region ab (z. B. Deagle et al. 2014, Kirse et al. 2021). Idealerweise sollte der DNA-Barcode-Marker eine hohe Sequenzvariabilität aufweisen, um eine Unterscheidung auf Artniveau zu ermöglichen, aber auch konservierte flankierende Regionen aufweisen, um die Entwicklung universeller Primer zu ermöglichen (die die DNA-Barcode-Region in einem breiten Spektrum von Arten amplifizieren können). Darüber hinaus sollte die Amplikon-Größe kurz genug sein, um auf den üblichen HTS-Plattformen sequenziert zu werden (d. h. zwischen 60 und 450 Basenpaaren (bp) im Falle der Illumina-Sequenzierplattformen), und es sollten taxonomisch validierte und umfassende Referenzdatenbanken für die taxonomische Zuordnung der gewonnenen Reads verfügbar sein. Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass es keinen perfekten DNA-Barcode-Marker gibt (Kirse et al. 2021). Stattdessen sollte die Markerauswahl sorgfältig geprüft und für jede Studie spezifisch gestaltet werden (Marquina et al. 2019).
2. Primerdesign und potenzielle Amplifikationsverzerrungen: Wie bereits erwähnt, sind gut konzipierte Universalprimer für die Zielorganismengruppe ein entscheidender Faktor für die optimale Durchführung einer DNA-Metabarcoding-Analyse. Fehlanpassungen an den Primer-Bindungsstellen, insbesondere am oder in der Nähe des 3'-Primerendes, können zu falsch-negativen Ergebnissen (d. h. zum Nichtnachweis einiger in der Probe vorhandener Taxa aufgrund geringer Primerspezifität) und zu uneinheitlichen Amplifikationserfolgswerten bei den verschiedenen taxonomischen Gruppen führen (Clarke et al. 2014). Daher sollte das Primerdesign sorgfältig bewertet und für die spezifischen taxonomischen Gruppen, die untersucht werden, optimiert werden. Außerdem wird die extrazelluläre eDNA (d. h. freie DNA, die sich außerhalb der Zellmembranen befindet und z. B. nach dem Zelltod freigesetzt wird) in der Regel stark in Fragmente von oft weniger als 150 bp abgebaut (Bienert et al. 2012), so dass das Primerdesign entsprechend angepasst werden muss. Für das DNA-Metabarcoding von Bakterien und Pilzen ist dies kein ernsthaftes Problem, da Mikroorganismen oft in relativ hohen Dichten vorkommen und daher wahrscheinlich ganze (lebende) Individuen in den Proben vorhanden sind. Daher ist die DNA-Qualität von Mikroorganismen oft hoch. Die eDNA größerer Organismen liegt jedoch entweder als freie extrazelluläre oder intrazelluläre DNA vor, und daher ist es wichtig, dass die ausgewählten Primer auf einen kurzen DNA-Barcode, der aus abgebauter extrazellulärer DNA amplifiziert werden kann, abzielen.
3. Validierung der Datenqualität: Sequenzierungsplattformen mit hohem Durchsatz erzeugen für jedes durch PCR amplifizierte DNA-Molekül eine riesige Anzahl von Reads, was

die Auswirkungen von Sequenzierungsartefakten auf die Zuverlässigkeit der DNA-Metabarcoding-Ergebnisse noch verstärken kann (z. B. De Barba et al. 2014, Glenn 2011). Zu diesen Artefakten gehören PCR- und Sequenzierungsfehler, Chimären, Verunreinigungen und Kreuzkontaminationen von Probensequenzen im Zusammenhang mit dem Multiplexen von Bibliotheken (das sogenannte Mistagging-Phänomen, Esling et al. 2015). Es wurden verschiedene bioinformatische Filterstrategien zur Entfernung von Sequenzartefakten vorgeschlagen, darunter: In-silico-Vorhersage von chimären Sequenzen mithilfe spezieller Software (Bjørnsgaard Aas et al. 2017), Festlegung willkürlicher Schwellenwerte für die Kopienzahl, um Sequenzen mit geringer Häufigkeit im gesamten Datensatzes zu entfernen, und Verwerfen seltener Sequenzen, die einer sehr häufigen Sequenz in einer Probe nahe sind (für einen Überblick siehe Alberdi et al. (2018)). Die Anerkennung dieser Fehlerquellen und die systematische Validierung der Datenqualität bei jeder DNA-Metabarcoding-Analyse ist daher von entscheidender Bedeutung, um die Auswirkungen fehlerhafter Sequenzen zu minimieren und gleichzeitig die echten, aber weniger häufigen Sequenzen zu erhalten.

4. Taxonomische Zuordnung der Reads: Der letzte Schritt des DNA-Metabarcoding besteht im Abgleich der Lesungen mit DNA-Barcodes in Referenzdatenbanken zur taxonomischen Identifizierung. Daher sind die Qualität und Umfang der Referenzdatenbank für die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Taxonidentifizierung entscheidend. Lücken und Fehlidentifikationen in den Referenzdatenbanken können die taxonomische Zuordnung der OTUs/ASVs, die durch DNA-Metabarcoding nachgewiesen wurden, beeinträchtigen. Selbst wenn die üblicherweise in DNA-Metabarcoding-Studien verwendeten Referenzdatenbanken, wie z. B. die „Barcode of Life Database“ (BOLD; Ratnasingham & Hebert 2007) oder „GenBank“ ständig aktualisiert werden, können einige geografische Regionen und taxonomische Gruppen immer noch untercharakterisiert sein. Daher ist es möglich, dass einige der durch DNA-Metabarcoding nachgewiesenen Taxa nicht auf Artniveau, sondern nur auf höheren taxonomischen Rängen (Gattung, Familie, Ordnung usw.) identifiziert werden.
5. Quantifizierung der Taxonhäufigkeit: Eine große Herausforderung beim DNA-Metabarcoding ist die quantitative Analyse der HTS-Reads. Mehrere DNA-Metabarcoding-Studien haben nämlich Diskrepanzen zwischen der Anzahl der Read-Zählungen und der Artenhäufigkeit in einer Probe festgestellt (Lamb et al. 2019, Piñol et al. 2019). Dieser Mangel an Korrelation kann entweder durch technische Verzerrungen bei der DNA-Extraktion, PCR-Amplifikation, Sequenzierung und bioinformatischen Sortierung oder durch biologische Faktoren wie die Schwankungen in der Anzahl der Genkopien (Bik et al. 2012, Weber & Pawlowski 2014) erklärt werden. Wie bereits erläutert, können beispielsweise Taxa, die keine Mismatches in den Primerbindungsregionen enthalten, bevorzugt amplifiziert werden, wodurch ihre relative Häufigkeit in der Probe verzerrt wird. Daher liefert das DNA-Metabarcoding nur Daten über das Vorhandensein bzw. Fehlen von Taxa für jede einzelne Probe. Umfasst die Analyse jedoch Proben mit einer ähnlichen taxonomischen Zusammensetzung, die nach denselben Protokollen gesammelt und verarbeitet wurden, können die DNA-Metabarcoding-Ergebnisse zum Vergleich der relativen Anteile der Arten in den Proben genutzt werden.

3.3.4 Einführung von eDNA-Analyse und Metabarcoding in das routinemäßige Biomonitoring

Ausgehend von der führenden Studie von Ficetola et al. (2008), die eDNA zum Nachweis invasiver amerikanischer Ochsenfrösche nutzte, hat die Forschung der letzten 15 Jahre die Leistungsfähigkeit von eDNA-basierten Analysen für den Nachweis spezifischer Arten und für eine

umfassende Bewertung der biologischen Vielfalt für eine Vielzahl von Umweltumgebungen und Taxa demonstriert. Die Vorteile der eDNA für den Nachweis von Arten in aquatischen Ökosystemen haben zu einer schnellen Akzeptanz in einigen Bereichen wie der aquatischen Biosicherheit und der Überwachung von invasiven, Indikator- oder bedrohten Arten geführt (Blattner et al. 2021, Geerts et al. 2018, Goldberg et al. 2013, Hosler 2017). Zu den frühen Anwendungen im Rahmen der behördlichen Überwachung gehörte der Nachweis von eDNA des asiatischen Karpfens in den USA (Jerde et al. 2013), eine Methode, die immer noch vom „United States Geological Survey“ eingesetzt wird, oder die Einführung von eDNA-Erhebungen für den geschützten Kammolch (Biggs et al. 2015) in nationalen Überwachungsprogrammen im Vereinigten Königreich seit 2014.

Obwohl sich viele dieser frühen Anwendungen auf den Nachweis einzelner Arten konzentrierten, haben die Fortschritte im DNA Metabarcoding in den letzten zehn Jahren die Fähigkeit von eDNA-Analysen zur Beschreibung ganzer Gemeinschaften von Organismen aus Massen- und Umweltproben erweitert. In den letzten Jahren wurde das eDNA-Metabarcoding zunehmend in verschiedenen Biomonitoring-Anwendungen eingesetzt, darunter die Überwachung der Biosicherheit (Pochon et al. 2017), die Bewertung von Umweltauswirkungen (Lanzén et al. 2016, Schenk et al. 2020) oder das Ökosystemmanagement (Gold et al. 2021).

Im Zuge des technologischen Fortschritts und der Erweiterung des Anwendungsspektrums wurde jedoch eine große Vielfalt an methodischen Ansätzen in allen Phasen des Metabarcoding-Arbeitsablaufs entwickelt, von der Probenahme im Feld über die Laborarbeit bis hin zur bioinformatischen Datenanalyse und -interpretation (Pawlowski et al. 2020). Dieses hohe Maß an methodischer Variabilität stellt eine Herausforderung für die Einführung von eDNA-Erhebungen in routinemäßige Monitoring-Anwendungen dar.

Ausgehend von diesen Unzulänglichkeiten wurden in den letzten Jahren mehrere internationale Projekte ins Leben gerufen, um Methoden zu standardisieren und sie in Monitoringprogramme zu integrieren (Loeza-Quintana et al. 2020, Pawlowski et al. 2020, Pilliod et al. 2019). Eine wichtige Initiative in Europa ist die DNAqua-Net EU COST Action (Leese et al. 2018), ein interdisziplinäres Netzwerk, das Akademiker, Regulierungsbehörden, Industrie und politische Entscheidungsträger zusammenbringen soll, mit dem Ziel, DNA-basierte Überwachungsinstrumente zur Bewertung des ökologischen Status aquatischer Ökosysteme in Übereinstimmung mit der Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/EG) und der Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie (2008/56/EG) zu etablieren. Im Jahr 2019 gründeten DNAqua-Net und das Europäische Komitee für Normung (CEN) eine neue, ständige Arbeitsgruppe innerhalb des Technischen Komitees für Wasseranalyse (CEN/TC 230), um die Entwicklung von Standards für die DNA-basierte Bewertung der aquatischen Biodiversität und deren Aufnahme in den rechtlichen Rahmen zu verfolgen.

Derzeit hinkt die Anwendung der eDNA-Analyse beim Umweltmanagement terrestrischer Ökosysteme der bei aquatischen Ökosystemen hinterher. In den letzten Jahren hat es jedoch vielversprechende Fortschritte gegeben. So setzt nun beispielsweise „LUCAS Soil“, ein gemeinsames Programm zwischen dem Europäischen Statistischen Amt, der Generaldirektion Landwirtschaft und der Gemeinsamen Europäischen Forschungsstelle, eDNA-Techniken ein, um die biologische Vielfalt der europäischen Böden zu beschreiben. „LUCAS Soil“ ist eine umfassende und regelmäßige Erhebung des Oberbodens, die in der gesamten EU durchgeführt wird, um politisch relevante Statistiken über die Auswirkungen der Landbewirtschaftung auf die Bodeneigenschaften zu erstellen. Im Jahr 2018 umfasste die LUCAS-Bodenerhebung zum ersten Mal die Bewertung der biologischen Vielfalt des Bodens auf der Grundlage von eDNA-Metabarcoding, das auf verschiedene taxonomische Gruppen wie Bakterien und Archaeen, Pilze, Nematoden, Arthropoden-Mesofauna und Regenwürmer abzielte (Orgiazzi et al. 2018). Ähnliche eDNA-basierte Projekte

zur Überwachung der biologischen Vielfalt wurden zum Beispiel in Australien (Bissett et al. 2016) oder Kanada (Edge et al. 2020) initiiert.

Neben der Standardisierung von Protokollen müssen auch andere spezifische Fragen angegangen werden, um die Akzeptanz von DNA-basierten Methoden zu fördern und das Vertrauen in ihre Verwendung im Rahmen der gesetzlichen Überwachung zu stärken. Dazu gehören nicht nur Qualitätssicherungsfragen im Zusammenhang mit Robustheit, Replizierbarkeit und Rückverfolgbarkeit, sondern auch praktische Beschränkungen, die Umweltmanager und Praktiker in Bezug auf Kosten, Logistik, Sicherheit und Benutzerfreundlichkeit zu beachten haben (Bruce et al. 2021, Helbing & Hobbs 2019). Damit die eDNA-Überwachung wirklich durchstarten kann, ist eine kontinuierliche Zusammenarbeit zwischen Forschern, Umweltmanagern und politischen Entscheidungsträgern erforderlich, um eine robuste und effiziente Anwendung von DNA-basierten Methoden für den operationellen Einsatz in großem Maßstab zu erreichen.

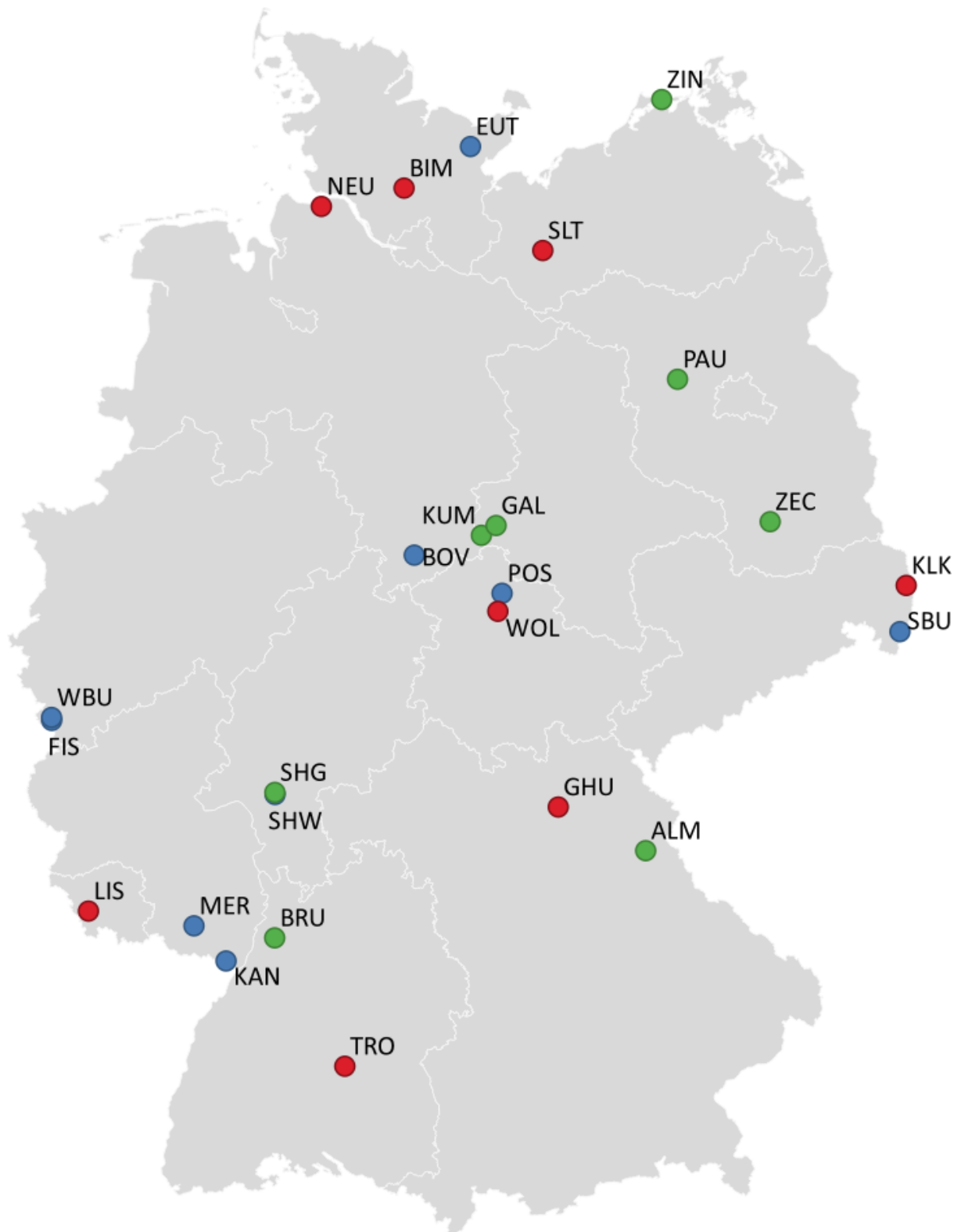
4 AP 2: Auswahl von Standorten im BDF-Programm – Probenahme

4.1 Ausgewählte Standorte

Kernstück der praktischen Arbeit in diesem Projekt war die Beprobung von maximal 25 vorab identifizierten Standorten in Deutschland mittels standardisierter Methoden zur Erfassung der Lumbriciden und zweier weiterer Bodentiergruppen, gefolgt von der morphologischen und genetischen Bestimmung des gefangenen Tiermaterials. Ausgehend von den im AP 1 zusammengestellten Informationen (einschließlich persönlicher Kontakte zu den BDF-Betreibern) wurden daher in diesem AP die 25 am besten in diesem Vorhaben zu beprobenden Standorte ausgewählt. Besonders interessant waren dabei zum einen BDF, zu denen schon entsprechende Informationen vorlagen. Dabei war allerdings zu beachten, dass ein Gleichgewicht zwischen den drei Hauptnutzungsklassen (Acker, Grünland, Wald) gewahrt werden sollte. Zudem wurde eine ausgewogene geographische Verteilung der Probenahmeflächen angestrebt. In Absprache mit dem Auftraggeber war zudem zu prüfen, ob es sinnvoll war, gut charakterisierte Standorte ohne BDF-Status (z. B. Flächen der Bayrischen Landesanstalt für Landwirtschaft oder des Nationalparks Eifel, beprobt im Rahmen des „Edaphobase II“-Projekts; Toschki et al. 2021a), bei der Auswahl zu berücksichtigen.

Abbildung 6 und Tabelle 4 enthalten eine Übersicht über die ausgewählten Standorte: ihre Landnutzung, geografische Lage, die Daten der erfolgten Beprobungen sowie die wesentlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Abbildung 6: Lage, Kürzel und Landnutzung der 25 ausgewählten Standorte in Deutschland (Rot = Acker, Grün = Grünland, Blau = Wald; Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, ECT Oekotoxikologie GmbH

Tabelle 4: Liste der 25 ausgewählten Standorte unter Angabe von Kürzel, Status (BDF = Boden-Dauerbeobachtungsfläche; EB = „Edaphobase“-Projekt), Bezeichnungen, Bundesland (BL), Landnutzung (LN: A = Acker, G = Grünland, W = Wald), Standort, Datum der Beprobung, Koordinaten, Boden-pH (CaCl₂), C/N-Verhältnis, organischer Kohlenstoff [%], Gesamtstickstoff [%] und Bodenart (BA)

Kürzel	Status	Länder-/EB-spezifische Bezeichnung	BL	LN	Standort	Datum	Koordinaten (WGS 84)	pH	C/N	C _{org}	N _{tot}	BA
ALM	EB	Almesbach Stallkoppel EB_BY11	BY	G	Weiden i.d. Oberpfalz	26.05.21	49,681233; 12,200329	6,4	10,1	6,51	0,65	Su3
BIM	BDF	BDF 26: Bad Bramsted	SH	A	Bimöhlen	04.11.19	53,923511; 9,917934	5,3	15,2	3,4	0,23	Ss
BOV	BDF	BF80HABU	NI	W	Bovenden	18.05.21	51,595822; 9,974223	4,2	14,0	29,7	2,12	Ut4
BRU	BDF	Bruchsal	BW	G	Forst	22.10.19	49,171535; 8,573805	6,7	16,2	2,92	1,6	IS
EUT	BDF	BDF 20: Wüstenfelde	SH	W	Eutin	05.11.19	54,179276; 10,641967	4,4	15,2	7,06	0,47	Sl4-Ls3
FIS	EB	Fichte Süd EB_NW12	NW	W	Monschau	10.10.19	50,52131; 6,34056	3,0	20,0	17,0	0,83	Uls
GAL	EB	Galgenberg EB_ST31	ST	G	Elbingerode	16.10.19	51,773793; 10,814907	6,1	12,3	10,1	0,83	Us
GHU	EB	Großenhül In der Huh EB_BY33	BY	A	Thurnau	26.10.18	49,978414; 11,358906	5,8	9,2	1,72	0,19	Ut2
KAN	BDF	BDF 1: Kandel/Schaidt	RP	W	Kandel	29.10.19	49,022290; 8,105280	3,4	14,6	7,47	0,51	Su2
KLK	EB	Klein-Krauscha EB_SN34	SN	A	Neißeau	20.10.21	51,25657; 14,94617	4,2	11,98	2,29	0,19	Su2
KUM	EB	Kümmelwiese EB_ST21	ST	G	Braunlage	30.10.18	51,713757; 10,662652	4,7	11,7	9,10	0,78	Ut2
LIS	BDF	BDF 6606-0186: Saarlouis-Lisdorf	SL	A	Lisdorf	09.10.19	49,320666; 6,763109	6,7	19,2	3,64	0,19	Ut3
MER	BDF	BDF 2: Merzalben	RP	W	Merzalben	29.10.19	49,242356; 7,790209	3,5	17,0	6,79	0,40	Sl3
NEU	BDF	BDF014-L Neuhäuserfelde	NI	A	Neuhaus	04.11.19	53,810873; 9,028747	5,6	10,2	0,86	0,09	Uls
PAU	BDF	BDF 17: Paulinenaue	BB	G	Paulinenaue	06.11.19	52,655927; 12,746113	6,3	12,3	34,2	2,78	n.a.
POS	BDF	BDF 19 Possen (POSS)	TH	W	Sondershausen	31.10.18	51,343192; 10,858749	4,1	17,3	6,9	0,4	Ut4
SBU	EB	Schlegeler Buchberg EB_SN22	SN	W	Zittau-Schlegel	20.10.21	50,96841; 14,84632	4,9	13,90	14,7	1,05	Su4
SHG	BDF	BDF 53: F-SH2 (Schwanheim II)	HE	G	Kelsterbach	18.10.19	50,094220; 8,567582	6,6	9,3	3,22	0,34	Ls3

Kürzel	Status	Länder-/EB-spezifische Bezeichnung	BL	LN	Standort	Datum	Koordinaten (WGS 84)	pH	C/N	C _{org}	N _{tot}	BA
SHW	BDF	BDF 52: F-SH1 (Schwanheim 1)	HE	W	Kelsterbach	18.10.19	50,081072; 8,569127	3,5	10,7	6,66	0,61	Lu
SLT	BDF	BDF-L Nr. 24 Sülstorf	MV	A	Sülstorf	03.11.21	53,507608; 11,385792	5,4	12,5	1,10	0,09	Ss
TRO	BDF	Trochtelfingen	BW	A	Trochtelfingen	23.10.19	48,357624; 9,249132	5,8	n.a.	n.a.	n.a.	TI
WBU	EB	Wächterbuche EB_NW21	NW	W	Monschau	10.10.19	50,54022; 6,33821	3,4	17,4	15,1	0,86	Uls
WOL	BDF	BDF 13 Wolferschwenda (WSWE)	TH	A	Wolferschwenda	15.10.19	51,229550; 10,811587	6,1	8,0	1,6	0,2	Ut4
ZEC	BDF	BDF 28: Zeckerin	BB	G	Zeckerin	21.10.21	51,721298; 13,615597	6,3	10,4	6,5	0,63	SI3
ZIN	BDF	BDF-L Nr. 5 Zingst	MV	G	Zingst	03.11.21	54,430655; 12,734537	4,9	12,2	1,64	0,13	Ss

Datenquellen der Bodendaten (pH, C/N, C_{org}, N_{tot}, BA): Status EB = Toschki et al. (2021a); BIM = Woloszcyk et al. (2018); BOV = Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt; BRU, TRO = Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg; EUT = Woloszcyk et al. (2019); KAN, MER = Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft Rheinland-Pfalz; LIS = Landesamt für Umwelt- und Arbeitsschutz Saarland; NEU = Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie Niedersachsen; PAU, ZEC = Landesamt für Umwelt Brandenburg; POS, WOL = Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz Thüringen;-SHG, SHW = Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie; SLT, ZIN = Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern; n.a. = nicht verfügbar

4.2 Ausgewählte Organismengruppen

Der zweite Schwerpunkt dieses APs lag auf der Auswahl der zu bearbeitenden Tiergruppen. Neben den aufgrund der Leistungsbeschreibung und ihres guten Bearbeitungsstands und ihrer hohen funktionalen Wertigkeit (z. B. Van Groeningen et al. 2016) vorab feststehenden Regenwürmern wurden zwei Gruppen der Mesofauna ausgewählt. Kriterien dafür waren zum Beispiel die jeweilige taxonomische Diversität, die ökologische Rolle der jeweiligen Tiere, das Vorkommen von Schlüsselarten, ihre Empfindlichkeit gegenüber anthropogenen Stressoren oder der Stand der Bearbeitung (z. B. Faber et al. 2013, Ruf et al. 2013, Griffiths et al. 2016, Stone et al. 2016). Darüber hinaus waren aber auch die Praktikabilität ihrer Erfassung (z. B. sind dafür Standardmethoden verfügbar?) und Bestimmbarkeit (z. B. wie viele Barcoding-Daten liegen für die jeweilige Gruppe vor?) zu berücksichtigen. Mögliche Kandidaten waren aufgrund der verfügbaren Informationen zum Vorkommen und zum Bearbeitungsstand insbesondere die Collembola (Springschwänze) (Sousa et al. 2006) oder die Enchytraeidae (Kleinringelwürmer) (Schmelz & Collado 2010). Weitere potenziell zu berücksichtigende Gruppen waren aus der Makrofauna die Diplopoda (Tausendfüßer), Chilopoda (Hundertfüßer) und Isopoda (Asseln), während aus der Mesofauna Oribatida (Horn- oder Moosmilben) und Gamasina (Raubmilben) in Frage kamen. Eine Sonderstellung nahmen die funktional bedeutsamen und taxonomisch sehr heterogenen Fadenwürmer (Nematoda) ein, da deren Nutzung aufgrund ihrer hohen Diversität schwierig ist. In Absprache mit dem Auftraggeber wurden zusätzlich zu den Regenwürmern die Collembolen und Enchytraeiden für die Untersuchungen ausgewählt, auch da diese bereits im Rahmen des deutschen BDF-Programms in einigen Bundesländern untersucht wurden (siehe Abschnitt 3.1.1).

4.3 Pilotstudie

Bei der Diskussion des praktischen Vorgehens zu Beginn des Vorhabens wurde klar, dass die vorhandenen technischen Erfahrungen für eine optimale Durchführung eines bodenbiologischen Monitoringprogramms und speziell das dabei zu verwendende Testdesign nicht ausreichend waren. Daher wurde beschlossen, noch im Herbst 2018 eine Pilotstudie auf drei Probenahmeflächen mit jeweils unterschiedlicher Nutzung (Wald, Grünland, Acker) durchzuführen. Ausgehend von den dabei gemachten Erfahrungen wurde dann ein Standarddesign definiert, das an den übrigen 22 Probenahmeflächen angewandt wurde. Dabei standen die folgenden Fragen im Mittelpunkt des Interesses:

- ▶ Wie viele einzelne Bodenproben müssen für die Untersuchung einer eDNA-Probe vereinigt werden?
- ▶ Wie weit differieren die Ergebnisse zur Diversität der Organismengruppen in Abhängigkeit von der Beprobung (klassische Morphologie, comDNA und eDNA)?
- ▶ Tragen die Proben verschiedener Bodenschichten (0 – 5 cm, 5 – 10 cm) unterschiedliche Informationen zum Gesamtergebnis der Collembolen- und Enchytraeidenbeprobung bei?
- ▶ Wird für die drei Landnutzungsformen ein unterschiedliches Beprobungsdesign benötigt?

Zudem wurden während der Pilotstudie die Organisation und Durchführung der praktischen Beprobung (einschließlich der Handhabung und Verschickung der Proben) sowie die Kommunikation zwischen den Partnern unter realen Bedingungen trainiert. Es wurden drei Standorte ausgewählt, deren Bodeneigenschaften sowie die Diversität der drei ausgewählten Organismengruppen aufgrund früherer Beprobungen bekannt sein sollten. Konkret handelte es sich um:

1. Kalk-Acker-Standort: Großenhül in der Huh (GHU; Bayern), mehrfach im Rahmen des „Edaphobase II“-Projekts beprobt (Toschki et al. 2021a);
2. Buchenwald-Standort: Possen (POS; Thüringen); bisher zweimal im Rahmen von Untersuchungen des Thüringer Landesamts beprobt (Jänsch et al. 2016, unveröffentlicht);
3. Goldhaferwiesen-Standort: Kümmelwiese (KUM; Sachsen-Anhalt), mehrfach im Rahmen des „Edaphobase II“-Projekts beprobt (Toschki et al. 2021a).

4.3.1 Probenahme und Arbeitsablauf

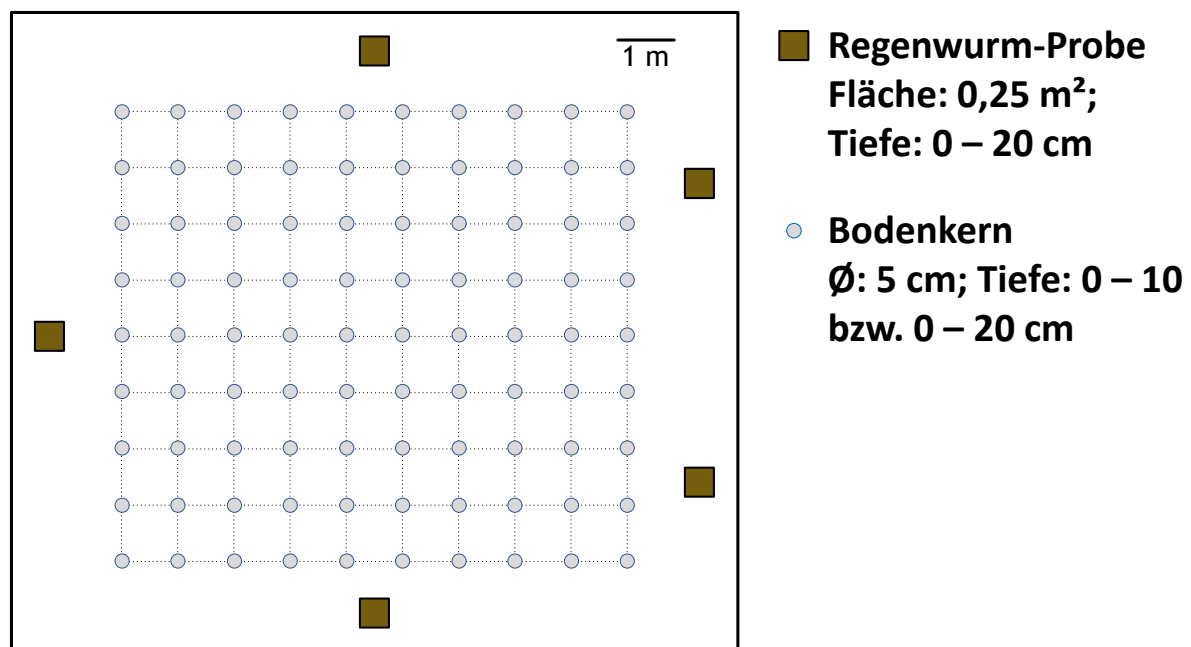
Die technische Durchführung der Probenahme erfolgte mittels Standardmethoden ISO 23611-1 (Regenwürmer; ISO 2018; Abschnitt 4.3.2), ISO 23611-2 (Collembolen; ISO 2006; Abschnitt 4.3.4), bzw. ISO 23611-3 (Enchytraeiden; ISO 2007; Abschnitt 4.3.3) im Herbst 2018, wobei mit Ausnahme der Regenwürmer (Tiefe der Handauslese: 0 – 20 cm) zwei Bodentiefen unterschieden wurden: 0 – 5 und 5 – 10 cm. Zehn Bodenproben (Ø 5 cm) wurden für die Enchytraeiden (kombiniert für die morphologische Bestimmung sowie das comDNA-Metabarcoding) und 20 Bodenproben für die Collembolen (jeweils 10 für die morphologische Bestimmung und 10 für das comDNA-Metabarcoding) genommen. Jede Bodenprobe wurde jeweils in eine obere und untere Hälfte geteilt (bzw. im Wald in die Streulage sowie den mineralischen Oberboden). Für Regenwürmer wurden 5 Proben (Handauslese kombiniert mit Allylisothiocyanat (AITC)-Austreibung) pro Standort genommen, ebenfalls kombiniert für die morphologische Bestimmung bzw. das comDNA-Metabarcoding (Abbildung 7).

Die Anwendung von sowohl morphologischer Bestimmung als auch comDNA-Metabarcoding anhand desselben Probenmaterials war bei den Oligochäten möglich, nicht jedoch bei den Collembolen. Bei den Regenwürmern ist das gleiche Individuum bzw. Teile davon mittels beider Methoden bestimmbar, da für die morphologische Bestimmung insbesondere das Kopfende und das Clitellum verwendet werden, während für das Metabarcoding nur jeweils ein Gewebefragment des Hinterkörpers abgetrennt wurde, d. h. die jeweils verwendeten Segmente hatten keine Bedeutung für die taxonomische Bestimmung (siehe Abschnitt 4.3.2.3). Bei den Enchytraeiden wurden die zuvor morphologisch bestimmten Individuen vollständig für das comDNA-Metabarcoding verwendet (siehe Abschnitt 4.3.3.3). Bei den Collembolen waren jedoch die bei der im Rahmen dieses Vorhabens angewendeten morphologischen Bestimmungsmethode bearbeiteten Individuen nicht mehr für ein comDNA-Metabarcoding verwendbar (siehe Abschnitt 4.3.4.2), so dass hier zwei getrennte Probensätze erforderlich waren.

Zusätzlich wurden 60 Bodenproben (Ø 5 cm, 0 – 20 cm) für die gesamte eDNA-Extraktion an den gleichen Standorten genommen. Bei der Beprobung wurden Schlagsonden verwendet, die mit Bohrhülsen ausgestattet waren, die für jede Bodenprobe (Enchytraeiden & Collembolen) bzw. jede eDNA-Mischprobe gewechselt wurden, sodass eine Kreuzkontamination zwischen den Standorten ausgeschlossen werden konnte. Die insgesamt 90 Bodenkerne wurden in einem Abstand von einem Meter anhand eines vorab festgelegten Schemas auf einer Fläche von 8 m x 9 m (Abbildung 7) genommen, um eine möglichst repräsentative Untersuchung der jeweiligen Fläche zu gewährleisten (Abbildung 8). Die weitere Umsetzung der Pilotstudie folgte dem in Abbildung 9 und Abbildung 10 schematisch dargestellten Arbeitsablauf. Alle Proben wurden zunächst ins Labor der ECT verbracht. Die Proben für die Collembolen und Enchytraeiden wurden zeitnah an die jeweiligen Labors in Portugal (Collembolen, CloverStrategy) Spanien (Enchytraeiden, Rüdiger M. Schmelz) zur Extraktion und weiteren Verarbeitung verschickt. Die Verarbeitung der eDNA-Proben bei der ECT erfolgte nach dem in Abbildung 11 dargestellten Schema: Zunächst wurden die 60 Bodenkerne in drei Bodenschichten (0 – 5, 5 – 10 & 10 – 20 cm) unterteilt. Pro Schicht wurden 5 Mischproben aus 4, 8, 12, 16 und 20 individuellen Bodenproben hergestellt. Die Mischproben für die Bodenschichten 0 bis 5 cm und 5 bis 10 cm wurden zu einem Drittel auf

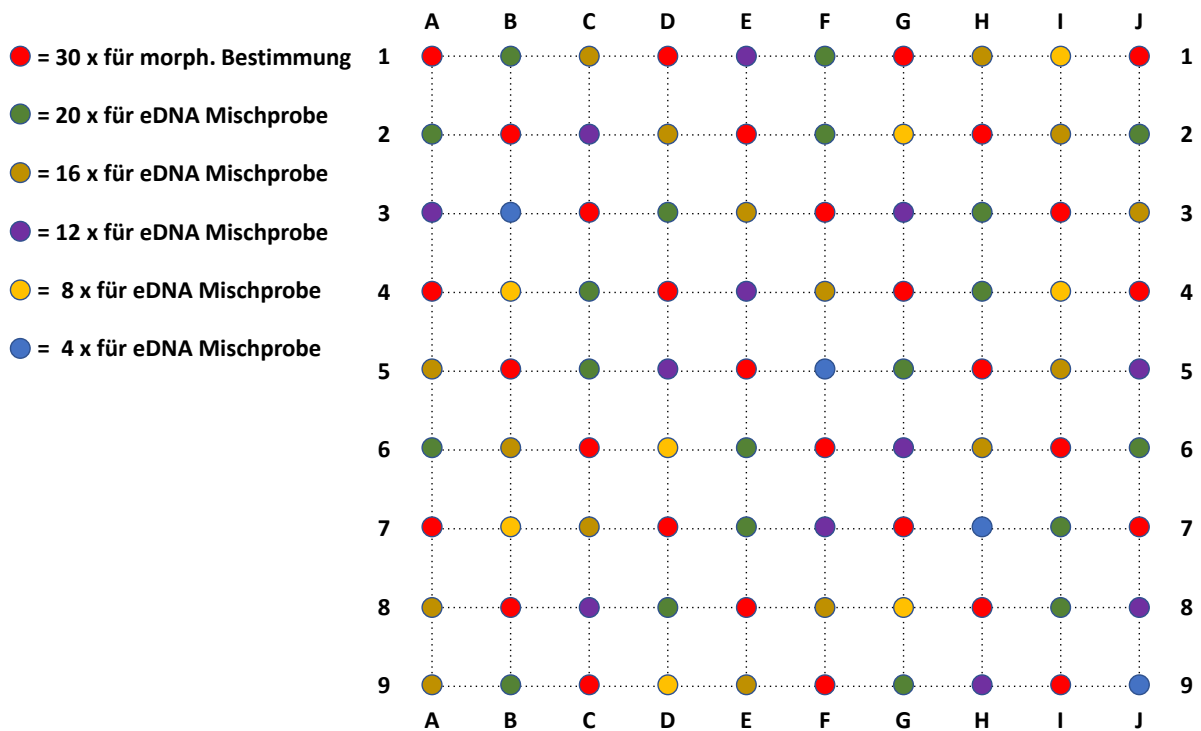
die Regenwürmer und zu zwei Dritteln auf die Collembolen und Enchytraeiden aufgeteilt. Von den Mischproben der 10 bis 20 cm-Schicht wurde ein Drittel für die Regenwürmer separiert und die übrigen zwei Drittel verworfen. Die drei Bodenschichten pro Mischprobe für die Regenwürmer wurden in der Folge wieder zu einer gemeinsamen eDNA-Probe zusammengeführt. Ziel dieses Vorgehens war, eine Vergleichbarkeit mit den für die morphologische Bestimmung und die comDNA der jeweiligen Organismengruppe verwendeten Probertiefen herzustellen, bei gleichzeitiger Minimierung der pro Standort zu entnehmenden Bodenkerne. Damit lagen schließlich 15 eDNA-Proben pro Standort vor, die bei der ECT zunächst mittels eines Phosphatpuffers extrahiert wurden, wobei ein Protokoll der Universität Aarhus verwendet wurde (Abschnitt 4.3.5). Die hierbei gewonnen Extrakte wurden zur weiteren Bearbeitung an die Universität Aarhus geschickt. Dort erfolgte die weitere Extraktion der eDNA mittels „NucleoSpin® Soil“ Kit und die Verschickung an AllGenetics zur Sequenzierung für die Identifikation der Oligochäten. Die Herstellung und Verschickung der comDNA-Proben (für Collembolen an die Universität Aarhus, für Oligochäten an AllGenetics) erfolgte durch die Labors, die auch für die morphologische Bestimmung der jeweiligen Organismengruppe (Regenwürmer: ECT, Collembolen: CloverStrategy, Enchytraeiden: Rüdiger M. Schmelz) verantwortlich waren. Schließlich wurden die comDNA- und eDNA-Proben an der Universität Aarhus bzw. AllGenetics sequenziert und die Ergebnisse mit denen der morphologischen Bestimmung verglichen.

Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Probenahmefläche in der Pilotstudie



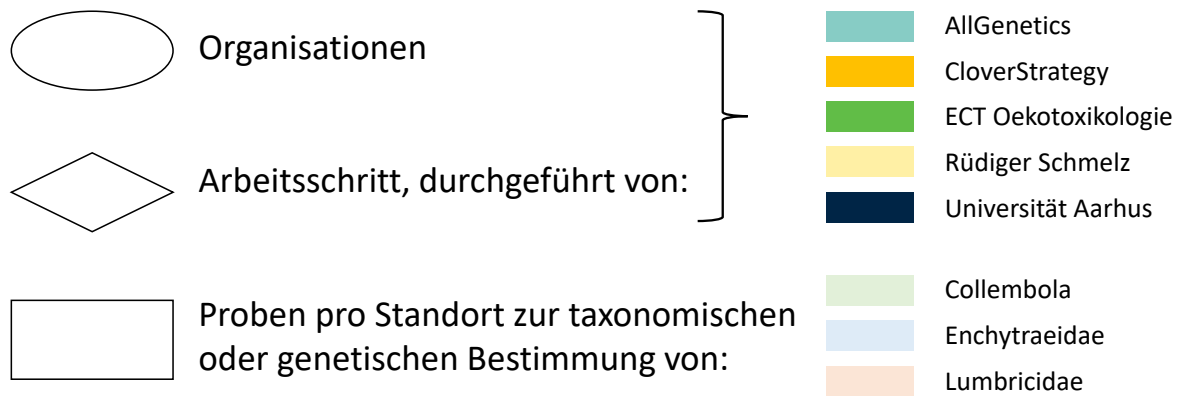
Quelle: eigene Darstellung, ECT Oekotoxikologie GmbH

Abbildung 8: Probenahmeschema der Bodenkerne in der Pilotstudie. Abstand der Punkte: 1 m



Quelle: eigene Darstellung, ECT Oekotoxikologie GmbH

Abbildung 9: Erläuterung zum schematisierten Arbeitsablauf bei der Probenahme in der Pilotstudie (siehe folgende Abbildung)



Bestimmungsergebnisse:

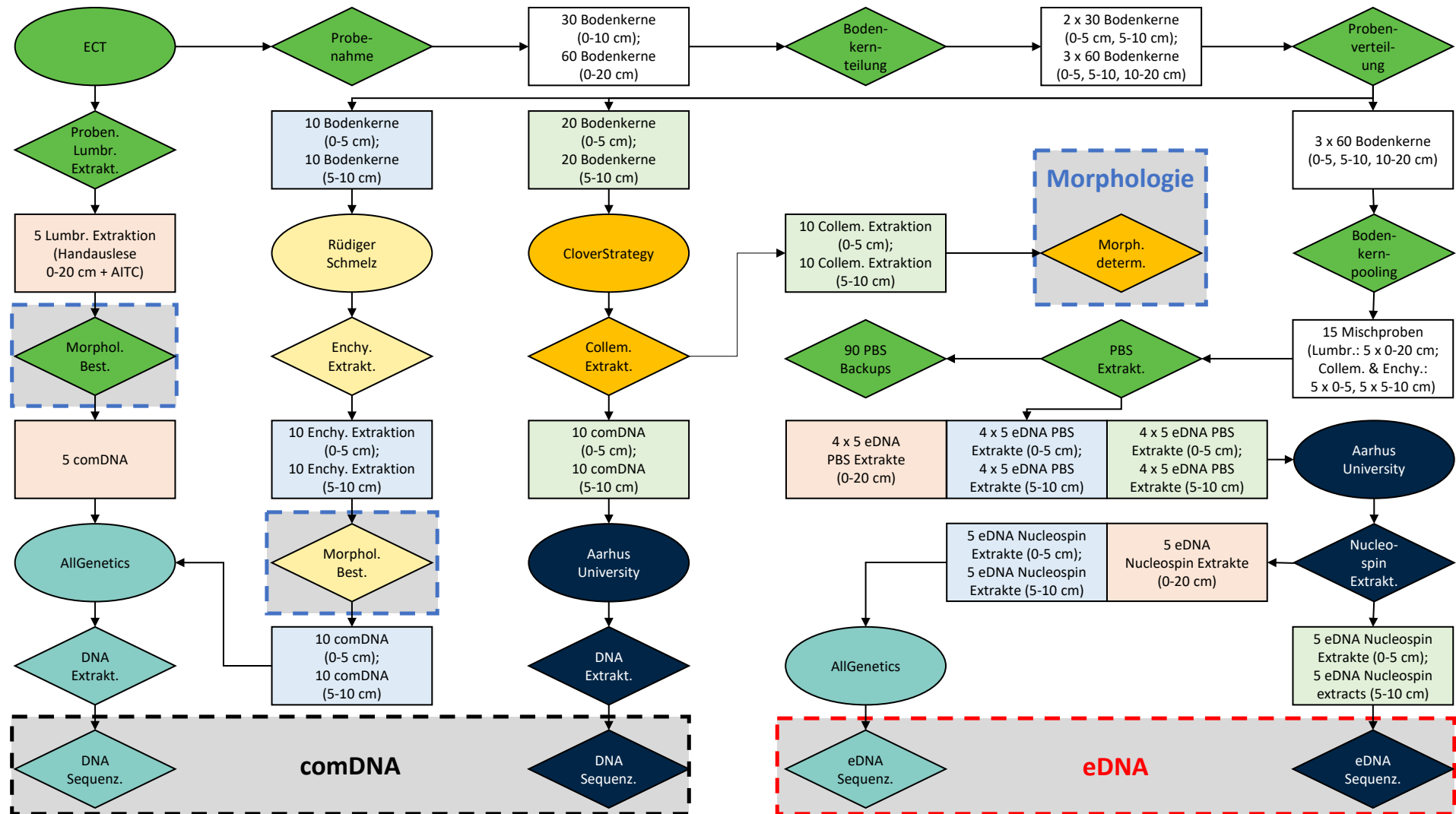
Morphologie

comDNA

eDNA

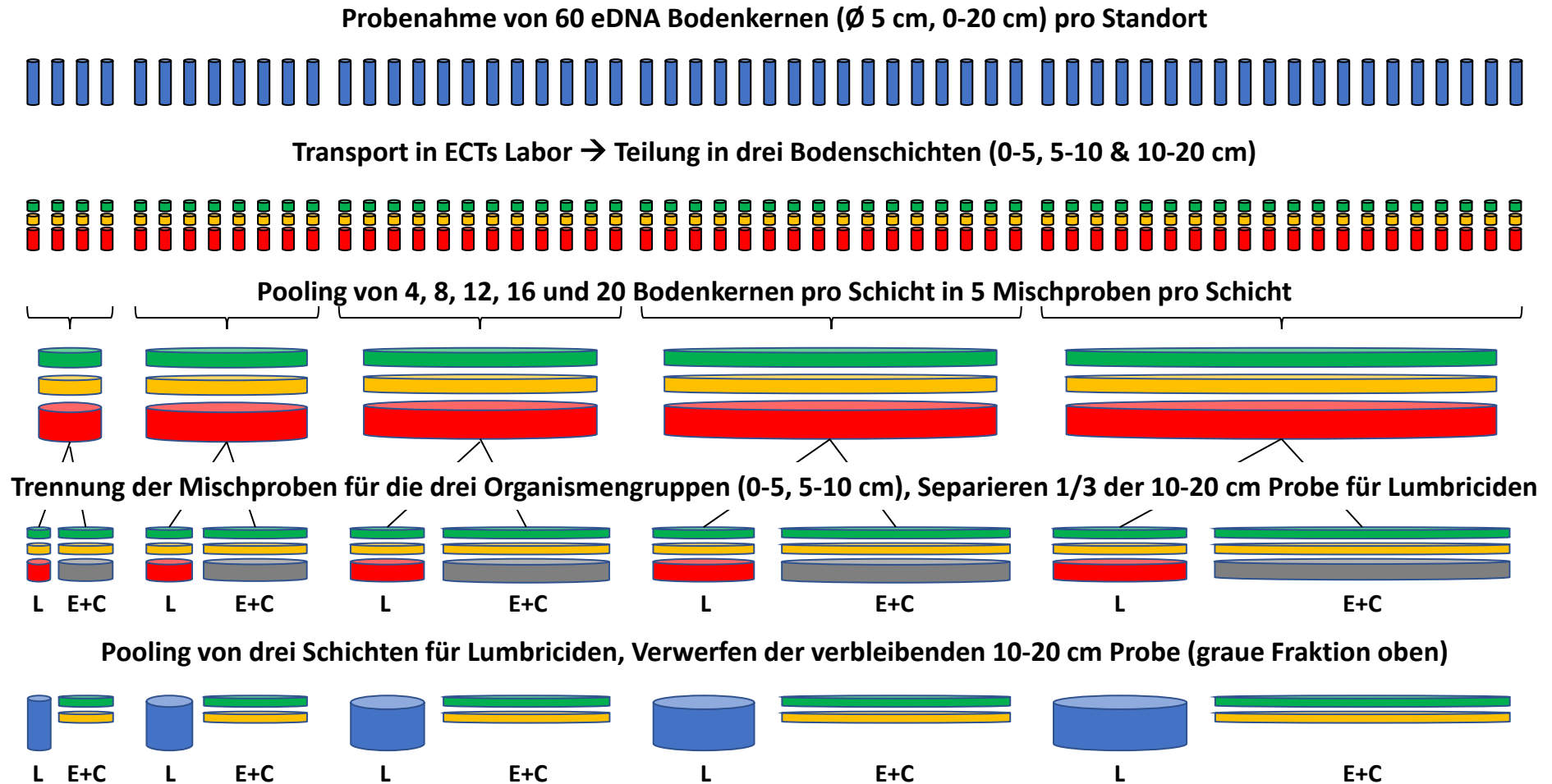
Quelle: eigene Darstellung, ECT Oekotoxikologie GmbH

Abbildung 10: Schematisierter Arbeitsablauf bei der Probenahme in der Pilotstudie



Quelle: eigene Darstellung, ECT Oekotoxikologie GmbH

Abbildung 11: Auftrennung der eDNA-Proben in einzelne Bodenschichten und Herstellung von Mischproben



L = Lumbriciden, E = Enchytraeiden, C = Collembolen

Quelle: eigene Darstellung, ECT Oekotoxikologie GmbH

4.3.2 Regenwürmer

4.3.2.1 Erfassung im Freiland

Die Beprobung der Lumbriciden erfolgte nach dem ISO-Standard 23611-1 (ISO 2018): „Handauslese und Extraktion von Regenwürmern“. Bei der Beprobung wurde pro Standort an jeweils fünf Stellen um die Fläche zur Entnahme der Bodenkerne (Abbildung 8) herum der Oberboden (inklusive Streuschicht, wenn vorhanden) auf einer Fläche von 50 cm x 50 cm (= ¼ Quadratmeter) bis zu einer Tiefe von 20 cm mit Hilfe eines Spatens ausgestochen. Das ausgestochene Bodenmaterial wurde kurzfristig in einer Plastikwanne gelagert und direkt am Entnahmeort mittels Handauslese durchsucht. Parallel dazu wurden zur Extraktion tiefgrabender Regenwürmer 5 l einer 0,01%igen AITC-Lösung mit einer Gießkanne in das ausgehobene Probenloch gegossen (in mehreren Schüben, je nach Bodendichte und Bodenbeschaffenheit). Alle gefundenen Regenwürmer wurden in vorbereitete Plastikgefäße, gefüllt mit 70%igem Ethanol, überführt und so fixiert. Nach Abschluss beider Beprobungsmethoden wurde das ausgestochene Loch mit dem durchsuchten Bodenmaterial verfüllt.

4.3.2.2 Probenaufbereitung und morphologische Bestimmung

Die gesammelten Regenwürmer wurden ins Labor der ECT transportiert. Nach dem Eingang der Proben wurden die Regenwürmer erneut in 70%igem Ethanol umgesetzt. Alle adulten und subadulten Exemplare wurden unter dem Binokular auf Artebene und die meisten Juvenile auf Gattungsebene bestimmt. Das Summengewicht aller Individuen per Art wurde gemessen. Parallel dazu wurde die Zugehörigkeit zu einer der drei ökologischen Gruppen festgehalten (Bouché 1977).

Die morphologische Bestimmung der Regenwürmer erfolgte anhand des Schlüssels von Sims & Gerard (1999), wobei in Zweifelsfällen Graff (1953), Bouché (1972) oder Csuzdi & Zicsi (2003) konsultiert wurden. Hinsichtlich der Nomenklatur folgten wir Lehmitz et al. (2014). Das Probenmaterial befindet sich im Bestand der ECT in Flörsheim.

4.3.2.3 Herstellung der comDNA-Proben

Nach der Wägung wurden bei jedem individuellem Regenwurm ein Gewebefragment von etwa 1 bis 3 mm aus dem hinteren Teil des Körpers (möglichst unter Vermeidung des Verdauungstrakts) entnommen. Die gesammelten Gewebefragmente wurden in einem 2-ml Probengefäß zusammengeführt und mit 96%igem Ethanol auf ein Volumenverhältnis von 3 : 1 Ethanol : Gewebe aufgefüllt. Proben, die viele Regenwürmer enthielten, wurden auf mehrere Probengefäße aufgeteilt. Anschließend wurden die Probengefäße im Kühlschrank bis zur Versendung gelagert.

4.3.3 Enchytraeiden

4.3.3.1 Erfassung im Freiland

Die Beprobung der Enchytraeiden erfolgte nach dem ISO-Standard 23611-3 (ISO 2007): „Probenahme und Bodenextraktion von Enchytraeen“. Dazu wurden pro Standort innerhalb einer 8 m x 9 m Fläche (Abbildung 8) jeweils 10 Einstiche mit einem Stechbohrer (Ø 5 cm) vorgenommen. Die im Rahmen der Pilotstudie ausgestochenen Bodenproben wurden in zwei Tiefenstufen unterteilt: 0 bis 5 cm bzw. 5 bis 10 cm, um dann getrennt bearbeitet und ausgewertet zu werden. Für die spätere Auswertung im Rahmen der Hauptstudie wurden die dabei gewonnenen Daten wiedervereinigt, da in diesem Vorhaben generell auf eine getrennte Auswertung der Bodenschichten verzichtet wurde. Allerdings können die jeweiligen Daten pro Bodenschicht später getrennt ausgewertet werden, wenn ein entsprechendes Interesse an dieser Fragestellung besteht. An den untersuchten Waldstandorten stellte die obere Tiefenstufe die Streuschicht (ohne den L-

Horizont) dar, während die untere Probe die obersten 5 cm des Mineralbodens enthielt. Jede Teilprobe wurde in einen eigenen Plastikbeutel überführt und dieser sofort verschlossen. Alle Proben eines Standortes wurden in eine Styroporkiste gefüllt und in das Labor der ECT transportiert und zeitnah an das Labor von Rüdiger M. Schmelz verschickt. Die durch die Bodenkernentnahme entstandenen Löcher wurden mit umliegendem Material verfüllt.

4.3.3.2 Probenaufbereitung und morphologische Bestimmung

Im Labor von Rüdiger M. Schmelz wurden die Enchytraeiden aus dem Streu- bzw. Bodenmaterial per Nassextraktion mit Wärme ausgetrieben. Gekühlte Proben wurden vorher 12 h an die Zimmertemperatur adaptiert (21 °C). Die Wässerung erfolgte über einen Zeitraum von 6 Stunden, die Hitzequelle wurde nach 2 Stunden eingeschaltet, und das Wasser innerhalb von 4 Stunden auf ca. 40 °C erhitzt. Die extrahierten Tiere wurden in Wasser gekühlt und nach Proben getrennt aufbewahrt und innerhalb von max. 3 Tagen lebend und einzeln unter dem Mikroskop bestimmt. Die Bestimmung der Enchytraeiden erfolgte anhand des Schlüssels von Schmelz & Colado (2010) unter Hinzuziehung von taxonomischen Originalpublikationen. Bestimmungsniveau war die Art, mit Ausnahme einiger juveniler Exemplare der Gattung *Fridericia*. Die Abundanz sowie das jeweilige Altersstadium wurden individuell notiert (juvenil – subadult – adult). Referenzexemplare von Altersstadien jeder Art wurden für eine spätere Biomasse-Abschätzung der Arten individuell vermessen. Nach erfolgter Bestimmung wurden die Tiere lebend in Wasser zurückgeführt.

Bei bisher unbekanntem bzw. noch nicht beschriebenen Arten wurden noch vor der Herstellung der comDNA-Proben (s. u.) Referenzexemplare abgezweigt und separat für eine spätere Sanger DNA-Sequenzierung oder für morphologische Studien fixiert: entweder in heißer Bouin'scher Lösung mit Aufbewahrung in 70%igem Ethanol (morphologische Exemplare) oder in aufsteigender Ethanolreihe (s. u.) für Sanger DNA-Sequenzierung. Einige Exemplare aus der Gattung *Enchytraeus* wurden lebend in kleine, mit Boden (vom jeweiligen Fangstandort) gefüllte Petrischalen gesetzt, um entsprechende Kulturen zu etablieren. Exemplare dieser Kulturen können für weitere Untersuchungen, z. B. in Richtung auf eine ‚Full-Genome-Analysis‘ genutzt werden. In dem letztgenannten Bereich gibt es bereits eine informelle Zusammenarbeit mit dem Senckenberg-Museum Frankfurt (Dr. M. Balint; LOEWE-Zentrum für Translationale Biodiversitätsgenomik, Senckenberg-Museum, Frankfurt).

4.3.3.3 Herstellung der comDNA-Proben

Nach erfolgter taxonomischer Bestimmung aller Individuen einer Probe wurden die Tiere gemeinsam in aufsteigender Ethanolreihe zunächst anästhesiert (5 – 10 %), sodann fixiert (70 %) und schließlich in absolutem Ethanol (100 %) separat konserviert. Dieses Gemisch aus extrahierten und identifizierten Individuen einer Probe bildete die Grundlage für die comDNA-Extraktion. Es lag somit für jede Bodenprobe genau eine Gesamtprobe mit Enchytraeiden für die comDNA-Extraktion vor.

4.3.4 Collembolen

4.3.4.1 Erfassung im Freiland

Die Beprobung der Collembolen erfolgte nach dem ISO-Standard 23611-2 (ISO 2006): „Probenahme und Extraktion von Mikroarthropoden (Collembolen und Milben)“. Dazu wurden pro Standort innerhalb einer 8 m x 9 m Fläche (Abbildung 8) jeweils 20 Einstiche mit einem Stechbohrer (Ø 5 cm) vorgenommen, 10 Bodenproben für das DNA-Metabarcoding der Gemeinschaft (comDNA) und weitere 10 Bodenproben für die klassische morphologische Bestimmung der Collembolen. Die aus der Pilotstudie (Standorte KUM, POS und GHU) erhaltenen Bodenproben

wurden in zwei Schichten (0 – 5 cm und 5 – 10 cm) unterteilt, um die vertikale Verteilung der Mikroarthropoden in den beiden Bodenschichten zu untersuchen. Die nachfolgenden Bodenproben von den übrigen 22 Standorten wurden als eine einzige Bodenschicht (0 bis 10 cm) verarbeitet.

4.3.4.2 Probenaufbereitung und morphologische Bestimmung

In jeder Bodenprobe wurden Mikroarthropoden in einem MacFadyen-Extraktor mit einer oberen Extraktionstemperatur von 45 °C über 4 Tage extrahiert. Die Individuen aus Bodenproben zur taxonomischen Identifizierung wurden direkt in 50-ml Röhrchen mit etwa 10 ml einer 70%igen Ethanollösung extrahiert. Die aus jeder Bodenprobe extrahierten Individuen wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops in Gruppen sortiert. Die Milben aus jeder Probe wurden sortiert, gezählt und separat in Eppendorf-Röhrchen gelagert. Dasselbe wurde für die Collembolen bis zur taxonomischen Bestimmung getan. Der Rest der extrahierten Organismen wurde in seiner Gesamtheit gezählt und verworfen.

Die taxonomische Bestimmung der Collembolen auf Artniveau wurde unter einem Binokular-Mikroskop durchgeführt. Der Prozess beinhaltete das Montieren der Präparate auf mikroskopische Objektträger in Milchsäure. Nach dem Auflegen des Deckglases (Lamelle) und dem Ausrichten der Präparate wurde der Objektträger in einer elektrischen Platte erhitzt, bis der Körper des Tieres vollständig aufgequollen war und ein permanenter Objektträger präpariert wurde (z. B. Martins da Silva et al. 2016, Daghighi et al. 2016, Nascimento et al. 2019, Raymond-Leonard et al. 2019). Die Collembolen wurden anhand der taxonomischen Schlüssel und publizierten Arbeiten von Bretfeld (1999), Dunger & Schlitt (2011), Hopkin (2007), Jordana (2012), Jordana et al. (1997), Potapov (2001) und Thibaud et al. (2004) bestimmt. Die Bestimmung wurde noch durch die auf der Website www.Collembola.org verfügbaren Online-Bestimmungsschlüssel ergänzt, konkret für die Artbestimmung der Gattungen *Lepidocyrtus* Bourlet, 1839 und *Pseudosinella* Schäffer, 1897.

4.3.4.3 Herstellung der comDNA-Proben

Die Individuen aus Bodenproben für das DNA-Metabarcoding (comDNA-Proben) wurden direkt in 50-ml Röhrchen mit etwa 10 ml einer 96%igen Ethanollösung extrahiert. Diese Extrakte wurden durch Sortieren der Individuen in 2-ml-Röhrchen mit einer 96%igen Ethanollösung gereinigt und dann an die Universität Aarhus (Dänemark) geschickt, um dort mit der Metabarcoding-Methode fortzufahren.

4.3.5 eDNA-Extraktion aus Bodenproben

Das im Rahmen dieses Vorhabens eingesetzte Extraktionsverfahren basiert auf der Methode von Taberlet et al. (2012c, 2018) bzw. Pansu et al. (2015). Damit können auch große Bodenmengen (mehrere kg) bearbeitet werden. Im ersten Schritt wurde die jeweilige eDNA-Mischprobe im Labor der ECT mittels einer 0,12 M phosphatgepufferten Salzlösung (PBS; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 : \text{NaH}_2\text{PO}_4 = 5,3 : 94,7$) extrahiert. Der pH-Wert der Lösung wurde auf $\geq 8,0$ eingestellt. Die verwendeten Materialien wie Weithalsflasche, Trichter, Löffel, Glasstab, Schere, Pipettenspitzen sowie die Phosphatpufferlösung wurden vor Gebrauch autoklaviert. Die Arbeitsfläche, Pipetten sowie das Gestell für die vorbereiteten Pipettenspitzen wurden mit Bleichmittel (0,05 % NaClO) und Ethanol (70 %) gereinigt. Zusätzlich wurden Arbeitsfläche und Materialien für ca. 15 min ultraviolettem Licht ausgesetzt. Die eDNA-Mischprobe wurde unter dem Abzug in die Extraktions-Flasche überführt und eine Menge Phosphatpufferlösung entsprechend dem Gewicht der Bodenprobe hinzugefügt, z. B. wurden 1700 g Boden (Frischgewicht) mit 1700 ml Pufferlösung versetzt. Die Mischung wurde mit einem Glasstab umgerührt und bei 400 U/min für 15 min gerührt. Ein Volumen von ca. 200 ml des Phosphatpuffers ohne Boden als Negativkontrolle (NC) wurde ebenfalls

für 15 min geschüttelt. Die NC wurde für jeden Ansatz des Phosphatpuffers hergestellt. Die verwendeten Eppendorf-Pipetten wurden mit Parafilm umwickelt, um eine Kontamination mit DNA zu vermeiden. Direkt nach dem Schütteln (die Lösung sollte sich nicht absetzen) wurden pro Probe jeweils 10-mal 1,8 ml des Überstands sowie pro Arbeitstag zweimal 1,8 ml der NC in 2-ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden bei $\leq -18\text{ °C}$ im Tiefkühler aufbewahrt. Vier der 10 Replikate wurden zur weiteren Bearbeitung auf Trockeneis an die Universität Aarhus verschickt, und sechs Rückstellproben verblieben bei der ECT. An der Universität Aarhus wurden die Proben in den erhaltenen Eppendorf-Röhrchen aufgetaut und bei 1000 G für 10 min zentrifugiert. 700 μl des Überstands wurden in neue Eppendorf-Röhrchen überführt und die DNA mit dem „NucleoSpin® Soil“ Kit extrahiert.

4.3.6 DNA-Metabarcoding-Analyse von eDNA-Bodenextrakten und comDNA-Proben beim Unterauftragnehmer AllGenetics

4.3.6.1 Material und Methoden

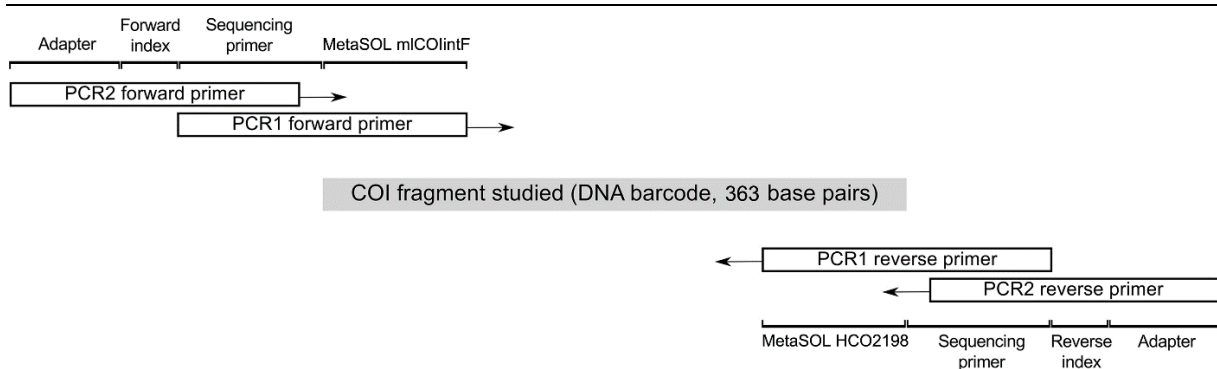
4.3.6.1.1 Probenahme und DNA-Isolation

Die comDNA aus den Lumbriciden-Proben wurde mit dem „NZY Tissue gDNA Isolation Kit“ (NZYTech, Lissabon, Portugal) isoliert und in einem Endvolumen von 100 μl resuspendiert. Die DNA-Isolierung aus den Enchytraeiden-Proben erfolgte mit einem für kleine Proben optimierten Kit (Quick-DNA Microprep Plus Kit, Zymo Research). Die DNA wurde in einem Endvolumen von 20 μl resuspendiert. Bei jeder DNA-Extraktion wurde eine Leerprobe mitgeführt und wie eine normale Probe behandelt, um eine Kreuzkontamination auszuschließen. Die eDNA-Proben für die Oligochäten wurden zuvor vom Unterauftragnehmer Universität Aarhus extrahiert (siehe Abschnitt 4.3.5) und inklusive 4 Negativkontrollen an AllGenetics geschickt.

4.3.6.1.2 Vorbereitung und Sequenzierung von DNA-Metabarcoding-Bibliotheken

Sowohl Lumbriciden- als auch Enchytraeiden comDNA- und eDNA-Bibliotheken wurden durch Amplifikation eines 363-bp-Fragments der COI mit den Primern „MetaSOL mlCOIintF“ (5' GGW ACW GGD TGA ACW GTW TAY CCH CC 3') und „MetaSOL HCO2198“ (5' TAW ACT TCW GGG TGW CCR AAR AAY CA 3') (entwickelt von AllGenetics und modifiziert basierend auf Leray et al. 2013) erzeugt. Die Illumina-Sequenzierungs Primer-Sequenzen wurden an die 5'-Enden der PCR-Primer angehängt. PCRs wurden in einem Endvolumen von 25 μl durchgeführt, das 1 μl Template-DNA, 0,5 μM der Primer, 12,5 μl „Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix“ (NZYTech, Lissabon, Portugal) und Reinstwasser bis zu 25 μl enthielt. Die Reaktionsmischung wurde wie folgt inkubiert: anfängliche Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten, gefolgt von 25 Zyklen von 95 °C für 30 Sekunden, Primerhybridisierung bei 50 °C für 30 Sekunden, 72 °C für 30 Sekunden und einem abschließenden Elongationsschritt bei 72 °C für 10 Minuten. Die Indexsequenzen, die für das Multiplexen verschiedener Bibliotheken im gleichen Sequenzierpool erforderlich sind, wurden in einer zweiten PCR-Runde mit identischen Bedingungen, aber nur 5 Zyklen und 60 °C als Hybridisierungstemperatur, angefügt. Einen schematischen Überblick über den Prozess der Bibliotheksvorbereitung gibt Abbildung 12. Eine Negativkontrolle, die keine DNA enthielt, wurde zur Überprüfung auf Kontamination während der Bibliotheksvorbereitung mitgeführt. Die Bibliotheken wurden auf 2%igen Agarosegelen mit „GreenSafe“ (NZYTech, Lissabon, Portugal) gefärbt und unter ultraviolettem (UV) Licht abgebildet, um die Größe der Bibliothek zu verifizieren. Die Bibliotheken wurden mit den „Mag-Bind RXNPure Plus“ Magnetbeads (Omega Bio-tek, Norcross, USA) gereinigt. Anschließend wurden sie in äquimolaren Mengen entsprechend den Quantifizierungsdaten des „Qubit dsDNA HS Assay“ vereinigt (Thermo Fisher Scientific Waltham, USA) und mittels eines MiSeq PE300 (Illumina, San Diego, USA) sequenziert.

Abbildung 12: Schematische Darstellung der für PCR1 und PCR2 verwendeten Primer. Die Positionen der Illumina-Adapter, Indizes und Sequenzierprimer sind ebenfalls dargestellt



Quelle: basierend auf Vierna et al. (2017) (modifiziert)

4.3.6.1.3 Qualitätskontrolle und Vorverarbeitung von Sequenzierungsdaten

Illumina Paired-End-Rohdateien (FASTQ-Format) bestehen aus Vorwärts- (R1) und Rückwärts-Reads (R2), sortiert nach Bibliothek und ihren Qualitätsscores. Die Indizes und Sequenzierprimer werden während des Demultiplexing-Schrittes gekürzt. Die Qualität der FASTQ-Dateien wurde mit der Software „FastQC“ (Andrews 2010) überprüft. Die Zusammenführung der R1- und R2-Reads wurde mit „FLASH“ durchgeführt (Magoč & Salzberg 2011). Die Mismatch-Auflösung in der überlappenden Region (mindestens Überlappung von 30 Basenpaaren) wurde erreicht, indem die Base mit der höheren Qualitätsbewertung beibehalten wurde. Die „CUTADAPT“-Software 1.3 (Martin 2011) wurde verwendet, um Sequenzen, die die PCR-Primer nicht enthielten (bis zu 2 Fehlpaarungen möglich), und Sequenzen, die am Ende kürzer als 250 Nukleotide waren, zu entfernen. Die Sequenzen wurden qualitätsgefiltert (Phred-Qualitätsscore von mindestens 20) und mit dem im Programm „QIIME“ (Quantitative Insights Into Microbial Ecology; <http://qiime.org/>) implementierten Skript „multiple_split_libraries.py“ (Caporaso et al. 2010) gekennzeichnet. Bei diesem Schritt wird die Kennzeichnung in den Header der FASTQ-Datei platziert und dient als Probenidentifikator, wenn die Sequenzen kombiniert werden, um nachgelagerte Analysen durchzuführen. Die FASTA-Datei wurde mit „VSEARCH“ bearbeitet. Die Sequenzen wurden derepliziert (-derep_fulllength), mit dem „Swarm“-Algorithmus (Mahé et al. 2015) und drei verschiedenen Clustering-Schwellenwerten (von $d = 1$ bis $d = 5$) in OTUs geclustert und sortiert (-sortbysize). In den Rohdaten können Artefakte wie Punktmutationen und Chimären auftreten. Diese Artefakte, die während der PCR und der Sequenzierung entstehen, können die Anzahl der OTUs überbewerten. Die verwendete Bioinformatik-Pipeline enthielt Filter, die darauf abzielten, die Auswirkungen solcher Artefakte zu reduzieren. Die Erkennung von De-novo-Chimären wurde mit dem „UCHIME“-Algorithmus durchgeführt (Edgar et al. 2011) durchgeführt, der in „VSEARCH“ implementiert ist. Anschließend wurden die Sequenzen OTUs zugewiesen (-usearch_global).

4.3.6.1.4 Taxonomische Zuordnung

Für dieses Projekt wurde eine lokale Referenzdatenbank erstellt, indem die für die taxonomischen Zielgruppen in der BOLD-Datenbank verfügbaren COI-Sequenzdaten mit den COI-Sequenzen kombiniert wurden, die für Enchytraeidentaxa im Rahmen des Projekts „EcoFINDERS“ (Griffiths et al. 2016) gewonnen wurden. Die Referenzdatenbank wurde nach Länge gefiltert, um Sequenzen auszuschließen, die kürzer als 100 bp waren, und identische Sequenzen wurden zu einem einzigen Eintrag zusammengefasst. Die taxonomische Zuordnung der OTU-Liste erfolgte durch Abfrage der geclusterten Zentroide gegen die Referenzdatenbanken unter Verwendung des in „QIIME“ implementierten Skripts „assign_taxonomy.py“ und des „UCLUST“-Algorithmus. Ein entscheidender Faktor für die Genauigkeit der taxonomischen Bestimmung ist die

Sequenzidentitätsschwelle, die für den Abgleich einer repräsentativen OTU-Sequenz mit einem Referenz-DNA-Barcode verwendet wird. Die meisten DNA-Metabarcoding-Pipelines verwenden Standard-Identitätsschwellenwerte (in der Regel 97 %) für OTU-Clustering und taxonomische Zuordnungen. Die Sequenzidentitäten zwischen Familien, Gattungen und Arten sind jedoch je nach Taxa und DNA-Metabarcoding-Markern sehr unterschiedlich. Um die optimale Identitätsschwelle für den Datensatz aus der Pilotstudie empirisch zu ermitteln, wurden 5 verschiedene Identitätsschwellenwerte zwischen 88 % und 100 % getestet (88 %, 90 %, 94 %, 97 % und 99 %). Auf der Grundlage des Vergleichs zwischen den Ergebnissen der taxonomischen Zuordnungen und der Liste der Enchytraeidtaxa, die an den einzelnen Probenahmestellen morphologisch identifiziert wurden, wurden 88 % als optimaler Identitätsschwellenwert ausgewählt, der die Erkennung der in den DNA-Proben der Gemeinschaft tatsächlich vorhandenen Enchytraeidenarten maximiert. Durch die Wahl eines solchen niedrigen Schwellenwerts für die Sequenzidentität können jedoch auch ‚falsche‘ Arten in die OTU-Liste aufgenommen werden, die in den Proben nicht morphologisch identifiziert wurden (hier z. B. *Fridericia waldenstroemi*). Die OTUs, die nach dem Schritt der taxonomischen Zuordnung nicht identifiziert werden konnten (d. h. ‚Unassigned‘ OTUs), wurden mit dem „Identification Engine System“ (IDS) in der BOLD-Datenbank abgefragt. Das IDS verwendet alle Sequenzen, die von öffentlichen und privaten Projekten auf BOLD hochgeladen wurden, um die nächstliegende Übereinstimmung mit der Abfragesequenz zu finden. Nur die OTUs, die mit einer Referenzsequenz in unserer lokalen Referenzdatenbank oder in der BOLD-Datenbank übereinstimmten, wurden in der OTU-Tabelle gespeichert. Daher wurden die nicht identifizierten OTUs (‚Unassigned‘) aus dem Datensatz entfernt, um die endgültige OTU-Tabelle zu erstellen, die die Anzahl der Sequenzen jeder OTU auflistet, die in jeder Probe gefunden wurden.

4.3.6.1.5 OTU-Filterung

Eine weit verbreitete Strategie zur Entfernung artefaktischer Sequenzen, die typischerweise während der PCR und Sequenzierung entstehen, besteht darin, OTUs mit einer Anzahl an Kopien unter einem bestimmten Schwellenwert zu verwerfen. Um Auswirkungen der Qualitätsfilterungsstrategie auf die festgestellte Diversität zu bewerten, wurden zwei alternative Strategien zur Qualitätsfilterung getestet:

- ▶ Entfernung von Singletons (OTUs mit nur einer Mitgliedssequenz im gesamten Datensatz);
- ▶ Entfernung von Singletons; Entfernung von OTUs mit einer Sequenzanzahl von weniger als 0,005 % der Gesamtzahl der Sequenzen gemäß Bokulich et al. (2013); und die OTUs mit geringer Abundanz jeder Probe (0,05%-Schwelle), um das ‚Mistagging‘-Phänomen zu korrigieren, d. h. das Ergebnis einer falschen Zuordnung der Indizes während der Bibliotheksvorbereitung, der Sequenzierung und/oder der Demultiplexing-Schritte (Esling et al. 2015, Bartram et al. 2016, Illumina 2017).

Der Vergleich der OTU-Tabellen, die mit den beiden Strategien zur Qualitätsfilterung erstellt wurden, zeigte, dass in unserem Datensatz zahlreiche OTUs mit geringer Häufigkeit echten Arten entsprachen, die morphologisch identifiziert wurden. Eine stringente Qualitätsfilterung (z. B. Festlegung einer Schwelle einer Mindestkopienzahl von 0,05 %) verhinderte den Nachweis zahlreicher Arten in den eDNA-Proben, weswegen die Artenvielfalt in einem Boden stark unterschätzt werden könnte. Darauf basierend wurde entschieden, für die Qualitätsfilterung einen niedrigen Schwellenwert für die Kopienzahl oder nur die Entfernung von Singletons zu wählen, was die Erkennung von echten Sequenzen mit geringer Kopienzahl ermöglicht, wenn auch auf Kosten der Beibehaltung von artefaktischen Sequenzen. Auf der Grundlage dieser Erwägungen wurde die folgende bioinformatische Pipeline für die Analyse der DNA Metabarcoding-Ergebnisse aus der Pilotstudie ausgewählt:

1. Qualitätsfilterung der Sequenz-Reads mit einem Phred-Score von mindestens 20;
2. OTU-Clustering mit dem Swarm-Algorithmus bei $d = 3$, was in etwa einer Ähnlichkeitsschwelle von 97 % entspricht;
3. Entfernung von Singletons und chimären Sequenzen;
4. Taxonomische Zuordnung zur Referenzsequenzdatenbank mit „VSEARCH“ unter Verwendung des „UCLUST“-Algorithmus und einem Schwellenwert von 88 % Sequenzidentität.

4.3.6.1.6 Zusammenfassende Darstellungen der Taxonomie

Die OTU-Tabellen wurden in „Biological Observation Matrix“-Dateien (.biom) umgewandelt, die direkt in R 3.5.2 (R Core Team 2019) importiert wurden. UpSet-Plots (Lex et al. 2014), in denen die Anzahl der durch morphologische Bestimmung und durch DNA-Metabarcoding, comDNA, eDNA (Beprobungstiefe 0 – 10 cm) und eDNA (Beprobungstiefe 0 – 20 cm) an jeder Probenahmestelle nachgewiesenen Enchytraeiden- und Regenwurmartarten verglichen wurden, wurden mit dem Paket „Intervene“ erstellt (Khan & Mathelier 2017).

4.3.6.1.7 Vergleich der durch morphologische Bestimmung und DNA-Metabarcoding ermittelten Zusammensetzung der Gemeinschaft

Die mit den COI- und 16S-Markern für die analysierten comDNA- und eDNA-Proben gewonnenen OTU-Tabellen wurden mit den Taxa-Listen aus den morphologischen Bestimmungen verglichen. Es ist zu beachten, dass bei DNA-Metabarcoding-Daten die Anzahl der Beobachtungen der Anzahl der Sequenzen (Reads) jeder OTU entspricht, bei morphologischen Daten dagegen der Anzahl der in jeder Probe enthaltenen Exemplare. Die Anzahl der Exemplare pro Taxon wurde für die nachgelagerten Präsenz-/Abwesenheitsanalysen auf 1 gesetzt. Die in den verschiedenen morphologischen und comDNA-Proben erhaltene Anzahl Exemplare/Sequenzierungs-Reads wurden pro Standort zusammengefasst. UpSet-Plots, in denen die Anzahl der Arten, die mit den einzelnen Methoden an den einzelnen Standorten nachgewiesen wurden, wurden mit dem Paket „Intervene“ (Khan & Mathelier 2017) erstellt.

4.3.6.1.8 Vergleich der Leistung von zwei DNA-Metabarcoding-Markern – COI und 16S – zur Artennachweis aus eDNA-Proben

Eine Teilmenge von 9 eDNA-Proben, die für die Probenahmestellen GHU, KUM und POS gewonnen wurden (siehe Tabelle 5), wurde parallel im eDNA-Center der Universität Aarhus (AU eDNA-Center) analysiert, um 1) die Reproduzierbarkeit des in diesem Projekt entwickelten DNA-Metabarcoding-Protokolls zu bewerten und 2) die durch zwei verschiedene DNA-Metabarcoding-Marker ermittelte Artenzusammensetzung zu vergleichen: COI und das 16S ribosomale Gen.

Die COI-DNA-Metabarcoding-Bibliotheken wurden am AU eDNA-Center mit demselben Primerpaar wie bei AllGenetics hergestellt. Die 16S-DNA-Metabarcoding-Bibliotheken wurden mit dem Primerpaar ewD (5' ATT CGG TTG GGG CGA CC 3') und ewE (5' CTG TTA TCC CTA AGG TAG CTT 3') erstellt (Bienert et al. 2012). Auch wenn das Primerpaar ewD / ewE speziell für Regenwürmer entwickelt wurde, kann es auch ein breites Spektrum von Enchytraeidenarten amplifizieren. Die Qualitätskontrolle, Verarbeitung und taxonomische Zuordnung der COI- und 16S-Metabarcoding Sequenzierungsdaten wurden bei AllGenetics mit der oben beschriebenen bioinformatischen Pipeline durchgeführt, mit einigen geringfügigen Änderungen: Bei der Analyse des 16S-Datensatzes wurde der Parameter ‚d‘, der vom Swarm-Algorithmus zum Clustern von Sequenzen in OTUs dient, auf ‚1‘ gesetzt, und die Option ‚-qmask‘ der „VSEARCH“-Software wurde auf ‚none‘ gesetzt, um die Filterung von Sequenzregionen mit geringer Komplexität zu vermeiden. Für die taxonomische Zuordnung der 16S OTUs wurde eine lokale Referenzdatenbank erstellt, die alle 16S- und vollständigen mitochondrialen Genome enthielt, die in der „DNA Data Bank of Japan“ (DDBJ)/„European Nucleotide Archive“ (ENA)/„GenBank“ Datenbank (letzter

Zugriff: 17. März 2020) verfügbar sind. Die repräsentativen 16S-OTU-Sequenzen wurden aus der Referenzdatenbank mit Hilfe des Skripts „assign taxonomy.py“ abgefragt, das in „QIIME“ und dem „UCLUST“-Algorithmus implementiert ist, unter Verwendung eines Schwellenwerts von 95 % Sequenzidentität, wie von Bienert et al. (2012) empfohlen. Die für Regenwürmer und Enchytraeiden erstellten 16S- und COI-OTU-Tabellen wurden mit den COI-OTU-Listen kombiniert, die für die entsprechenden Proben in der bei AllGenetics durchgeführten ersten DNA-Metabarcoding-Analyse ermittelt wurden. Die OTU-Tabellen der Enchytraeiden und Regenwürmer wurden in biom-Dateien konvertiert und in R 3.5.2 importiert. Venn-Diagramme, die die Anzahl der Enchytraeiden- und Regenwurmartenspezies zeigen, die ausschließlich oder gemeinsam durch den 16S- und den COI-Marker in den Analysen am AU eDNA-Center und bei AllGenetics identifiziert wurden, wurden mit dem Paket „Intervene“ (Khan & Mathelier 2017) erstellt.

Tabelle 5: Proben, die in den vergleichenden COI/16S-DNA-Metabarcoding-Analysen verwendet wurden, die am AU eDNA-Zentrum durchgeführt wurden (Standortkürzel siehe Tabelle 4)

AllGenetics Probenr.	AU Probenr.	Standort	Bodentiefe (cm)	Marker	Analyse	Taxonomische Gruppen
KUMcE4a	PHK1-Test1	KUM	0 – 5	16S	eDNA	Lumbricidae & Enchytraeidae
KUMcE8a	PHK1-Test2	KUM	0 – 5	16S	eDNA	Lumbricidae & Enchytraeidae
POScE4a	PHK1-Test3	POS	0 – 5	16S	eDNA	Lumbricidae & Enchytraeidae
POScE8b	PHK1-Test4	POS	5 – 10	16S	eDNA	Lumbricidae & Enchytraeidae
GHUcE4a	PHK1-Test6	GHU	0 – 5	COI	eDNA	Lumbricidae & Enchytraeidae
KUMcE8a diluted	PHK1-Test7	KUM	0 – 5	COI	eDNA	Lumbricidae & Enchytraeidae
KUMcE8a	PHK1-Test8	KUM	0 – 5	COI	eDNA	Lumbricidae & Enchytraeidae
POScE4a	PHK1-Test9	POS	0 – 5	COI	eDNA	Lumbricidae & Enchytraeidae
POScE8b	PHK1-Test10	POS	5 – 10	COI	eDNA	Lumbricidae & Enchytraeidae

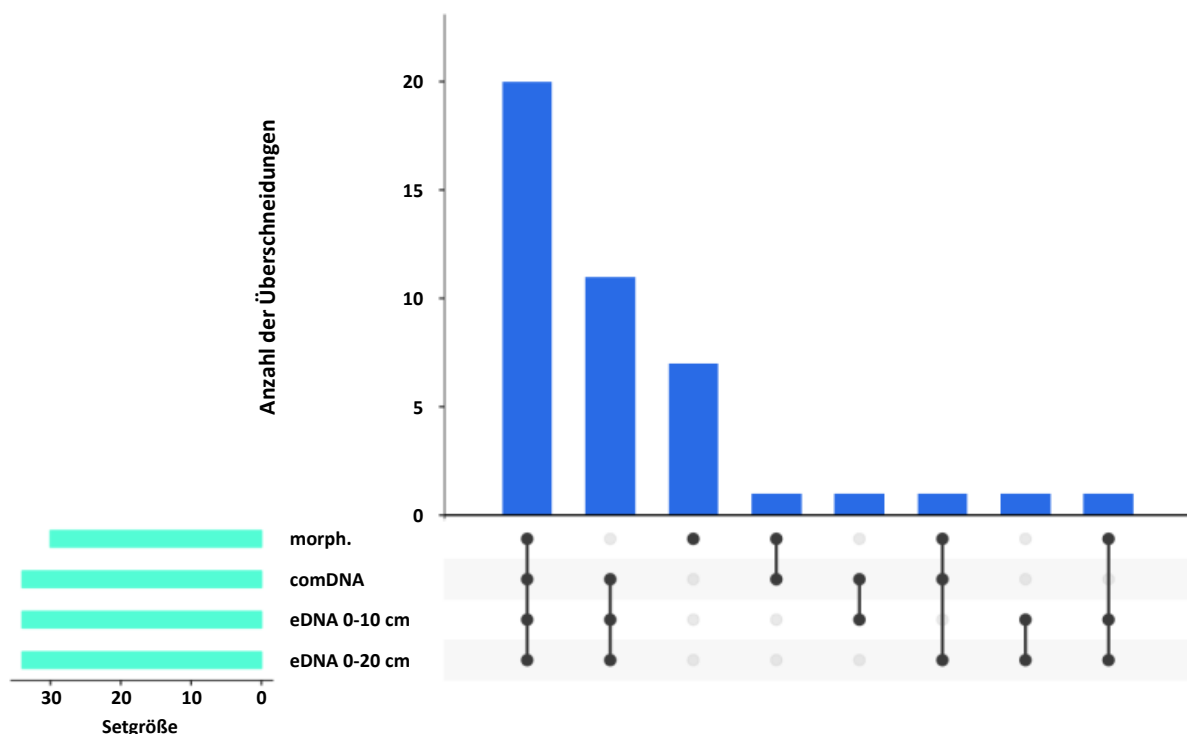
4.3.6.2 Ergebnisse

Insgesamt 48 comDNA- und 45 eDNA-Metabarcoding-Bibliotheken wurden mit der Illumina MiSeq-Technologie sequenziert. Die Sequenzer-Reads wurden bioinformatisch verarbeitet, in OTUs geclustert und durch Vergleich mit einer kuratierten COI-Referenzsequenzdatenbank den Regenwurm-/Enchytraeidentaxa zugeordnet. Die resultierende OTU-Tabelle listet die Anzahl der Sequenzen jeder OTU, die in jeder Probe gefunden wurden und die entsprechenden taxonomischen Informationen.

4.3.6.2.1 Vergleich der Zusammensetzung von Gemeinschaften, die durch morphologische Bestimmung, comDNA- und eDNA-Metabarcoding abgeleitet wurden

An allen 3 Probenahmestellen war die Gesamtzahl der durch DNA-Metabarcoding entweder in comDNA- oder eDNA-Proben nachgewiesenen Enchytraeidenarten ähnlich hoch oder höher als die Zahl der morphologisch bestimmten Arten. Allerdings wurden nicht alle Morphospezies in den DNA Metabarcoding-OTU-Listen wiedergefunden, nicht einmal in den comDNA-Proben (siehe z. B. Abbildung 13, Tabelle 6). Einige der Diskordanzen zwischen den morphologischen und den DNA-Metabarcoding-Artenlisten konnten durch Lücken in der COI-Referenzdatenbank (meist informelle Arten, für die noch kein Barcode vorlag) oder durch Unstimmigkeiten zwischen den Namen der Morphospezies und der Referenzsequenzen erklärt werden. Zum Beispiel fehlen für die Morphospezies *Achaeta* sp. (4Fdr), *Achaeta* sp. (HEAL) oder *Enchytronia* sp. (ZETA) entsprechende COI-Referenzsequenzen und können daher in einer DNA-Metabarcoding-Analyse nicht nachgewiesen werden. Andererseits schien das DNA-Metabarcoding Arten zu finden, die morphologisch nicht identifiziert worden waren, wie z. B. *Achaeta unibulba* in den comDNA-Proben von den Standorten Kümmelwiese (KUM) und Possen (POS). Dies könnte auf Identifizierungsfehler zurückgehen, entweder in diesem Projekt oder bei Erstellung der Referenzsequenzen. Interessanterweise handelt es sich bei einigen von ihnen um potenziell kryptische Arten (z. B. *Fridericia christeri* L1 und L2, oder *Fridericia galba* C und L1), die morphologisch nicht zu unterscheiden sind, aber stark divergierende COI-Haplotypen aufweisen.

Abbildung 13: UpSet-Diagramm, das die Anzahl und die Identität der Enchytraeidentaxa zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding am Standort Kümmelwiese (KUM) identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 6: Enchytraeidentaxa, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding am Standort Kümmelwiese (KUM) identifiziert wurden

Taxon	morph.	comDNA	eDNA 0 – 10 cm	eDNA 0 – 20 cm
<i>Achaeta affinis</i>		*	*	
<i>Achaeta bohemica</i>	*	*	*	*
<i>Achaeta camerani</i>			*	*
<i>Achaeta</i> sp.		*	*	*
<i>Achaeta</i> sp. (4Fdr)	*			
<i>Achaeta</i> sp. (HEAL)	*			
<i>Achaeta</i> sp. (DZWI)		*	*	*
<i>Achaeta</i> sp. (PDZW)		*	*	*
<i>Achaeta unibulba</i>			*	*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*	*
<i>Cernosvitoviella</i> sp.	*	*	*	*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*	*
<i>Cognettia varisetosa</i>	*	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*	*
<i>Enchytraeus christenseni</i>	*	*		
<i>Enchytraeus lacteus</i>	*	*	*	*
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	*	*	*	*
<i>Enchytraeus</i> sp.		*	*	*
<i>Enchytraeus</i> sp. (GRAN)	*			
<i>Enchytronia baloghi</i>	*	*	*	*
<i>Enchytronia christenseni</i>	*	*	*	*
<i>Enchytronia holochaeta</i>			*	*
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*	*
<i>Enchytronia</i> sp. (MINO)	*			
<i>Enchytronia</i> sp. (OMNI)	*			
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	*	*	*	*
<i>Enchytronia</i> sp. (ZETA)	*			
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*	*
<i>Fridericia connata</i>	*	*	*	*

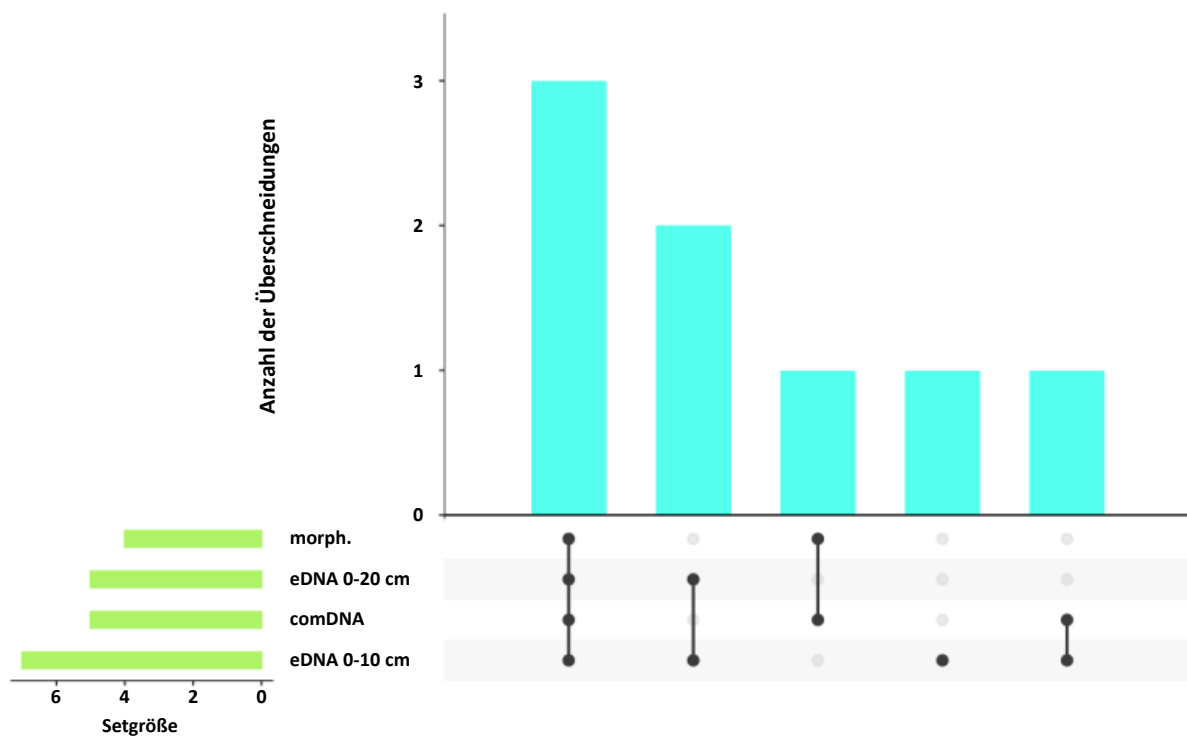
Taxon	morph.	comDNA	eDNA 0 – 10 cm	eDNA 0 – 20 cm
<i>Fridericia dura</i>		*	*	*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>	*	*	*	*
<i>Fridericia sp.</i>	*	*	*	*
<i>Fridericia ulrikae</i>	*	*	*	*
<i>Fridericia waldenstroemi</i>		*	*	*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*		
<i>Marionina argentea</i>		*	*	*
<i>Marionina deminuta</i>	*			
<i>Marionina mendax</i>	*	*	*	*
<i>Marionina sp.</i>		*	*	*
<i>Oconnorella tubifera</i>	*	*	*	*
<i>Stercutus niveus</i>	*		*	*
Enchytraeidae sp.		*	*	*
Summe	30	32	34	34

Neben den Unterschieden bei den Namen der Morphospezies und der COI-Referenzsequenzen besteht eine weitere Quelle der Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen in Verzerrungen im Zusammenhang mit der DNA-Extraktion und der PCR-Amplifikation. Erstens können kleinere und wenig verbreitete Arten in einer Mischprobe von Organismen weniger effizient extrahiert werden und können daher auch in comDNA-Proben unentdeckt bleiben. Zweitens wird die PCR-Amplifikation in der Regel durch Primer-Verzerrungen beeinträchtigt: Auch wenn das Primer-Design so optimiert ist, dass sie auf hochvariable Stellen in verschiedenen Taxa abgestimmt sind, ist eine Verzerrung der Primer inhärent für PCR-basierte Analysen und führt häufig zu einer bevorzugten Amplifikation einiger Zielgruppen gegenüber anderen. Dies gilt insbesondere für eDNA-Proben, die in der Regel DNA von Nicht-Zielorganismengruppen enthalten, was zu einem höheren Grad an PCR-Stochastizität und inkonsistenten Ergebnissen im Vergleich zu comDNA-Proben führt. Wie aus den OTU-Tabellen hervorging, war die Gesamtzahl der aus den eDNA-Proben gewonnenen Enchytraeidensequenzen deutlich geringer als die Anzahl der Sequenzen aus comDNA-Proben. Obwohl die in dieser Studie verwendeten COI-Primer so modifiziert wurden, dass sie spezifisch Enchytraeiden und Regenwürmer amplifizierten, gehörte ein hoher Anteil der in den eDNA-Proben gewonnenen Reads zu Gruppen von Nicht-Zielorganismen (hauptsächlich Arthropoden und Pilze). Daher könnte eine Erhöhung der Sequenzierungstiefe in eDNA-Proben ein einfacher Weg sein, um konsistentere Artenlisten für alle Proben zu erstellen.

Im Fall der Regenwürmer wurden die morphologisch bestimmten Arten auch in den comDNA-Proben gefunden, obwohl die Artenlisten der beiden Methoden nicht immer perfekt übereinstimmen. Größere Unterschiede wurden festgestellt, wenn die Zusammensetzung der Regenwurmgemeinschaft aus den eDNA-Ergebnissen abgeleitet wurde (siehe Abbildung 14 und Tabelle 7 als Beispiel). Zum Beispiel wurde *Lumbricus terrestris* sowohl durch Morphologie als auch durch comDNA-Metabarcoding am Standort KUM identifiziert, fehlte aber in den eDNA-Ergebnissen, selbst bei einer Anzahl von 20 einzelnen Bodenkernen pro eDNA-Mischprobe.

Umgekehrt wurden einige Lumbricidenarten, die potenziell in den beprobten Böden vorkommen könnten, nur durch eDNA-Metabarcoding nachgewiesen: *Lumbricus rubellus* und *Octolasion tyrtaeum* am Standort KUM und *Aporrectodea rosea*, *Dendrobaena octaedra*, *Dendrobaena pygmaea* und *Dendrodrilus rubidus* am Standort POS. Ähnlich wie bei den Enchytraeiden konnte durch DNA-Metabarcoding auch die Unterart *Aporrectodea caliginosa tuberculata* unter den OTUs, die *A. caliginosa* zugeordnet wurden, identifiziert werden. Auch die Erkennung stark divergierender COI-Linien innerhalb der Art *Aporrectodea rosea* war möglich, manchmal sogar am selben Ort (zum Beispiel wurden drei verschiedene Linien von *A. rosea* – L1, L2, und L4 – am Standort KUM gefunden).

Abbildung 14: UpSet-Diagramm, das die Anzahl und die Identität der Lumbricidentaxa zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding am Standort Kümmelwiese (KUM) identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

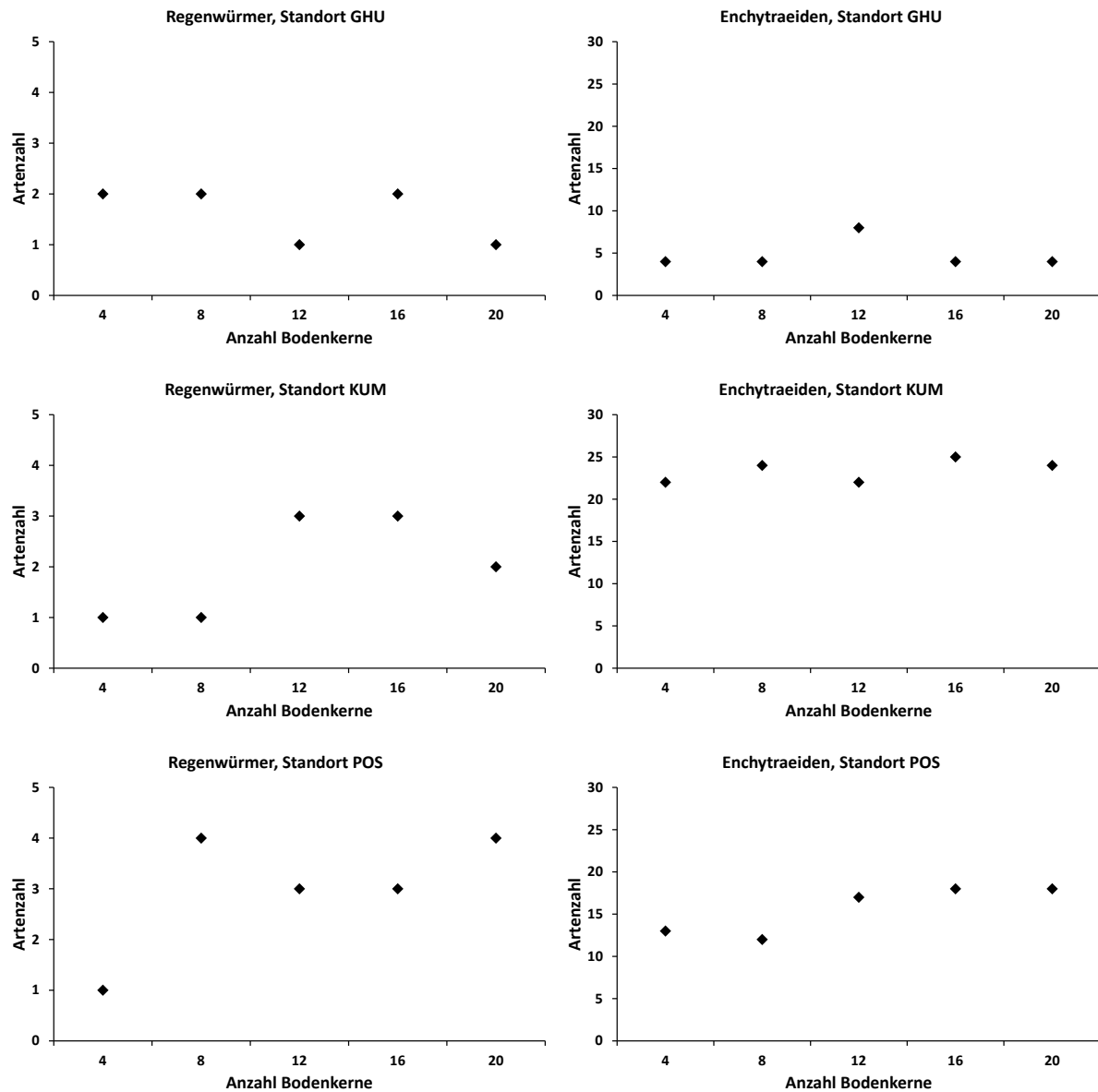
Tabelle 7: Lumbricidentaxa, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding am Standort Kümmelwiese (KUM) identifiziert wurden

Taxon	morph.	comDNA	eDNA 0 – 10 cm	eDNA 0 – 20 cm
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	*	*
<i>Aporrectodea tuberculata</i>		*	*	
<i>Dendrobaena octaedra</i>			*	
<i>Lumbricus rubellus</i>			*	*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*		
<i>Octolasion cyaneum</i>	*	*	*	*
<i>Octolasion tyrtaeum</i>			*	*
Summe	4	5	7	5

4.3.6.2.2 Vergleich der Anzahl einzelner Bodenkerne (4, 8, 12, 16, 20) für eDNA-Mischproben

Hinsichtlich der Anzahl der einzelnen Bodenkerne für die eDNA-Mischproben wurde kein eindeutiges Ergebnis für den besten Ansatz zum optimalen Artennachweis erhalten. Bei den Regenwürmern schwankte die Zahl der in den fünf eDNA-Mischproben pro Standort nachgewiesenen Arten zwischen einer und vier, aber es gab keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen der Zahl der einzelnen Bodenkerne pro Mischprobe und der Gesamtzahl der in dieser Probe nachgewiesenen Arten. Dasselbe gilt auch für die Enchytraeiden bei einer insgesamt deutlich höheren Anzahl von Arten pro Probe (Abbildung 15).

Abbildung 15: Artenzahl der Regenwürmer (links) und Enchytraeiden (rechts) in Abhängigkeit von der Anzahl einzelner Bodenkerne (4, 8, 12, 16, 20) für die eDNA-Mischproben an den drei Standorten der Pilotstudie (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, ECT Oekotoxikologie GmbH

4.3.6.2.3 Vergleich der Leistung von zwei DNA-Metabarcoding-Markern – COI und 16S – zum Artennachweis aus eDNA-Proben

Eine zusätzliche DNA-Metabarcoding-Analyse, die auf Enchytraeiden und Regenwürmer abzielte, wurde parallel am eDNA-Center der Universität Aarhus (AU eDNA-Center) durchgeführt, wobei eine kleine Teilmenge der im Rahmen der Pilotstudie gesammelten eDNA-Proben verwendet wurde (siehe Tabelle 5 im Abschnitt 4.3.6.1.7). Das Ziel dieser Analyse war es:

1. Die Fähigkeit eines 16S DNA-Metabarcoding-Markers zur Verbesserung der Artenerkennung aus eDNA-Proben im Vergleich zu COI zu testen, und
2. Die COI-DNA-Metabarcoding-Ergebnisse zweier verschiedener Labors (d. h. AllGenetics und AU eDNA-Center) zu vergleichen.

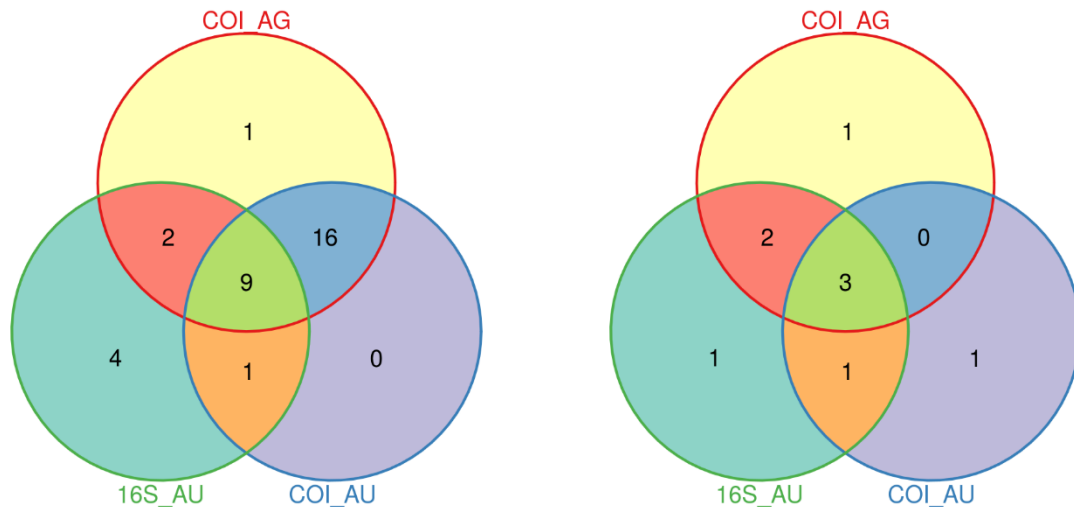
Der 16S-Marker bestand aus einem 70 bp langen Fragment des ribosomalen 16S-Gens, das bereits zur Charakterisierung von Regenwurmgemeinschaften aus Boden-DNA verwendet wurde (Bienert et al. 2012). Die kurze Länge des 16S-Markers, verglichen mit der des COI-Markers (313 bp), kann die PCR-Amplifikation von stark abgebauter extrazellulärer DNA in Umweltproben verbessern. Außerdem zielen die 16S-Primer auf hoch konservierte Regionen über alle Regenwurmartens hinweg, was PCR-Verzerrungen verringern und den Nachweis aller Zielarten gewährleisten kann. Da der 16S-Minibarcod jedoch weniger variable Positionen enthält als der längere COI, bietet er eine geringere taxonomische Auflösung und ist möglicherweise nicht in der Lage, eng verwandte Arten zu unterscheiden. Eine weitere wichtige Einschränkung des 16S-Markers ist die Unvollständigkeit der verfügbaren Referenzdatenbanken, die wesentlich kleiner sind als die des COI-Markers, insbesondere für Enchytraeiden.

Wie aus der Analyse der OTU-Tabellen hervorging, lieferte der 16S-Marker eine größere Anzahl von Sequenzierungs-Reads pro OTU als der COI-Marker. Diese Abweichung lässt sich hauptsächlich auf die unterschiedlichen Spezifitäten der 16S- und COI-Primersätze zurückführen. Von den gesamten Reads, die aus den eDNA-Proben mit dem 16S-Marker gewonnen wurden, konnten im Durchschnitt 64 % den Familien Enchytraeidae und Lumbricidae zugeordnet werden. Demgegenüber lag der Anteil der COI-Reads, die von den taxonomischen Zielgruppen in den eDNA-Proben erhalten wurden, zwischen 1 % und 95 %. Die Nicht-Ziel-COI-Reads entsprachen hauptsächlich anderen Metazoen (z. B. Arthropoden und Nematoden), nicht-metazoischen Eukaryoten und Bakterien.

Bei den in diesem Projekt verwendeten COI-Primern handelte es sich um eine modifizierte Version des universellen ‚Leray‘-Primersatzes für Metazoen, „mlCOLintF / jgHCO2198“ (Leray et al. 2013), der ausgiebig in DNA-Metabarcoding-Studien von eDNA aus Wasser-, Boden- und Sedimentproben verwendet wurde (z. B. Dopheide et al. 2019, Wangenstein et al. 2018). Aufgrund der Variabilität des COI-Gens enthält das ‚Leray‘ COI-Primerpaar ein hohes Maß an Degeneration (d. h. eine Kombination verschiedener Nukleotide an einer oder mehreren Positionen), um eine Anpassung an variable Bindungsstellen in verschiedenen Taxa zu ermöglichen. Im Enchytraeiden-Datensatz zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den Proben hinsichtlich der mit dem COI-Primer gewonnenen Ergebnisse, mit 86 % (25 von 29) gemeinsamen Arten in den Wiederholungen von AU (AU eDNA-Center) und AG (AllGenetics) (siehe Abbildung 16 links). Die Übereinstimmung war jedoch im Regenwurm-Datensatz deutlich geringer, bei dem nur 3 von 8 Arten in den AU- und AG-Analysen gemeinsam nachgewiesen wurden (Abbildung 16 rechts). Die Unterschiede in der Reproduzierbarkeit zwischen den beiden taxonomischen Gruppen hängen wahrscheinlich mit der Menge der Template-DNA in den eDNA-Extrakten zusammen. Die Menge der aus Bodenproben gewonnene DNA hängt von der Probenmenge, Biomasse und biologischen Aktivität ab (Chariton 2012, Pansu et al. 2015). Eine mögliche Erklärung ist daher, dass die geringere Konzentration von Regenwurm-eDNA in den PBS-Extrakten in Verbindung mit der unspezifischen Amplifikation von Nicht-Ziel-DNA durch die COI-Primer im Vergleich zu Enchytraeiden zu weniger konsistenten DNA-Metabarcoding-Ergebnissen über Proben und PCR-Wiederholungen hinweg führt. Dies wiederum bedeutet, dass möglicherweise eine größere Anzahl von eDNA-Proben und/oder PCR-Wiederholungen benötigt wird, um alle an einem Standort vorkommenden Regenwurmartens nachzuweisen. Darüber hinaus ist die Hauptquelle der eDNA von Regenwürmern in Böden extrazelluläre DNA, von der erwartet wird, dass sie stark abgebaut ist (Bienert et al. 2012). Die Fähigkeit von COI-Primern, Nicht-Ziel-DNA zu amplifizieren, kann die Unterrepräsentation von Regenwurmtaxa in den DNA-Metabarcoding Ergebnissen verstärken, da die PCR-Amplifikation auf weniger abgebaute eDNA-Templates ausgerichtet sein könnte, die von ganzen, lebenden Organismen (z. B. Bakterien und mikrobiellen Eukaryoten) in den Proben stammen. Im Gegensatz dazu schienen die höhere Spezifität und die kürzere Länge des

Fragments, das durch das 16S-Primerpaar amplifiziert wird, konsistentere Ergebnisse für alle Proben zu liefern.

Abbildung 16: Venn-Diagramme, die die Anzahl der ausschließlich und gemeinsam durch den 16S-Marker und den COI-Marker nachgewiesenen Enchytraeiden- (links) und Regenwurmarten (rechts) zeigen, wenn die DNA-Metabarcoding-Analysen im AU eDNA-Center oder bei AllGenetics (AG) durchgeführt wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Was den Artenreichtum betrifft, so wurde mit dem COI-Marker eine größere Anzahl von Enchytraeidenarten als mit dem 16S-Marker nachgewiesen, insbesondere am Standort KUM. Außerdem wurden einige der im 16S-Datensatz vorhandenen Arten, wie *Cognettia chlorophila*, *Fridericia nemoralis* oder *Mesenchytraeus flavus*, weder morphologisch noch durch COI-DNA-Metabarcoding nachgewiesen. In Anbetracht der Tatsache, dass die 16S-Referenzdatenbanken für Enchytraeiden-Taxa besonders unvollständig sind, könnten diese Arten das Ergebnis einer falschen Identifizierung von 16S-OTUs sein, für die in der Datenbank keine verwandten Sequenzen vorhanden sind. Umgekehrt wurde mit dem 16S-Marker eine höhere Anzahl von Regenwurmart pro Probe detektiert als mit COI. Wie bereits erwähnt, unterstreicht dieses Ergebnis den Gedanken, dass das DNA-Metabarcoding auf der Grundlage des COI-Markers einen größeren Probenahmeaufwand und/oder mehr technische PCR-Wiederholungen erfordert, um den Regenwurm-Artenreichtum in einem Gebiet zuverlässig zu bestimmen. Wie bei den vollständigen COI-Ergebnissen erkannte auch der 16S-Marker Regenwurmart, die morphologisch nicht identifiziert wurden, wie z. B. *Dendrobaena octaedra*, *Dendrobaena pygmaea*, *Dendrodrilus rubidus* oder *Octolasion tyrtaeum*. Die unabhängige Identifizierung dieser Arten durch beide Marker deutet darauf hin, dass das DNA-Metabarcoding den Nachweis von Taxa ermöglichen kann, die in der Gemeinschaft vorhanden sind, aber bei der Handsortierung und morphologischen Bestimmung übersehen wurden. Ein umfassender Vergleich der Artenlisten von Regenwürmern und Enchytraeiden, die durch morphologische Bestimmung, DNA-Metabarcoding von comDNA- und eDNA-Proben unter Verwendung der COI- und 16S-Marker gewonnen wurde, ist in Tabelle 8 bis Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 8: Liste der Regenwurmarten, die an der Probenahmestelle GHU mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 20 cm) unter Verwendung des COI-Markers

	MORPH	comDNA	eDNA
Marker		COI	COI
Bodentiefe [cm]	0 – 20	0 – 20	0 – 20
Anzahl Replikate	5	5	5
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	X	X	X
<i>Aporrectodea rosea</i>	X	X	X
<i>Lumbricus terrestris</i>	X	X	X
Anzahl Taxa	3	3	3

Tabelle 9: Liste der Regenwurmarten, die an der Probenahmestelle KUM mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 20 cm) unter Verwendung des COI-Markers und DNA-Metabarcoding einer Untergruppe von eDNA aus 0 – 5 cm Bodentiefe unter Verwendung des 16S-Markers

	MORPH	comDNA	eDNA	eDNA
Marker		COI	COI	16S
Bodentiefe [cm]	0 – 20	0 – 20	0 – 20	0 – 5
Anzahl Replikate	4	4	5	2
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	X	X	X	X
<i>Aporrectodea rosea</i>	X	X	X	X
<i>Dendrobaena octaedra</i>				X
<i>Dendrodrilus rubidus</i>				X
<i>Lumbricus rubellus</i>			X	
<i>Lumbricus terrestris</i>	X	X		
<i>Octolasion cyaneum</i>	X	X	X	
<i>Octolasion tyrtaeum</i>			X	
Anzahl Taxa	4	4	5	4

Tabelle 10: Liste der Regenwurmarten, die an der Probenahmestelle POS mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-(0 – 20 cm) unter Verwendung des COI-Markers und DNA-Metabarcoding einer Untergruppe von eDNA aus 0 – 10 cm Bodentiefe unter Verwendung des 16S-Markers

	MORPH	comDNA	eDNA	eDNA
Marker		COI	COI	16S
Bodentiefe [cm]	0 – 20	0 – 20	0 – 20	0 – 10
Anzahl Replikate	4	4	5	2
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	X	X	X	X
<i>Aporrectodea rosea</i>		X	X	X
<i>Dendrobaena octaedra</i>			X	X
<i>Dendrobaena pygmaea</i>			X	
<i>Dendrobaena</i> sp.				X
<i>Dendrodrilus rubidus</i>			X	X
<i>Lumbricus rubellus</i>				X
<i>Lumbricus terrestris</i>	X	X	X	
<i>Octolasion tyrtaeum</i>				X
Anzahl Taxa	2	3	6	7

Tabelle 11: Liste der Enchytraeidenarten, die an der Probenahmestelle GHU mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 10 cm) unter Verwendung des COI-Markers

	MORPH	comDNA	eDNA
Marker		COI	COI
Bodentiefe [cm]	0 – 10	0 – 10	0 – 10
Anzahl Replikate	20	1	11
<i>Cernosvitoviella</i> sp.	X		
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	X	X	X
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	X	X	
<i>Enchytronia christenseni</i>	X	X	
<i>Enchytronia parva</i>		X	X
<i>Fridericia bulboides</i>	X	X	
<i>Fridericia christeri</i>	X	X	X
<i>Fridericia galba</i>	X	X	
<i>Fridericia isseli</i>	X	X	
<i>Fridericia sylvatica</i>			X
<i>Henlea perpusilla</i>	X	X	X
<i>Marionina mendax</i>	X	X	
Anzahl Taxa	12	10	5

Tabelle 12: Liste der Enchytraeidenarten, die an der Probenahmestelle KUM mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 10 cm) unter Verwendung des COI-Markers und DNA-Metabarcoding einer Untergruppe von eDNA aus 0 – 5 cm Bodentiefe unter Verwendung des 16S-Markers

	MORPH	comDNA	eDNA	eDNA
Marker		COI	COI	16S
Bodentiefe [cm]	0 – 10	0 – 10	0 – 10	0 – 5
Anzahl Replikate	20	16	12	2
<i>Achaeta affinis</i>	X	X	X	
<i>Achaeta bohemica</i>	X	X	X	
<i>Achaeta danica</i>	X	X	X	
<i>Achaeta unibulba</i>		X	X	
<i>Buchholzia appendiculata</i>	X	X	X	
<i>Cernosvitoviella</i> sp.	X	X		
<i>Cognettia chlorophila</i>	X	X	X	X
<i>Cognettia varisetosa</i>	X	X	X	X
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	X	X		
<i>Enchytraeus christenseni</i>	X	X		
<i>Enchytraeus lacteus</i>	X	X		
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	X	X		
<i>Enchytronia christenseni</i>	X		X	
<i>Enchytronia holochaeta</i>	X	X	X	
<i>Enchytronia parva</i>	X	X	X	X
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	X	X	X	
<i>Fridericia benti</i>			X	
<i>Fridericia bisetosa</i>	X	X	X	
<i>Fridericia connata</i>	X	X	X	
<i>Fridericia dura</i>		X	X	X
<i>Fridericia galba</i>	X	X	X	
<i>Fridericia nemoralis</i>				X

	MORPH	comDNA	eDNA	eDNA
<i>Fridericia ratzeli</i>	X	X	X	X
<i>Fridericia ulrikae</i>	X	X	X	
<i>Fridericia waldenstroemi</i>		X		
<i>Henlea perpusilla</i>	X	X		
<i>Marionina argentea</i>		X	X	
<i>Marionina deminuta</i>	X			
<i>Marionina mendax</i>	X	X	X	
<i>Mesenchytraeus flavus</i>				X
<i>Oconnorella tubifera</i>	X	X	X	X
<i>Stercutus niveus</i>	X		X	
Anzahl Taxa	25	26	22	8

Tabelle 13: Liste der Enchytraeidenarten, die an der Probenahmestelle POS mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden: morphologische Identifizierung (MORPH), DNA-Metabarcoding von comDNA, DNA-Metabarcoding von eDNA-Proben (0 – 10 cm) unter Verwendung des COI-Markers und DNA-Metabarcoding einer Untergruppe von eDNA aus 0 – 10 cm Bodentiefe unter Verwendung des 16S-Markers

	MORPH	comDNA	eDNA	eDNA
Marker		COI	COI	16S
Bodentiefe [cm]	0 – 10	0 – 10	0 – 10	0 – 10
Anzahl Replikate	20	18	12	2
<i>Achaeta affinis</i>	X	X	X	
<i>Achaeta bibulba</i>		X	X	X
<i>Achaeta camerani</i>			X	
<i>Achaeta danica</i>		X	X	
<i>Buchholzia appendiculata</i>	X	X	X	
<i>Cognettia chlorophila</i>	X	X	X	X
<i>Cognettia varisetosa</i>	X	X	X	X
<i>Enchytraeus bigeminus</i>		X		
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	X	X	X	
<i>Enchytraeus lacteus</i>				X

	MORPH	comDNA	eDNA	eDNA
<i>Enchytraeus japonensis</i>		X		
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	X	X	X	X
<i>Enchytronia parva</i>	X	X	X	X
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	X			
<i>Fridericia benti</i>		X	X	
<i>Fridericia bisetosa</i>	X	X	X	X
<i>Fridericia connata</i>	X	X	X	
<i>Fridericia dura</i>	X	X	X	X
<i>Fridericia nemoralis</i>				X
<i>Fridericia ratzeli</i>				X
<i>Fridericia striata</i>	X			
<i>Marionina clavata</i>	X			
<i>Mesenchytraeus flavus</i>				X
<i>Oconnorella cambrensis</i>	X	X	X	X
<i>Oconnorella tubifera</i>	X	X	X	X
<i>Stercutus niveus</i>		X	X	
Anzahl Taxa	15	18	17	13

4.3.7 DNA-Metabarcoding-Analyse von eDNA-Bodenextrakten und comDNA-Proben beim Unterauftragnehmer Universität Aarhus

4.3.7.1 Material und Methoden

4.3.7.1.1 Proben für DNA-Isolation

Bei der Universität Aarhus (AU) gingen im Mai 2020 204 Proben von der ECT nach ihrer Extraktion unter Verwendung des Phosphatpuffers ein. Die Proben umfassten sowohl diejenigen für die Lumbriciden für eine Bodentiefe von 0 bis 20 cm als auch die für Collembolen und Enchytraeiden, jeweils für eine Bodentiefe von 0 bis 5 und 5 bis 10 cm. Die Proben wurden nach ihrer Ankunft zunächst bei -18 °C gelagert und dann ausgewählte (Teilproben) später mit dem „NucleoSpin® Soil“ Kit (Macherey-Nagel 2017) unter Einhaltung der Anweisungen des Herstellers isoliert, aber ohne den Lysis-Schritt wie von Taberlet et al. (2012) und Pansu et al. (2015) empfohlen. Der DNA-Gehalt wurde mittels fluorometrischer Quantifizierung mit Qubit analysiert. Insgesamt wurden 77 DNA-Messungen durchgeführt. Wenn der DNA-Gehalt zu hoch war, wurden die Proben fünfmal verdünnt, um einen Wert von 20 ng DNA/µl zu erhalten. Insgesamt 15 Lumbriciden- (Tiefe 0 – 20 cm) und 30 Enchytraeidenproben (0 – 5 cm; 5 – 10 cm) wurden zur eDNA-Analyse an AllGenetics versandt.

AU erhielt von CloverStrategy im März 2020 60 Proben von den drei Standorten der Pilotstudie aus einer Bodentiefe von 0 bis 5 bzw. 5 bis 10 cm mit Mikroarthropoden in 96 % Ethanol in Eppendorf-Röhrchen. Nach dem Abzentrifugieren der Mikroarthropoden wurde überschüssiges Ethanol entfernt und das Tierpellet in die „NucleoSpin® Bead Tubes Typ A“ überführt, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, dass alle Tiere eingeschlossen waren. Ansonsten wurde wie oben für die eDNA beschrieben vorgegangen. Das bedeutet, dass die DNA-Isolierung aus diesen Collembolen-Proben ebenfalls mit dem „NucleoSpin® Soil“ Kit erfolgte.

4.3.7.1.2 Erstellung einer DNA-Metabarcoding Bibliothek und Sequenzierung

Es wurden bislang mehrere Metabarcodes für Collembolen vorgeschlagen (Arribas et al. 2016, de Groot et al. 2016 Saitoh et al. 2016, Taberlet et al., 2018). Collembolen comDNA- und eDNA-Bibliotheken wurden durch Amplifikation eines 158-bp-Fragments der COI mit den Primern „Mit-eMinBarF7“ (5' CAT CGI TTY RTI ATR ATT TTT TTY ATA G 3') und „MiteMinBarR4“ (5' G GAT AHA CWG TTC AHC CWG TSC C 3') (de Groot et al. 2016) erzeugt. „Nextera transposase adapters“ wurden an die 5'-Enden der PCR-Primer angehängt.

PCRs wurden in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt, das 1 µl Template-DNA, 0,5 µl 10 µM der Primer, 12 µl „AccuPrime SuperMix II“ (incl. Polymerase), 0,5 µl bovines Serumalbumin (BSA) 10 mg/mL und Reinstwasser (SigmaAldrich) 5,5 µl, enthielt. Die Reaktionsmischung wurde wie folgt inkubiert: anfängliche Denaturierung bei 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 5 Zyklen von 95 °C für 40 Sekunden, Primerhybridisierung bei 43 °C für 40 Sekunden, 72 °C für 60 Sekunden. Dann wurde mit einem neuen Durchlauf fortgesetzt mit 35 Zyklen von 95 °C für 40 Sekunden, Primerhybridisierung bei 49 °C für 40 Sekunden, 72 °C für 60 Sekunden und einem abschließenden Elongationsschritt bei 72 °C für 10 Minuten. Die Anfügung der Indexsequenzen, die für das Multiplexen verschiedener Bibliotheken im gleichen Sequenzierpool erforderlich sind (PCR#2), waren für eine zweite PCR-Runde geplant, jedoch produzierte die PCR#1 keine ausreichenden Amplikons, um den PCR#2-Schritt durchzuführen.

4.3.7.2 Ergebnisse

Bei den Collembolen erzeugten die gewählten „MiteMinBar“-Primer (De Groot et al. 2016) aus unbekanntem Gründen keine Amplicons, so dass für die Pilotstudie keine Collembolen Metabarcoding-Daten generiert werden konnten. Daher wurde beschlossen, für die Hauptstudie die 313 bp ‚Leray‘-COI-Primer zu verwenden, ähnlich derer, die auch für Regenwürmer und Enchytraeiden verwendet wurden, da diese ebenfalls in der Lage sind, Collembolen zu amplifizieren.

4.3.8 Fazit aus der Pilotstudie

Aufgrund der vieldeutigen Ergebnisse der Pilotstudie wurde beschlossen, keine Reduktion der Probenzahlen für die verbleibenden 22 Standorte vorzunehmen, also insbesondere für die eDNA die maximale Anzahl von 20 einzelnen Bodenkernen zur Herstellung einer Mischprobe pro Standort zu verwenden. Auf eine Unterteilung der Tiefenstufen wurde hingegen aufgrund des gemessenen am Aufwand geringen Informationsgewinns in der Folge verzichtet. Für jede Methode wurde der beste Ansatz in Bezug auf die zu verwendenden Primer, die Vereinigung von Proben und die Anzahl der PCR-Aliquots gewählt, um einerseits die größtmögliche Anzahl von Arten nachzuweisen und gleichzeitig einen angemessenen experimentellen Aufwand zu betreiben:

- ▶ Für die comDNA-Proben wurde COI amplifiziert, unter Verwendung desselben Primers für alle drei Organismengruppen.
- ▶ Für die eDNA-Proben der Regenwürmer wurde 16S verwendet, da dieser Marker besser für die potenziell degradierte extrazelluläre DNA geeignet ist.

- ▶ Für die eDNA-Proben von Enchytraeiden und Collembolen wurde COI verwendet, da die Proben nicht nur extrazelluläre DNA, sondern auch ganze Individuen und damit eine höhere Konzentration des COI-Markers enthalten und da die 16S-Referenzdatenbanken noch nicht umfassend genug sind. Die Verwendung von COI ermöglicht zudem die Unterscheidung von Unterarten, d. h. hier genetisch unterschiedliche Linien innerhalb einer Art, welche sich biologisch und ökologisch voneinander unterscheiden können und daher für die bodenbiologische Beurteilung eines Standorts von Bedeutung sein können. Im Gegensatz dazu ist 16S aufgrund seiner geringeren Länge für diesen Zweck nicht geeignet.
- ▶ Die comDNA-Proben wurden pro Organismengruppe und Standort vereinigt, und eine Mischprobe aus einem (Collembolen) bzw. drei (Oligochäten) PCR-Aliquoten wurde sequenziert. Ein Problem bei der Zusammenlegung der Proben könnte darin bestehen, dass bei Enchytraeiden mit geringer Biomasse der Nachweis unzureichend sein kann. Dies ist möglicherweise eine Unzulänglichkeit der Methode und muss ggf. beim Vergleich der Ergebnisse der Bestimmungsmethoden diskutiert werden.

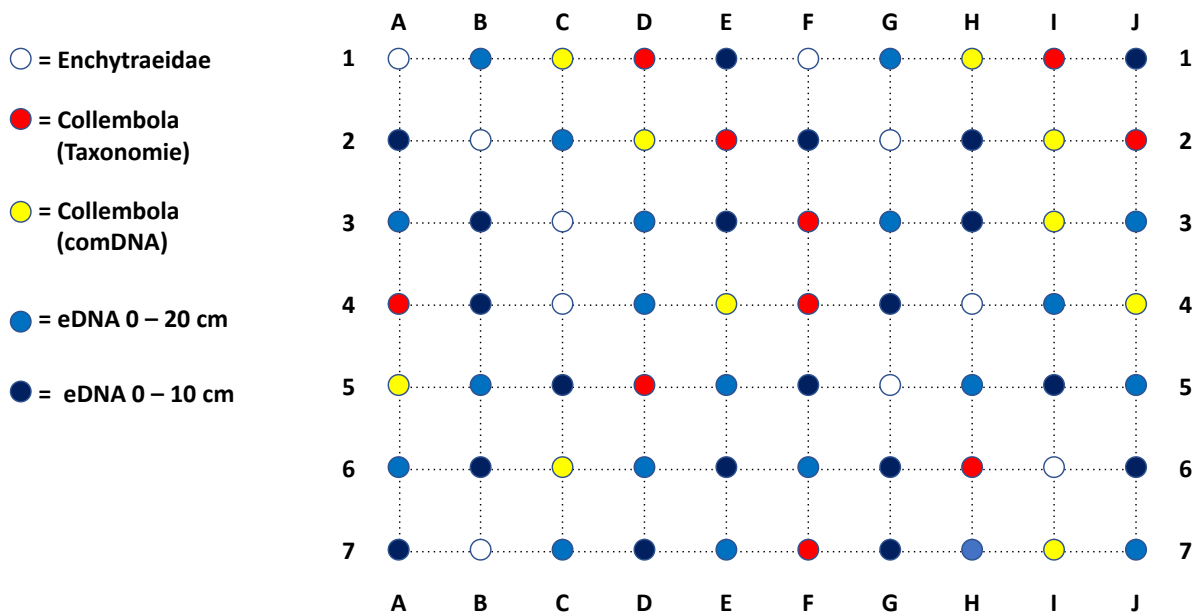
4.4 Hauptstudie

4.4.1 Probenahme und Arbeitsablauf

Der Projektfortschritt wurde durch die Pandemieeindämmungsmaßnahmen stark verzögert. Die ersten Probenahmen für die Pilotstudie fanden bereits im Herbst 2018 statt. Die Hauptstudie wurde 2019 begonnen, aber es konnten im gesamten Jahr 2020 keine Proben genommen werden. Die letzten Proben wurden im Herbst 2021 genommen (siehe Tabelle 4). Sofern nicht im Folgenden abweichend beschrieben entsprach die methodische Vorgehensweise derer der Pilotstudie, insbesondere bezüglich der Erfassung der Tiere im Feld, der Probenaufbereitung und morphologischen Bestimmung, der Herstellung der comDNA-Proben, der eDNA-Extraktion aus den Bodenproben sowie des generellen Arbeitsablauf bei der Verteilung und Bearbeitung der Proben.

Als Konsequenz aus der basierend auf den Ergebnissen der Pilotstudie gewählten Vorgehensweise wurden insgesamt 70 Bodenkerne (Ø 5 cm) pro Standort entnommen: 10 Proben für Enchytraeidae (0 – 10 cm für Morphologie und comDNA), 20 für Collembola (0 – 10 cm, je 10 für Morphologie und comDNA) und 40 für eDNA (20 x 0 – 20 cm für Lumbricidae und 20 x 0 – 10 cm für Enchytraeidae und Collembola) (Abbildung 17).

Abbildung 17: Probenahmeschema der Bodenkerne in der Hauptstudie. Abstand der Punkte: 1 m



Quelle: eigene Darstellung, ECT Oekotoxikologie GmbH

Die basierend auf den Ergebnissen der Pilotstudie gewählte Vorgehensweise, inklusive der Zusammenführung der comDNA-Proben bei gleichzeitiger Maximierung der Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Arten mit geringer Biomasse oder seltenen Arten für die Oligochaäten, ist im Folgenden beschrieben (Tabelle 14):

1. Die comDNA-Proben wurden vor der DNA-Extraktion nach Organismengruppen und Standorten zusammengefasst. Auf diese Weise wurde eine Gesamtzahl von 21 Regenwurm- (an einem Standort waren keine Regenwürmer vorhanden) und 22 Enchytraeiden- bzw. Collembolen-comDNA-Proben als Input für die DNA-Extraktion.
2. Von den vier Replikaten der bei der ECT pro eDNA-Probe hergestellten PBS-Extrakte, die an AU gesendet wurden, wurde je eines der DNA-Extraktion mittels „NucleoSpin® Soil“ Kit unterzogen. Der eDNA-Extrakt für Collembolen und Enchytraeiden wurde geteilt, ein Teil an AG geschickt, und die Proben dann am jeweiligen Standort für die PCR verwendet.
3. Für die Collembolen wurde eine, für die Oligochaäten drei PCR-Wiederholungen pro Probe durchgeführt, sowohl für die comDNA- als auch für die eDNA-Proben.
4. Die drei PCR-Replikate pro Probe für die Regenwürmer bzw. Enchytraeiden wurden vor der Sequenzierung vereinigt und mit denselben Indizes oder ‚Probenidentifikatoren‘ gekennzeichnet.
5. Auf diese Weise ergab sich ein einziger Sequenzierungsdatensatz pro Organismengruppe und Probenahmestelle, sowohl für die comDNA- als auch für die eDNA-Proben.

Tabelle 14: Anzahl der Proben bei Zusammenführung von comDNA-Proben bei gleichzeitiger Maximierung der Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Arten mit geringer Biomasse oder seltenen Arten

	Erhaltene Proben	DNA-Extraktion	PCR1	PCR2 (Indizierung)	Sequenzierung	Bioinformatische Analyse
Regenwürmer						
comDNA	97	21	63 (COI) (3 Replikate)	21	21	21
eDNA	22	22	66 (16S) (3 Replikate)	22	22	22
Enchytraeiden						
comDNA	199	22	66 (COI) (3 Replikate)	22	22	22
eDNA	22	22	66 (COI) (3 Replikate)	22	22	22
Collembolen						
comDNA	220	22	22 (COI)	22	22	22
eDNA	88 (4 Replikate)	22	22 (COI)	22	22	22

4.4.2 DNA-Metabarcoding-Analyse von eDNA-Bodenextrakten und comDNA-Proben für Lumbriciden und Enchytraeiden beim Unterauftragnehmer AllGenetics

4.4.2.1 Probenannahme und DNA-Isolierung

Die erhaltenen comDNA-Proben wurden pro Probenahmestelle gepoolt, um eine finale Anzahl von 21 Lumbricidenproben (an einem Standort wurden keine Individuen gefunden) und 22 Enchytraeidenproben für die DNA-Analysen der Gemeinschaft zu erhalten. Pro Standort wurde von jeder Regenwurm-Gewebeprobe wurde ein ca. 4 mm² großes Stück aus der Körperwand herausgeschnitten und für die DNA-Extraktion in so wenige Röhrchen wie möglich zusammengefasst. Die DNA-Extraktion wurde mit dem „E.Z.N.A. DNA/RNA Isolation Kit“ (Omega Bio-tek, Norcross, USA) durchgeführt. Aufgrund der Menge des Gewebes wurde bei den meisten Proben in jedem Schritt die doppelte der üblichen Menge an Reagenz hinzugefügt. Die Lyse wurde über Nacht bei 55 °C durchgeführt. Bevor die Probe durch die Minisäule geleitet wurde, wurden die Aufschlüsse gepoolt und in einem 15-ml-Falconröhrchen gemischt. Die DNA wurde in einem Endvolumen von 100 µl Elutionspuffer resuspendiert. Bei jeder DNA-Extraktion wurde eine Blindprobe mitgeführt und wie eine normale Probe behandelt, um auf eine Kreuzkontamination zu überprüfen. Die DNA-Konzentration in jedem Extrakt wurde mit dem „Qubit High Sensitivity dsDNA Assay“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

4.4.2.2 Vorbereitung und Sequenzierung von DNA-Metabarcoding-Bibliotheken

DNA-Metabarcoding-Bibliotheken wurden mit zwei verschiedenen Primer-Sets und unter verschiedenen Bedingungen hergestellt. Die comDNA-Bibliotheken von Lumbriciden und Enchytraeiden sowie die eDNA-Bibliotheken von Enchytraeiden wurden mithilfe einer modifizierten Version des ‚Leray‘-Primerpaars (Leray et al. 2013) hergestellt, das auf ein 313-bp-Fragment des COI-Gens abzielt:

- ▶ Vorwärtsprimer: „MetaSOL mlCOIintF“ (5' GGW ACW GGD TGA ACW GTW TAY CCH CC 3');
- ▶ Rückwärtsprimer: „MetaSOL HCO21982“ (5 TAW ACT TCW GGG TGW CCR AAR AAY CA 3');

- ▶ An diese Primer wurden am 5'-Ende die Sequenzen der Illumina-Sequenzierungsprimer angehängt.

Lumbriciden eDNA-Bibliotheken wurden mit dem Primerpaar „ewD“ / „ewE“ (Bienert et al. 2012) erstellt, das ein Fragment von etwa 60 bp des mitochondrialen 16S ribosomalen Gens amplifiziert:

- ▶ Vorwärtsprimer: „ewD“ (5' ATT CGG TTG GGG CGA CC 3');
- ▶ Rückwärtsprimer: „ewE“ (5' CTG TTA TCC CTA AGG TAG CTT 3');
- ▶ An diese Primer wurden am 5'-Ende die Sequenzen der Illumina-Sequenzierungsprimer angehängt.

Die PCRs wurden in einem Endvolumen von 12,5 µl durchgeführt, das 2,5 µl Template-DNA (1:10 verdünnt für comDNA-Echytraeiden und comDNA-Regenwürmer), 0,5 µM der Primer, 6,25 µl „Supreme NZYTaQ II 2× Green Master Mix“ (NZYTech, Lissabon, Portugal), CES 1x, und Reinstwasser bis zu 12,5 µl enthielt. Die Reaktionsmischungen wurden wie folgt inkubiert: erster Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 min, gefolgt von 35 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primerhybridisierung bei 53 °C („Leray“-Primerpaar) bzw. 48 °C („Bienert“-Primerpaar) für 45 s, 72 °C für 45 s, und ein abschließender Elongationsschritt bei 72 °C für 7 Minuten.

Die Produkte dieser ersten Reaktion wurden unter Verwendung der „Mag-Bind RXNPure Plus“ Magnetbeads (Omega Bio-tek, Norcross, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Die Oligonukleotid-Indizes, die für das Multiplexing verschiedener Bibliotheken im selben Sequenzierpool erforderlich sind wurden in einer zweiten PCR-Runde mit identischen Bedingungen, aber mit nur 5 Zyklen und 60 °C als Hybridisierungstemperatur, angefügt. Ein schematischer Überblick über den Prozess der Bibliotheksvorbereitung findet sich in Abbildung 12 (Vierna et al. 2017). Eine Negativkontrolle, die keine DNA enthielt, war in jeder PCR-Runde enthalten, um auf eine Kontamination während der Bibliotheksvorbereitung zu prüfen. Die Bibliotheken wurden auf 2%igen Agarosegelen mit „Green-Safe“ (NZYTech, Lissabon, Portugal) gefärbt und unter UV-Licht abgebildet, um die Größe der Bibliothek zu überprüfen. Die fertigen Bibliotheken wurden mit den „Mag-Bind RXNPure Plus“ Magnetbeads (Omega Bio-tek, Norcross, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Anschließend wurden die Bibliotheken in äquimolaren Mengen entsprechend den Quantifizierungsdaten des „Qubit dsDNA HS Assay“ (Thermo Fisher Scientific Waltham, USA) vereinigt und mittels eines „MiSeq PE300“ (Illumina, San Diego, USA) sequenziert.

4.4.2.3 Qualitätskontrolle von Sequenzierungsdaten

Illumina Paired-End-Rohdaten bestehen aus Vorwärts- (R1) und Rückwärts-Reads (R2), die in separaten Dateien gespeichert sind, die nach Bibliotheken sortiert sind und die Qualitätsbewertungen der Reads enthalten. Die Qualität der FASTQ-Dateien wurde mit der Software „FastQC“ (Andrews 2010) bewertet und die Ausgabe mit MultiQC (Ewels et al. 2016) zusammengefasst.

4.4.2.4 Verarbeitung von Sequenzierungsdaten und Ableitung von ASVs

Die erhaltenen COI- und 16S-Amplicon-Reads wurden separat mit dem Werkzeug „DADA2“ (Callahan et al. 2016), implementiert in „QIIME 2“ (Version 2021.4) verarbeitet (Bolyen et al. 2019), um die PCR-Primer zu entfernen, die Reads nach ihrer Qualität zu filtern, zu entrauschen, die Vorwärts- und Rückwärts-Reads zusammenzuführen, chimärische Reads zu entfernen und die resultierenden Sequenzen zu ASVs zu clustern. Aufgrund der hohen Längenvariabilität der 16S-Region und der Tatsache, dass die Sequenzierungs-Reads länger waren als die Amplicons, könnte nicht-biologische DNA (Primer, Indizes und Sequenzierungsadapter) an den Enden der

Reads erscheinen. Daher wurde zunächst „Cutadapt“ (Martin 2011) verwendet, um Primer- und/oder Adaptersequenzen zu entfernen. Der erste Schritt in der „DADA2“-Pipeline besteht darin, die Daten zu beschneiden und zu filtern, um niedrige Qualitätsscores zu vermeiden. In diesem Fall wurden nach Überprüfung der Read-Qualitätsprofile die 16S-Reads an Position 60 sowohl für die Vorwärts- als auch Rückwärts-Reads abgeschnitten. Im Falle des COI-Datensatzes wurden die Vorwärts-Reads an Position 239 und die Rückwärts-Reads an Position 187 abgeschnitten. Anschließend wurden die Fehlerraten aus dem Datensatz erlernt, um zu entauschen, wobei das parametrische Fehlermodell in „DADA2“ genutzt wurde. Vor der Inferenz von Sequenzvarianten wurde der Datensatz derepliziert, d. h. alle identischen Reads wurden zu eindeutigen Reads kombiniert, um den Rechenaufwand zu reduzieren. Anschließend wurden diese dereplizierten Vorwärts- und Rückwärts-Reads zur Ableitung von ASVs mit dem „core sample inference“ Algorithmus (Callahan et al. 2016) verwendet. Die entsprechenden R1- und R2-Reads wurden durch Überlappung von mindestens 12 identischen Basenpaaren zu Paaren zusammengeführt. Die „DADA2“-Pipeline umfasst einen letzten Schritt, um die Auswirkungen von Artefakten im Datensatz zu verringern. Diese Artefakte, wie z. B. Chimären, entstehen bei der PCR und der Sequenzierung und könnten zu einer Überschätzung der Anzahl der zusammengefassten ASVs führen, wenn sie nicht entfernt werden. Die resultierende Ausgabe der „DADA2“-Pipeline ist eine Tabelle, die die Anzahl der Vorkommen jeder beobachteten ASV in jeder Probe enthält. Diese Tabelle kann ohne weiteres für die taxonomische Zuordnung verwendet werden.

4.4.2.5 Verarbeitung der Negativkontrollproben

Im Rahmen der PBS-Extraktion der eDNA-Proben (siehe Abschnitt 4.3.5) wurden Negativkontrollproben (sauberer PBS-Puffer) gesammelt, um mögliche Kontaminationen, die durch die Ausrüstung oder während der Handhabung der Proben eingebracht wurden, zu detektieren. Diese Negativkontrollen wurden während des gesamten DNA-Metabarcoding-Workflows zusammen mit den Testproben bearbeitet. Darüber hinaus wurden bei jeder Runde der DNA-Extraktion und PCR Negativkontrollen einbezogen, um auf eine Kreuzkontamination während der Nasslaborexperimente zu prüfen. In der bioinformatischen Analyse wurden die COI- und 16S-Sequenzierungsdaten unter Berücksichtigung aller dieser Negativkontrollen verarbeitet. Als allgemeines Kriterium wurden alle ASVs entfernt, die zu den taxonomischen Zielgruppen (Lumbricidae und Enchytraeidae) gehörten und die in einer Negativkontrolle mit einer Anzahl von Reads gleich oder höher als die niedrigste Anzahl Reads in einer Testprobe vorhanden waren.

4.4.2.6 Taxonomische Zuordnung

Die taxonomische Zuordnung der einzelnen ASVs erfolgte anhand verschiedener Datenbanken:

- ▶ „MIDORI Reference 2“, basierend auf „GenBank“ Release 249 (April 2022), für den 16S-Datensatz
- ▶ „MetaCOXI“ (Balech et al. 2022), kombiniert mit einer lokalen Datenbank von COI-Referenzsequenzen, die im Rahmen des Projekts „EcoFINDERS“ (Griffiths et al. 2016) erhalten wurden, für den COI-Datensatz.

Für die Enchytraeidae standen außerdem zwei weitere Datensätze zur Verfügung: ein sehr umfangreicher, erstellt im Rahmen der schwedischen und norwegischen Taxonomie-Initiativen, der in Kürze veröffentlicht werden wird (C. Erséus, pers. comm.), und ein kleiner Datensatz mit Sequenzen aus Material dieses Projektes, der explizit zur Vervollständigung der Referenzbibliothek erstellt wurde (11 morphologisch identifizierte Taxa, für die noch keine Referenzsequenzen verfügbar waren).

Die ASV-Sequenzen wurden mit den Referenzdatenbanken verglichen, wobei der in „QIIME 2“ (Bokulich et al. 2018) implementierte „feature-classifier classifyconsensus-vsearch“-Ansatz verwendet wurde. Es wurde ein Sequenzähnlichkeits-Schwellenwert von 88 % festgesetzt (siehe Abschnitt 4.3.6.1.4) und die Option ‚top-hits-only‘ aktiviert, um nur die Top-Treffer (d. h. diejenigen, die den höchsten Identitäts-Prozentsatz aufwiesen) zwischen den Abfrage- und Referenzsequenzsätzen abzurufen. Die sich daraus ergebende Tabelle enthält die Anzahl der in jeder Probe gefundenen Sequenzen der einzelnen ASVs und die zugehörigen taxonomischen Informationen. Anschließend wurden auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Tabelle mehrere verschiedene Filter angewandt. Singletons, d. h. ASVs, die nur eine Sequenz im gesamten Datensatz enthielten, wurden ausgeschlossen. In DNA-Metabarcoding-Studien wurde beobachtet, dass ein geringer Prozentsatz der Reads einer bestimmten Bibliothek fälschlicherweise einer anderen Bibliothek zugeordnet werden kann. Dieses Phänomen, das als Mistagging (auch Tag Jumping, Index Hopping oder Index Jumping) bezeichnet wird, ist das Ergebnis einer falschen Zuordnung der Indizes während der Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und/oder den Demultiplexing-Schritten (Bartram et al. 2016, Esling et al. 2015, Guardiola et al. 2016, Illumina, 2017). Um diese Verzerrungen zu korrigieren, wurden ASVs, die mit einer Häufigkeit von weniger als 0,01 % in jeder Probe auftraten entfernt. Nach Anwendung dieser Qualitätsfilter auf die rohen ASV-Tabellen enthielten die Negativkontrollproben keine Sequenzen mehr. Daher wurden die Negativkontrollen aus den endgültigen ASV-Tabellen entfernt und anschließend die nachgeschalteten Analysen durchgeführt. Die endgültige gefilterte ASV-Tabelle wurde in eine „Biological Observation Matrix“-Datei (.biom) umgewandelt, die direkt in R 3.6.1 (R-Team-Core 2019) importiert wurde, wobei das Paket phyloseq 1.24.2 (McMurdie & Holmes 2013) verwendet wurde, um die Ergebnisse der Analysen darzustellen.

4.4.3 DNA-Metabarcoding-Analyse von eDNA-Bodenextrakten und comDNA-Proben für Collembolen beim Unterauftragnehmer Universität Aarhus

4.4.3.1 Proben für DNA-Isolation

Bei der Universität Aarhus (AU) gingen im Februar 2022 220 Proben von der ECT nach ihrer Extraktion unter Verwendung des Phosphatpuffers ein. Die Proben umfassten sowohl diejenigen für die Lumbriciden für eine Bodentiefe von 0 bis 20 cm als auch die für Collembolen und Enchytraeiden, jeweils für eine Bodentiefe von 0 bis 10 cm. Die Proben wurden nach ihrer Ankunft zunächst bei -18 °C gelagert und dann alle 10 Wiederholungen pro Standort einer „NucleoSpin® Soil“ Kit (Macherey-Nagel 2017) DNA-Extraktion unterzogen, anschließend gepoolt und eine Untprobe von 50 µl weiterverarbeitet. Ansonsten wurde wie in Abschnitt 4.3.7.1.1 beschrieben vorgegangen. Der DNA-Gehalt wurde mittels fluorometrischer Quantifizierung mit Qubit analysiert. Insgesamt wurden 47 DNA-Messungen durchgeführt. Wenn der DNA-Gehalt zu hoch war, wurden die Proben zwei- bis viermal verdünnt, um einen Wert von 20 ng DNA/µl zu erhalten. Insgesamt 22 Lumbriciden- (Tiefe 0 – 20 cm) und 22 Enchytraeidenproben (0 – 10 cm) wurden zur eDNA-Analyse an AllGenetics versandt.

AU erhielt von CloverStrategy 220 Proben von den 22 Standorten und aus einer Bodentiefe von 0 bis 10 cm mit Mikroarthropoden in 96 % Ethanol in „NucleoSpin® Bead Tubes Typ A“ Röhrchen in zwei Lieferungen, von denen die letzte im Mai 2022 eintraf. Überschüssiges Ethanol wurde entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich alle Tiere noch am Boden des Röhrchens mit den Kügelchen („Beads“) befanden. Ansonsten wurde wie oben für eDNA beschrieben vorgegangen, was bedeutet, dass DNA aus diesen Collembolen-Proben unter Verwendung der restlichen Bestandteile des „NucleoSpin® Soil“ Kits isoliert wurde.

4.4.3.2 Erstellung einer DNA-Metabarcoding Bibliothek und Sequenzierung

Collembolen comDNA- und eDNA-Bibliotheken wurden durch Amplifikation des 313-bp-Fragments der COI mit den Primern „m1COIintF“ (5' GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC 3') und „jgHCO2198“ (5' TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA 3') (Leray et al. 2013) erzeugt. „Nextera Illumina transposase adapters“ wurden an die 5'-Enden der PCR-Primer angehängt.

PCR#1 wurde in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt, das 5 µl Template-DNA, 0,5 µl 10 µM Primer, 12,5 µl „PCR Ultra Mix 2X“ (incl. Polymerase), 0,5 µl BSA 10 mg/mL und Reinstwasser (SigmaAldrich) 6 µl, enthielt. Die Reaktionsmischung wurde wie folgt inkubiert: anfängliche Denaturierung bei 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 10 Zyklen von 95 °C für 30 Sekunden, Primerhybridisierung bei 50 °C für 30 Sekunden, 72 °C für 60 Sekunden. Dann folgten 10 Zyklen von 95 °C für 30 Sekunden, Primerhybridisierung bei 52 °C für 30 Sekunden, 72 °C für 60 Sekunden. Der letzte Zyklus betrug 15 Zyklen von 94 °C für 30 Sekunden, Primerhybridisierung bei 54 °C für 30 Sekunden, 72 °C für 60 Sekunden und einem abschließenden Elongationsschritt bei 72 °C für 2 Minuten. Die Indexsequenzen, die für das Multiplexen verschiedener Bibliotheken im gleichen Sequenzierpool erforderlich sind, wurden in der zweiten PCR-Runde angefügt (PCR#2). Diese bestand aus 12,5 µl „PCR Ultra Mix 2X“, 2 µl der Primer, Reinstwasser (SigmaAldrich) 7 µl und 5 µl PCR#1-Produkte (template). Diese Reaktionsmischung wurde wie folgt inkubiert: anfängliche Denaturierung bei 98 °C für 5 Minuten, gefolgt von 13 Zyklen von 98 °C für 10 Sekunden, Primerhybridisierung bei 55 °C für 20 Sekunden und 68 °C für 40 Minuten. Die Amplikonproduktion wurde auf Agarosegelen überprüft. Anschließend wurden sie in äquimolaren Mengen entsprechend den Quantifizierungsdaten des „Qubit“ vereinigt und Sequenzbibliotheken mit der „Illumina MiSeq“ erstellt.

4.4.3.3 Vorverarbeitung von Sequenzierungsdaten

1.635.304 313 bp lange Sequenzen und 18.557 ASVs wurden nach Reinigung etc. unter Verwendung von DADA2 erhalten. Dies schloss alle Taxa ein, die von den ‚Leray‘-Primern angesprochen wurden und die unter anderem auch Pilze und andere Metazoen umfassten.

Die Sequenzdaten von der Illumina MiSeq wurden mit „QIIME 2“ Ver. 2020.10.0 (Bolyen et al. 2019) analysiert. Vor der Downstream-Analyse wurden die Reads für Primersequenzen, Tags und Nextera-Adapter und nach 230 bp für Forward- und Reverse-Reads abgeschnitten, um die Basen von geringer Qualität zu entfernen. Die Reads wurden mithilfe des „DADA2“-Plugins in „QIIME 2“ mit Standardparametern gefiltert, entauscht, zusammengeführt, auf Chimären geprüft und derepliziert (Callahan et al. 2016).

4.4.3.4 Taxonomische Zuordnung

Eine Collembolen-COI-Referenzdatenbank wurde aus der „GenBank“ erstellt, auf die am 29. Juli 2022 zugegriffen wurde. Dies führte zu 54807 Sequenzen mit den Suchbegriffen: „collembola and (COI or CO1 or cytochrome oxidase or cox1)“ unter Ausschluss der ‚cytochrome c oxidase subunit 2‘. Nicht-deutsche oder nicht-westeuropäische Nachweise könnten grundsätzlich ausgeschlossen werden, es wurde jedoch entschieden, diese einzubeziehen, da einige anderswo gefundene Arten möglicherweise noch nicht in Deutschland entdeckt wurden. Es sollte zwar einerseits erwogen werden, Arten von außerhalb des europäischen Kontinents auszuschließen, während jedoch das globale Vorkommen vieler Collembolen-Arten dagegenspricht, was auf das Potenzial der Collembolen hinweist, den gesamten Globus zu besiedeln.

Die Referenzdatenbank umfasste 528 Sequenzen mit eindeutigen binomialen Artnamen von Collembola. Die Anwendung „makeblastdb“ des „BLAST+“-Pakets Version 2.13.0+ wurde verwendet, um eine Referenzdatenbank aus der „GenBank“-Collembolan-COI-Fasta-Datei (National Center for Biotechnology Information 2008) zu erstellen, die vom „BLAST+“-Paket verarbeitet

werden konnte. Während üblicherweise ein ‚Minimum Sequence Copy Threshold‘ (MSCT; Drake et al. 2022) verwendet wird, indem Singletons oder noch bp-lange Sequenzen aus den Proben entfernt werden, wurde dies hier nicht getan, da die Analyse der Positivkontrolle dies nicht zu rechtfertigen schien. Die taxonomische Klassifizierung von ASVs wurde anhand dieser Datenbank durchgeführt. Reads wurden für identische Taxonnamen zusammengefasst, die mehr als einer ASV zugeordnet wurden. Die Anwendung blastn des „BLAST+“-Pakets Version 2.13.0+ wurde verwendet und pident auf 90 gesetzt, sodass jede Sequenz abgerufen wurde, die einer Referenzsequenz zu mindestens 90 % ähnlich war. Die resultierende Taxonliste der BLAST-Suche der MetaSOL-Bibliothek anhand der „GenBank“-Collembolan-COI-Referenzdatenbank durchlief eine Kuratierung, bei der die folgenden Schritte durchgeführt wurden:

- ▶ Erhöhung des Schwellenwerts für die Ähnlichkeit auf 95 %, indem nur Treffer mit pident ≥ 95 beibehalten wurden;
- ▶ Nur der oberste Treffer wurde behalten;
- ▶ Entfernung von Taxa, die keine Collembolen waren;
- ▶ Zusammenfassung verschiedene Linien zu einer Art;
- ▶ Entfernen von Artangaben wie ‚sp.‘, ‚aff.‘ und ‚cf.‘.

Die verbleibenden ASVs wurden als gültige und eindeutige Arten angesehen, da sie Highscore-Übereinstimmungen mit bestehenden Taxa der Referenzdatenbank aufwiesen. Beim Vergleich der drei Methoden, das heißt morphologische Bestimmung, eDNA- und comDNA-Metabarcoding, wurde entschieden, dies auf die konservativste Art und Weise zu tun, die auf der Grundlage vollständiger binomialer Artnamenzuweisungen für jede der drei Methoden erfolgte. Daher wurde jede Einstufung oberhalb der Artebene ignoriert. Die nächstmögliche Vergleichsebene wäre dann die Gattungsebene.

5 AP 3: Methodenvergleiche – Auswertung

Ausgehend von den in diesem Vorhaben erhobenen Daten (siehe Übersichtstabellen im Anhang A) werden zunächst die Ergebnisse der morphologischen und der genetischen Artbestimmung and von comDNA und eDNA vergleichend dargestellt. Etwaige Unterschiede werden diskutiert, z. B., ob diese durch das extrem seltene Vorkommen einzelner Arten, ihre Lebensweise und/oder durch methodische Ursachen wie die Probenahme oder Fehler/Lücken in den Referenzdatenbanken erklärt werden können. In einem zweiten Schritt werden dann die Ergebnisse der morphologischen Bestimmung unter Berücksichtigung der genetischen Bestimmungsergebnisse mit den von Römbke et al. (2012) vorgeschlagenen und in Jänsch et al. (2013) für Regenwürmer bzw. Römbke et al. (2013) für Enchytraeiden publizierten Erwartungswerten für die Landnutzungsformen Acker, Grünland und Wald verglichen. Darüber hinaus wird der jeweilige Kostenaufwand abgeschätzt, der in Abhängigkeit von der Gesamtprobenzahl pro Bestimmungsmethode notwendig wäre.

5.1 Vergleich von morphologischen, comDNA- und eDNA-Analysen

5.1.1 Methodik

5.1.1.1 Bereinigung von Artenlisten zum Methodenvergleich

Um die mit den drei verschiedenen Bestimmungsmethoden erhaltenen Artenlisten und Quantitäten (Abundanz, Biomasse, Anzahl der Sequenzierungs-Reads) pro Standort sinnvoll miteinander vergleichen zu können wurden unter anderem als Konsequenz aus den Beobachtungen aus dem Methodenvergleich im Rahmen der Pilotstudie (siehe Abschnitt 4.3.6.2.1) verschiedene Bereinigungsschritte vorgenommen. Zunächst erfolgte eine Überprüfung der Plausibilität der Zuordnung von ASVs zu einigen Taxa mit bekannter kryptischer Diversität anhand der verfügbaren Literatur. Dies betraf bei den Regenwürmern insbesondere Taxa der Gattung *Aporrectodea*. So wurden beispielsweise an den Standorten Sülsdorf (SLT) und Zingst (ZIN) sowohl morphologisch als auch im comDNA-Metabarcoding *Aporrectodea caliginosa* nachgewiesen, im eDNA-Metabarcoding hingegen nur *Aporrectodea longa*. Die Ergebnisse des 16S-Metabarcoding wurden überprüft, und tatsächlich gehörten die am besten übereinstimmenden Sequenzen (mit ca. 90 % Übereinstimmung), die in den kuratierten Referenzdatenbanken gefunden wurden, zu *A. longa*. Ein Vergleich mit der nicht-kuratierten „GenBank“-Datenbank ergab jedoch eine 100%ige Übereinstimmung mit einer Referenzsequenz von *Aporrectodea trapezoides*. Daher wurde für dieses Taxon beschlossen, es wie eine COI-Linie von *A. caliginosa* zu behandeln. Am Standort Almesbach Stallkoppel (ALM) wurde eine COI-ASV mit einer niedrigen Anzahl von comDNA-Metabarcoding-Reads der Art *Aporrectodea terrestris* zugewiesen, während diese in der morphologischen Bestimmung nicht nachgewiesen wurde. Dies hängt vermutlich mit dem unklaren Artstatus dieses Taxons zusammen, insbesondere bezüglich der Abgrenzung zu *A. longa*. Laut Porco et al. (2018) könnten ausgehend von paarweisen Vergleichen der COI molekularen OTUs *A. longa* und *A. terrestris* zumindest teilweise keine Fortpflanzungsbarriere aufweisen und daher nicht als molekulare OTUs auf Artniveau betrachtet werden. Daher wurde für *A. terrestris* entschieden, diese ASV stattdessen *A. longa* zuzuordnen. An einigen Standorten wurden in den comDNA- und eDNA-Metabarcoding-Analysen einige ASVs den Taxa *Aporrectodea trapezoides* bzw. *A. trapezoides* L1 zugeordnet, nicht jedoch bei der morphologischen Bestimmung. Nach einem genaueren Vergleich der Nukleotidentitätswerte zwischen den *A. caliginosa* und *A. trapezoides* zugeordneten COI-ASVs am Beispiel der Standorte ALM und Zeckerin (ZEC) wurde deutlich, dass es innerhalb dieses Artenkomplexes mehrere stark divergierende COI-Linien gibt, zu denen offenbar auch *A. trapezoides* zu zählen ist (Tabelle 15, Tabelle 16). Daher wurde für diese Taxa

beschlossen, sie wie weitere COI-Linien von *A. caliginosa* zu behandeln. Dieses Vorgehen bei der Klassifizierung ist auch mit den Schlussfolgerungen von Briones (1996) konsistent. Demnach ist *A. trapezoides* eine Unterart von *A. caliginosa*, und da im Rahmen dieses Vorhabens auch bei der morphologischen Bestimmung keine Differenzierung nach Unterarten vorgenommen wurde ist es gerechtfertigt, *A. trapezoides* mit *A. caliginosa* zusammen zu fassen.

Tabelle 15: Nukleotid-Identitätsmatrix zwischen COI ASV-Sequenzen am Standort Almesbach Stallkoppel (ALM), die *Aporrectodea caliginosa* und *A. trapezoides* zugeordnet sind

	<i>A. caliginosa</i>	<i>A. caliginosa</i> L2	<i>A. caliginosa</i> L3	<i>A. trapezoides</i>	<i>A. trapezoides</i> L1
<i>A. caliginosa</i>		79,87 % – 99,04 % *	78,91 % – 85,94 %	82,11 % – 84,66 %	77,64 % – 83,60 %
<i>A. caliginosa</i> L2	79,87 % – 99,04 % *		85,21 %	82,75 % – 83,39 %	83,28 % – 83,60 %
<i>A. caliginosa</i> L3	78,91 % – 85,94 %	85,21 %		80,83 % – 83,39 %	83,39 % – 83,71 %
<i>A. trapezoides</i>	82,11 % – 84,66 %	82,75 % – 83,39 %	80,83 % – 83,39 %		83,39 % – 85,30 %
<i>A. trapezoides</i> L1	77,64 % – 83,60 %	83,28 % – 83,60 %	83,39 % – 83,71 %	83,39 % – 85,30 %	

* Einige Referenzsequenzen, die einfach als „*A. caliginosa*“ bezeichnet wurden, gehören wahrscheinlich zur Linie L2.

Tabelle 16: Nukleotid-Identitätsmatrix zwischen COI ASV-Sequenzen am Standort Zeckerin (ZEC), die *Aporrectodea caliginosa* und *A. trapezoides* zugeordnet sind

	<i>A. caliginosa</i>	<i>A. caliginosa</i> L3	<i>A. trapezoides</i> L1
<i>A. caliginosa</i>		95,85 % – 99,68 % *	81,15 % – 83,71 %
<i>A. caliginosa</i> L3	95,85 % – 99,68 % *		81,47 %
<i>A. trapezoides</i> L1	81,15 % – 83,71 %	81,47 %	

* Einige Referenzsequenzen, die einfach als „*A. caliginosa*“ bezeichnet wurden, gehören wahrscheinlich zur Linie L3.

Für die Enchytraeiden war insbesondere die Bereinigung der Taxonlisten hinsichtlich unterschiedlicher (vorläufiger) Namensgebung ansonsten identischer Taxa notwendig, insbesondere in den vergleichsweise zahlreichen Fällen, in denen ein Taxon sowohl morphologisch als auch genetisch definiert war, jedoch noch keine publizierte Artbeschreibung inklusive Namensgebung vorliegt (siehe Tabelle 39 bis Tabelle 41, Arten mit Buchstabencodes in Klammern).

Darüber hinaus wurden für den Vergleich der Artenlisten aus den drei Bestimmungsmethoden die folgenden Regeln angewendet. Die Konsequenz aus einer Regel ‚Streichen‘ bedeutet hierbei, dass das entsprechende Taxon aus der Liste gelöscht und die zugehörigen quantitativen Werte nicht gezählt wurden. ‚Zusammenlegung‘ oder ‚verschmelzen‘ bedeutet, dass die quantitativen Werte der betroffenen Taxa addiert wurden.

1. Es lag mehr als eine DNA-Linie (‚lineage‘) einer morphologisch definierten Art vor:
Zusammenlegung aller Linien zu einer Art.
2. Morphologische Identifizierung von Individuen nur auf Gattungsebene:
 - a) wenn mit allen drei verschiedenen Bestimmungsmethoden nur eine Art dieser Gattung in der Probe nachgewiesen wurde:

Werte auf Gattungsebene mit dieser Art verschmelzen.

b) wenn unter Berücksichtigung aller drei verschiedenen Bestimmungsmethoden mehr als eine Art dieser Gattung vorhanden ist:

Streichen.

3. Identifikation des Taxons nur auf Familienebene:
Streichen.
4. Zwei Arten sind in der Literatur anerkannt und haben Barcodes in den Referenzdatenbanken, aber morphologisch werden sie aus verschiedenen Gründen als eine Art identifiziert (z. B. kryptische Artenkomplexe):
Zusammenlegung der Arten und Verwendung des älteren Namens.
5. Eine Art hat noch keinen Namen (d. h. sie ist noch nicht gültig beschrieben), aber sie ist morphologisch charakterisiert und hat einen DNA-Barcode in den Referenzdatenbanken:
Unter Verwendung des vorläufigen Namens Kürzels beibehalten.
6. Innerhalb derselben Gattung kommen Taxa vor, die entweder nur morphologisch oder nur mit DNA-Methoden definiert sind (d. h. es gibt eine gültige Artbeschreibung, jedoch keinen zugehörigen DNA-Barcode oder umgekehrt):
Streichen.

5.1.1.2 Grafische Darstellung des Methodenvergleichs

Die kuratierten Listen der Regenwurm- und Enchytraeidentaxa aus den comDNA- und eDNA-Metabarcoding-Analysen wurden anhand verschiedener grafischer Methoden mit den Ergebnissen der morphologischen Bestimmung verglichen, um die Leistung der verschiedenen Methoden zu bewerten.

5.1.1.2.1 Artenlisten und UpSet Diagramme

Die für die comDNA- und eDNA-Proben erhaltenen ASV-Tabellen wurden mit Hilfe der in „QIIME 2“ (Version 2022.2) implementierten Funktionen „qiime taxa collapse“ und „qiime feature-table filter-samples“ (Bolyen et al. 2019) auf die Artebene reduziert und nach Probenahmeort aufgeteilt. Die resultierenden Tabellen wurden mit den aus den morphologischen Bestimmungen abgeleiteten Artenlisten („MORPH“) kombiniert und mit einem selbst entwickelten Code in Präsenz-/Absenzdaten umgewandelt. UpSet-Plots zum Vergleich der Artenzahlen pro Organismengruppe, die mit den drei Bestimmungsmethoden an den einzelnen Standorten nachgewiesen wurden, wurden mit dem Paket „Intervene“ (Khan & Mathelier 2017) erstellt.

5.1.1.2.2 Alphasdiversitäts-Analysen und Box-Whisker-Plots

Die Alpha-Diversitätsmetriken wurden aus den Metabarcoding- und Morphologie-Artenlisten einschließlich der Abundanzwerte berechnet, die für jede Art an jedem Probenahmeort ermittelt wurden (d. h. die Gesamtzahl der Reads in den Metabarcoding-Daten und die Gesamtzahl der Individuen in den Morphologielisten). Die Alpha-Diversität pro Probe wurde abgeschätzt, indem die folgenden Metriken mit dem „qiime diversity alpha“ Plugin von „QIIME 2“ berechnet wurden: der Artenreichtum, d. h. die Gesamtzahl der in jeder Probe entdeckten Arten, und der Shannon-Index, eine Schätzung des Artenreichtums und der Artenvielfalt, die sowohl die Abundanz als auch die Gleichmäßigkeit der in einer Probe vorhandenen Arten berücksichtigt. Anschließend wurde der in „QIIME 2“ implementierte nichtparametrische statistische Test Kruskal-Wallis verwendet, um signifikante Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen den nach Methodik (comDNA, eDNA, MORPH) oder Landnutzung (Acker, Wald, Grünland) definierten Probengruppen festzustellen. Es wurden auch interaktive Boxplots für jede Diversitätsmetrik unter Verwendung der „qiime diversity alpha-groups-significance“ von „QIIME 2“ und den R-Paketen „ggplot2“ (Wickham 2016) und „plotly“ (Sievert 2020), in R 4.0.4 (R-Team-Core, 2019) erstellt. Die Schätzungen des Artenreichtums wurden auch in einem Streudiagramm dargestellt, das mit „ggplot2“

erstellt wurde, wobei die Proben nach Proben gruppiert und entsprechend der Landnutzung eingefärbt wurden.

Box-Whisker-Plots wurden verwendet, um einen Überblick über den Artenreichtum bzw. die Diversität anhand des Shannon-Index pro Bestimmungsmethode über alle Standorte darzustellen. Die Y-Achse stellt die Gesamtzahl der Arten bzw. den Shannon-Index dar. Die vertikale Linie innerhalb der Boxplots repräsentiert den Median, die obere und untere Begrenzung entsprechen dem Interquartilsabstand zwischen dem unteren und dem oberen Quartil. Die unteren und oberen ‚Whisker‘ zeigen die minimalen und maximalen Werte ohne Ausreißer. Werte gelten als Ausreißer, wenn sie mehr als das 1,5-fache des Interquartilsbereichs über bzw. unter der oberen bzw. unteren Boxgrenze liegen und werden als Punkte dargestellt.

5.1.1.2.3 Bland-Altman-Diagramme

Um die Gesamtübereinstimmung zwischen den Methoden zu bewerten, wurden die im vorherigen Abschnitt erstellten Schätzungen des Artenreichtums verwendet, um eine Bland-Altman-Analyse mit dem R-Paket „blandr“ (Datta 2017) durchzuführen. Konkret wurden die Messungen des Artenreichtums verglichen, die an den verschiedenen Probenahmestellen durch comDNA- oder eDNA-Metabarcoding im Vergleich zur morphologischen Bestimmung gewonnen wurden. Die Y-Achse zeigt den Unterschied in der Artenzahl zwischen den beiden Methoden, und die X-Achse stellt die mittlere Artenzahl der beiden Methoden dar. Die mittlere gestrichelte Linie gibt den Gesamtmittelwert der Unterschiede über alle Standorte hinweg an. Die obere und die untere gestrichelte Linie geben die Grenzen der Übereinstimmung an, innerhalb derer 95 % der Unterschiede zwischen den Methoden enthalten sind.

5.1.1.2.4 Betadiversitätsanalyse und Hauptkoordinatenanalyse

Beta-Diversitätsanalysen wurden mit dem „qiime diversity beta“ Plugin von „QIIME 2“ durchgeführt. Die folgenden zwei Beta-Diversitätsmetriken wurden berechnet:

- ▶ Jaccard-Distanz: ein qualitatives Maß für die Unähnlichkeit von Gemeinschaften auf der Grundlage von An-/Abwesenheitsdaten (enthält keine Informationen über die Abundanz);
- ▶ Bray-Curtis-Distanz: ein quantitatives Maß für die Unähnlichkeit von Gemeinschaften auf der Grundlage von Daten zum Vorkommen (Abundanz).

Da sich die Anzahl der Beobachtungen, die aus DNA-Metabarcoding und morphologischen Daten abgeleitet wurden, um Größenordnungen unterschieden, wurden die Artentabellen mit den Rohdaten zur Abundanz (Anzahl der Lesungen/Anzahl der Individuen) zunächst mit der Funktion „decostand“ (method = ‚hellinger‘) aus dem R-Paket „vegan v.2.5-7“ (Oksanen et al. 2020) in Quadratwurzelmatrizen der relativen Häufigkeit transformiert. Die Jaccard- und Bray-Curtis-Distanzen wurden dann zur Berechnung von Unähnlichkeitsmatrizen verwendet, aus denen eine Hauptkoordinatenanalyse mit der Funktion „qiime diversity pcoa“ erstellt wurde. Die Hauptkoordinatenanalyse ist eine Ordinationsmethode, die die Unterschiede zwischen den Proben, in diesem Fall die unterschiedlichen Artenzusammensetzungen je Bestimmungsmethode an unseren Probenahmestandorten, in einem niedrigdimensionalen, in diesem Fall zweidimensionalen, Raum darstellt, um die Variabilität im Datensatz zusammenzufassen. Jede Achse hat einen so genannten Eigenwert, dessen Größe angibt, wie groß die in dieser Achse erfasste Variation ist. Je weiter zwei Punkte entlang dieser Achsen voneinander entfernt sind, desto stärker unterscheidet sich die Artenzusammensetzung zwischen diesen Punkten.

5.1.1.2.5 Korrelationsanalyse

Um den Zusammenhang zwischen eDNA-Metabarcoding-Reads und der Dominanz der Arten (Anzahl der Individuen) oder der Biomasse der Arten zu untersuchen, wurde eine

Korrelationsanalyse mit der Funktion „cor.test()*“ im R-Statistikpaket (R-Team-Core, 2019) durchgeführt. Dazu wurden die rohen Abundanztabellen zunächst mit der Funktion „decostand“ (method = ‚total‘) aus dem Vegan-Paket in relative Abundanzdaten umgewandelt. Da die relativen Häufigkeitsdaten nicht normalverteilt waren, wurde der nichtparametrische Spearman-Rangkorrelationskoeffizient (R, rho) und der zugehörige p-Wert berechnet. Das jeweilige Ergebnis ist ein Streudiagramm der Beziehung zwischen den relativen Anteilen von Individuen oder Biomasse und eDNA-Metabarcoding-Reads pro Art und Standort, das mit der Funktion „ggscatter“ des R-Pakets „ggpubr“ (Kassambara 2020) erstellt wurde. Jeder Punkt steht für eine Art an einem bestimmten Standort, wie durch verschiedene Farben angezeigt wird. Eine blaue Linie zeigt die Korrelation zwischen diesen beiden Parametern, wobei der graue Bereich um diese das 95%ige Konfidenzintervall darstellt. Der so genannte Rangkorrelationskoeffizient R von Spearman ist ein Maß für die Stärke des Zusammenhangs zwischen diesen beiden proportionalen Größen. Der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient variiert zwischen -1 und +1: -1 steht für eine starke negative und +1 für eine starke positive Korrelation zwischen den beiden Variablen. 0 bedeutet, dass kein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht. Die Korrelation ist statistisch signifikant, wenn p kleiner als 0,05 ist.

Für Regenwürmer wurden die Korrelationsanalysen und Streudiagramme nicht nur für den gesamten Datensatz (einschließlich aller Arten), sondern auch für die folgenden nach den drei ökologischen Kategorien zusammengefassten Artengruppen erstellt:

- ▶ Epigäisch: *Dendrobaena attemsi*, *Dendrobaena octaedra*, *Dendrobaena pygmaea*, *Dendrodrilus rubidus*, *Lumbricus castaneus*, *Lumbricus rubellus*;
- ▶ Endogäisch: *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea icterica*, *Aporrectodea rosea*, *Octolasion cyaneum*, *Octolasion tyrtaeum*, *Proctodrilus antipae*, *Proctodrilus tuberculatus*;
- ▶ Anektisch: *Aporrectodea longa*, *Lumbricus terrestris*.

5.1.2 Regenwürmer

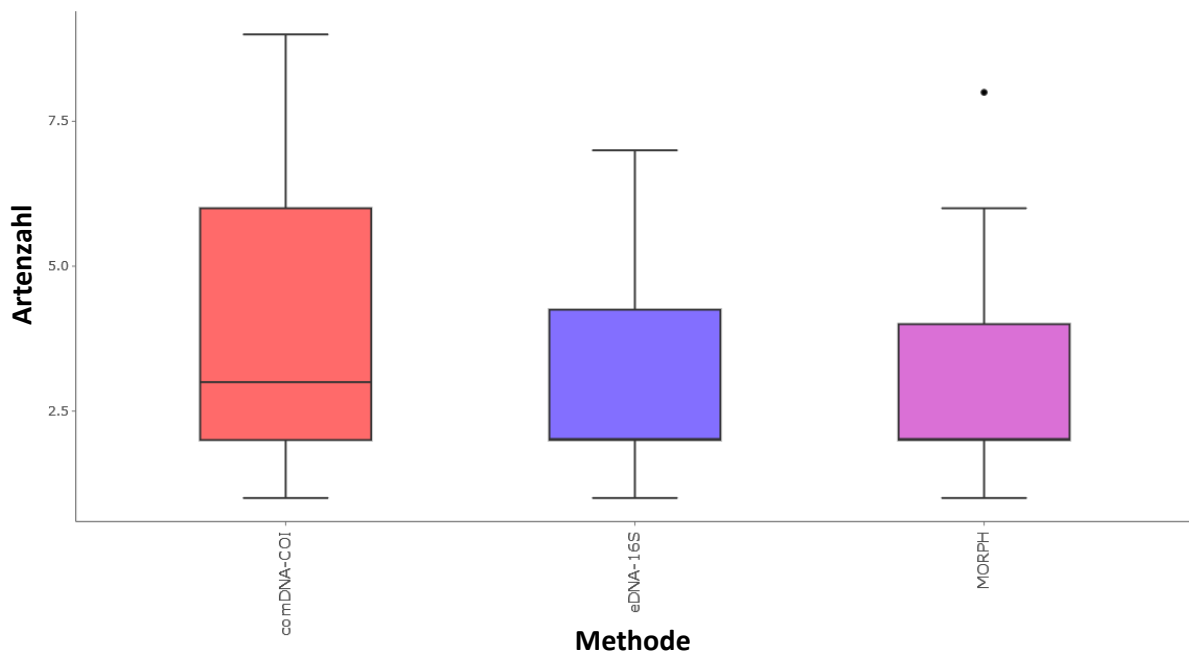
Während der Beprobungskampagne wurde festgestellt, dass der Boden an einigen Probenahmestellen, insbesondere in Wäldern, stark ausgetrocknet war, was häufig zu einer geringen Anzahl von Regenwurmindividuen führte. So wurden am stark sauren Standort Merzalben keine Regenwürmer gefunden. Insgesamt wurden 1754 Regenwurmexemplare und 792 g Biomasse (Frischgewicht) gesammelt. An den 25 beprobten Standorten wurden 12 verschiedene Regenwurmart morphologisch identifiziert, was einem Anteil von ca. 26 % der bisher in Deutschland nachgewiesenen Arten (Lehmitz et al. 2014) entspricht. Die am häufigsten nachgewiesenen Arten waren *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea longa*, *Aporrectodea rosea*, *Lumbricus rubellus* und *Lumbricus terrestris*. Auf der Grundlage der morphologischen Identifizierungsergebnisse wurden durchschnittlich 3 Arten pro Ackerstandort, 2 Arten in Wäldern und 4 Arten auf Grünlandstandorten festgestellt. Die durchschnittliche Gesamtabundanz pro Standort lag bei 70 Ind./m² an Ackerbaustandorten, 17 Ind./m² in Wäldern und 87 Ind./m² an Grünlandstandorten. Die niedrigste Abundanz (0 – 38 Ind./m²) und Artenzahl (0 – 4) wurde somit an den Waldstandorten gefunden (Tabelle 37 im Anhang A.1.1). Die höchste Artenzahl (8) wurde im Grünland Galgenberg gefunden, die höchste Abundanz (296 Ind./m²) am Grünlandstandort Zeckerin (Tabelle 35 im Anhang A.1.1). Generell wurden auf den beprobten Flächen keine faunistischen Besonderheiten entdeckt. Die Regenwurmzönose ist nicht sehr divers, was aber bei diesen (mehr oder weniger) intensiv genutzten Acker- und Grünland- sowie den Waldstandorten dem Normalzustand entspricht. Der Vergleich der anhand der drei

Bestimmungsmethoden identifizierten Regenwurmartens pro Standort anhand von UpSet-Diagrammen und Artenlisten findet sich im Anhang B.1.

5.1.2.1 Artenreichtum pro Methode an allen Standorten

Zunächst wurde die Verteilung des Artenreichtums pro Methode über alle Standorte in Box-Whisker-Plots dargestellt (Abbildung 18). Es zeigte sich, dass anhand des comDNA-Metabarcoding mehr Arten pro Standort nachgewiesen wurden als mit dem eDNA-Metabarcoding und der morphologischen Bestimmung, sowohl im Median als auch im Maximum. Andererseits wurden mit eDNA-Metabarcoding und morphologischer Bestimmung eine ähnlich hohe Anzahl von Arten nachgewiesen. Hier fällt der Median zusammen mit der unteren Boxgrenze, weshalb keine zusätzlichen horizontalen Linien innerhalb der Boxes zu sehen sind. Die Unterschiede zwischen den drei Methoden waren jedoch statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test).

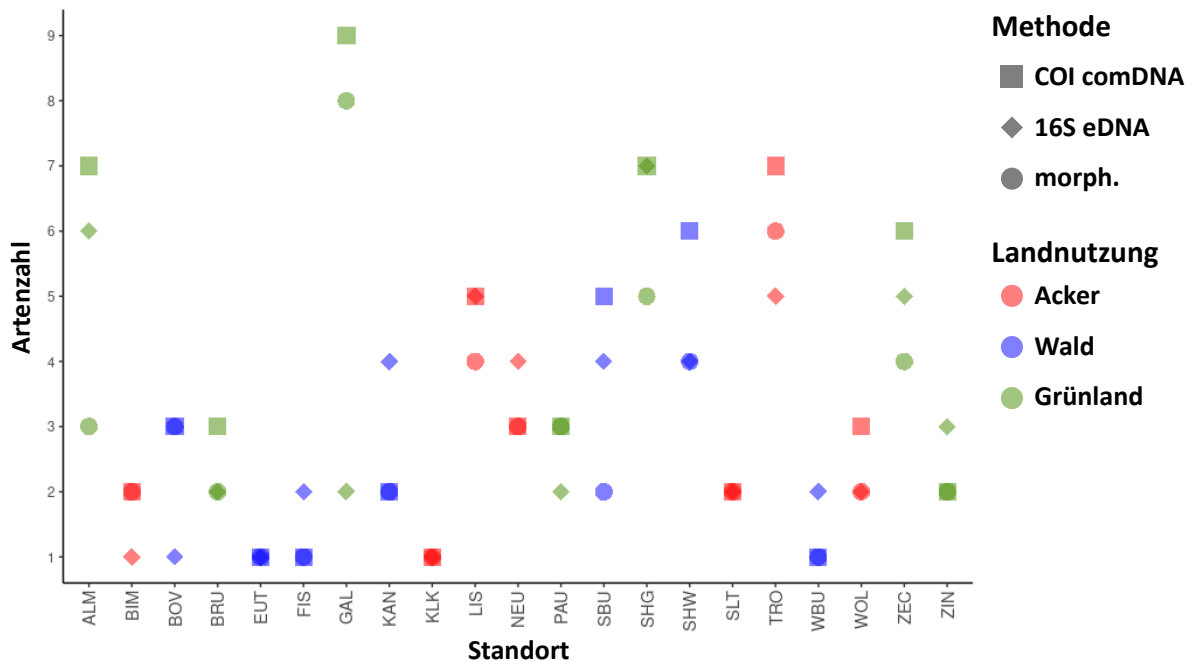
Abbildung 18: Box-Whisker-Plot, der die Verteilung des Artenreichtums der Regenwürmer pro Bestimmungsmethode über alle Standorte zeigt



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 19 zeigt die Anzahl der Arten, die pro Methode an jedem einzelnen Standort nachgewiesen wurden. Es ist zu erkennen, dass die Anzahl der mit den einzelnen Methoden festgestellten Arten manchmal stark voneinander abwich und manchmal stark übereinstimmte, insbesondere wenn die mit allen Methoden nachgewiesene Artenzahl niedrig war. Wie bereits anhand des Box-Whisker-Plots gesehen zu erkennen war, wies das comDNA-Metabarcoding für die Mehrzahl der Standorte die höchsten Artenzahlen nach. In Bezug auf die Landnutzung war kein klares Muster hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Bestimmungsmethoden erkennbar.

Abbildung 19: Artenreichtum der Regenwürmer pro Bestimmungsmethode und Standort (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



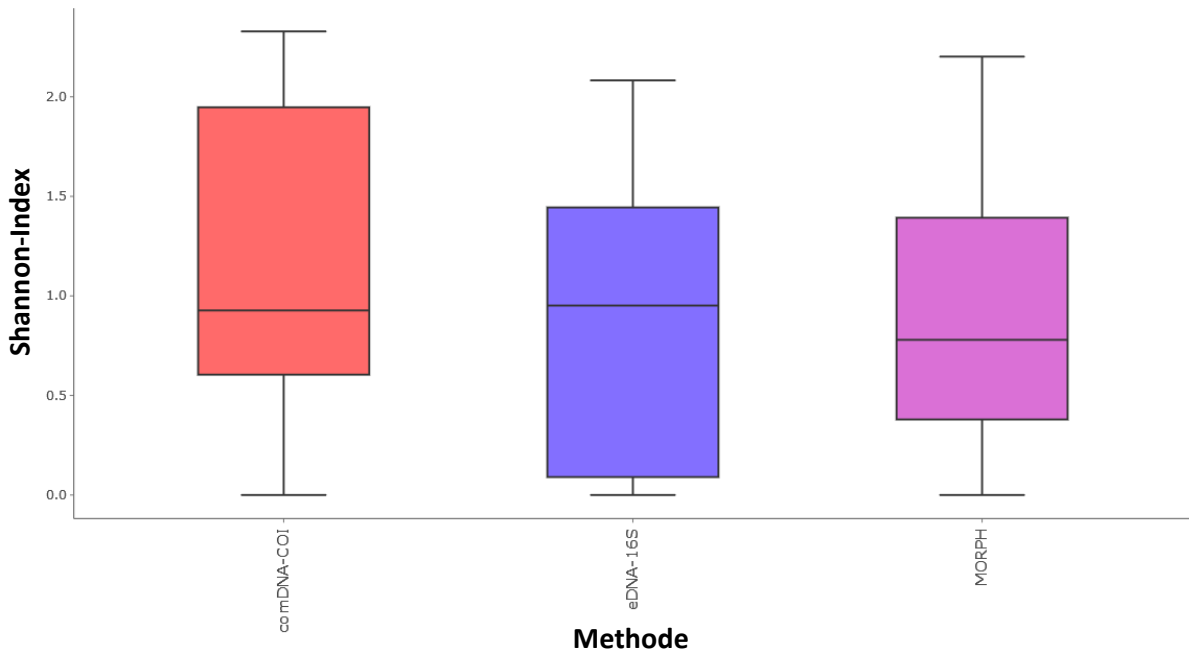
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

5.1.2.2 Diversität (Shannon-Index) pro Methode über alle Standorte

In den Box-Whisker-Plots in Abbildung 20 ist die Diversität der Regenwurmgemeinschaft, die pro Methode festgestellt wurde, repräsentiert durch den Shannon-Index, über alle Standorte dargestellt. Der Shannon-Index wird berechnet, indem sowohl die Artenzahl als auch die Gleichmäßigkeit der in einer Probe vorhandenen Artenabundanzen berücksichtigt wird. Je höher die Anzahl der Arten und je gleichmäßiger die relative Häufigkeit der Arten verteilt ist, desto höher ist der Diversitätsindex. Der Index sinkt, wenn die relativen Häufigkeiten einzelner Arten besonders hoch sind, d. h., wenn es generell nur wenige Arten gibt oder wenn die relativen Häufigkeiten ungleichmäßig verteilt sind. Der mediane Diversitätsindex war bei allen drei Methoden ähnlich, die höchste Diversität wurde jedoch beim comDNA-Metabarcoding beobachtet. Das eDNA-Metabarcoding ergab einen besonders niedrigen Diversitätsindex, wenn für einige Arten an einigen Standorten nur eine sehr geringe Anzahl von Sequenzierungs-Reads vorlag. Wie auch für die Gesamtzahl der Arten, waren die Unterschiede zwischen den Methoden hinsichtlich des Shannon-Index statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test).

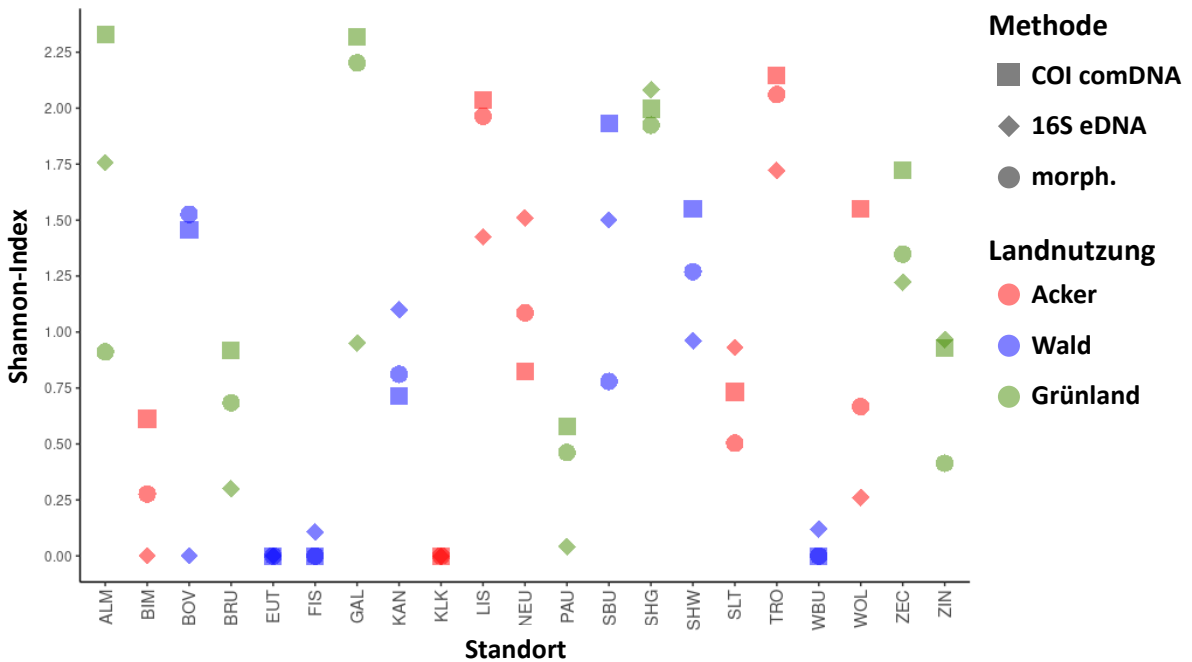
In Abbildung 21 findet sich die Diversität (Shannon-Index) der Regenwürmer pro Bestimmungsmethode und Standort. Auch hier zeigten sich teilweise hohe Übereinstimmungen zwischen den Bestimmungsmethoden, häufiger jedoch teils deutliche Unterschiede. Die höchste Diversität wurde in der Mehrzahl der Standorte im comDNA-Metabarcoding erreicht, während das eDNA-Metabarcoding in etwa der Hälfte der Standorte den niedrigste Diversitätsindex ergab.

Abbildung 20: Box-Whisker-Plot, der die Verteilung der Diversität (Shannon-Index) der Regenwürmer pro Bestimmungsmethode über alle Standorte zeigt



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 21: Diversität (Shannon-Index) der Regenwürmer pro Bestimmungsmethode und Standort (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



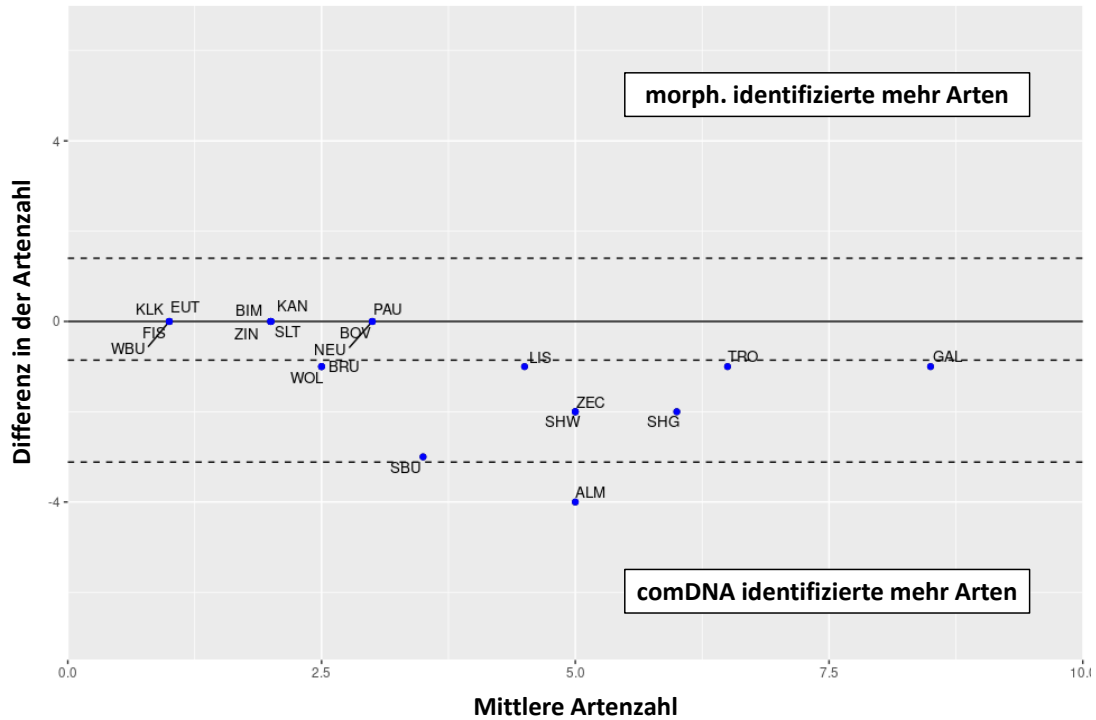
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

5.1.2.3 Bland-Altman-Plot-Analyse

Die Bland-Altman-Plot-Analyse ist eine weitere Möglichkeit, die Unterschiede zwischen den Identifizierungsmethoden pro Standort zu betrachten. Im Folgenden erfolgt ein jeweils paarweiser direkter Vergleich zwischen den morphologischen Bestimmungsergebnissen auf der einen Seite und den comDNA- bzw. eDNA-Metabarcoding Ergebnissen auf der anderen Seite. Wie bereits oben festgestellt, wurden mittels comDNA-Metabarcoding an vielen Standorten mehr Arten nachgewiesen als mit der morphologischen Bestimmung (Abbildung 22). Wie sich aus der mittleren gestrichelten Linie ablesen lässt, wurde im Durchschnitt durch das comDNA-Metabarcoding an jedem Standort eine Art mehr als durch morphologische Bestimmung nachgewiesen. Der maximale Unterschied zwischen den beiden Methoden wurde am Standort Almesbach Stallkoppel (ALM) beobachtet, wo durch das comDNA-Metabarcoding vier Arten mehr identifiziert wurden als durch die morphologische Bestimmung. Umgekehrt wurde in keinem Fall durch die morphologische Bestimmung eine höhere Artenzahl erhalten als durch das comDNA-Metabarcoding. Der Hauptgrund für diese Beobachtungen ist, dass Jungtiere und morphologisch nicht identifizierte Individuen wie Fragmente durch Metabarcoding einer Art zugeordnet werden konnten.

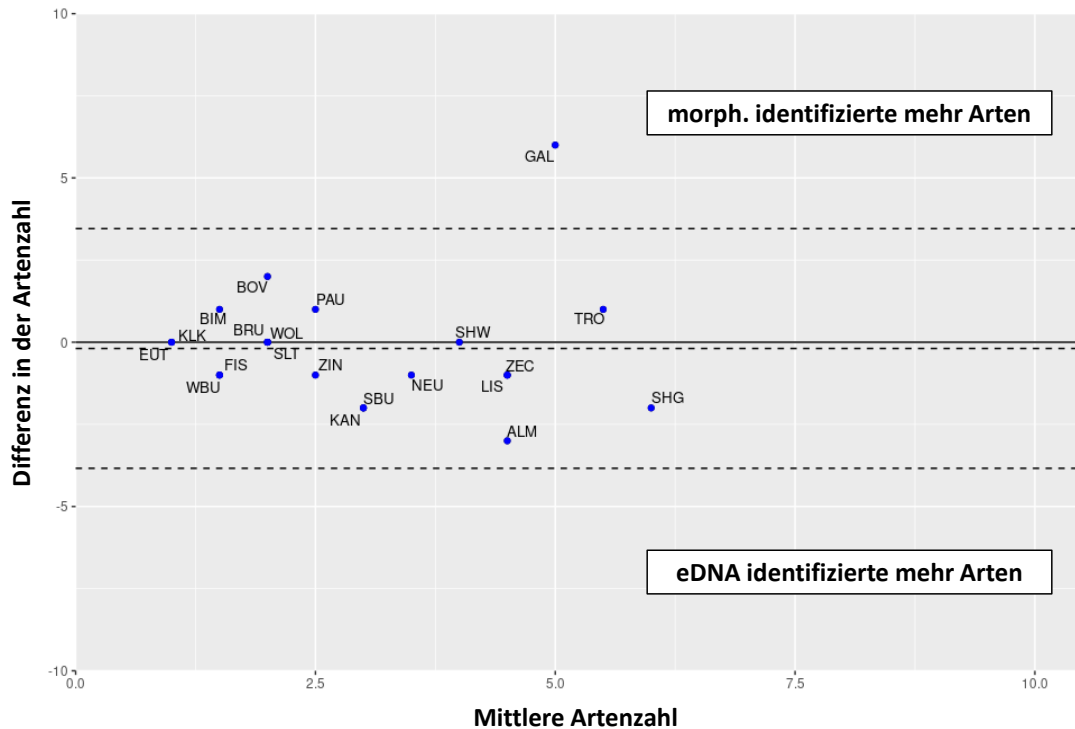
Der Vergleich zwischen morphologischer Bestimmung und eDNA-Metabarcoding zeigt, dass im Durchschnitt mit eDNA-Metabarcoding ähnlich viele Arten wie mit der morphologischen Bestimmung nachgewiesen wurden (Abbildung 23). Allerdings wurden häufig Unterschiede in beide Richtungen beobachtet. Auffallend ist der starke Unterschied am Grünlandstandort Galgenberg (GAL), der eine hohe Anzahl morphologisch identifizierter Arten aufwies, von denen aber nur sehr wenige mittels eDNA-Metabarcoding nachgewiesen wurden. Der Grund dafür ist derzeit unklar, aber es sollte berücksichtigt werden, dass es Fälle gibt, in denen das eDNA-Metabarcoding die tatsächliche Regenwurmvierfält an einigen Standorten stark unterschätzt.

Abbildung 22: Bland-Altman-Plot-Analyse zur Illustration der Unterschiede zwischen der morphologisch bestimmten und anhand comDNA-Metabarcoding festgestellten Artenzahl pro Standort (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 23: Bland-Altman-Plot-Analyse zur Illustration der Unterschiede zwischen der morphologisch bestimmten und anhand eDNA-Metabarcoding festgestellten Artenzahl pro Standort (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

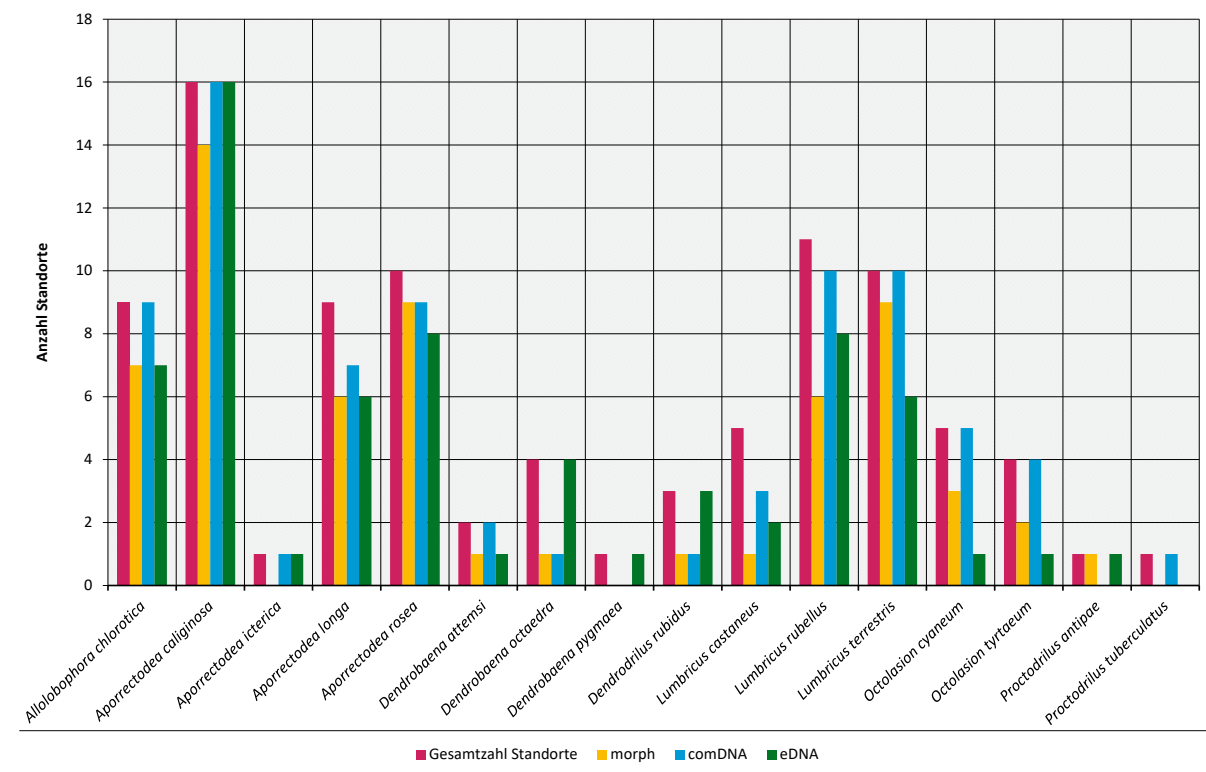
5.1.2.4 Nachweishäufigkeit pro Art und Methode

Bisher wurden nur die Unterschiede zwischen den drei Bestimmungsmethoden in Bezug auf die Gesamtartenzahl oder -vielfalt dargestellt. Im Folgenden wird die Häufigkeit des Nachweises der einzelnen Regenwurmart pro Bestimmungsmethode näher betrachtet. Abbildung 24 zeigt, welche Regenwurmart an wie vielen Standorten und mit welcher Bestimmungsmethode nachgewiesen wurde. Es lässt sich feststellen, dass *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa* und *Aporrectodea rosea* von allen Arten am häufigsten mit allen drei Methoden nachgewiesen wurden. *Dendrobaena octaedra* und *Dendrodrilus rubidus* wurden häufiger mittels eDNA-Metabarcoding als mit den beiden anderen Methoden nachgewiesen. Dagegen wurden *Lumbricus terrestris* und beide *Octolasion*-Arten mit eDNA-Metabarcoding weniger häufig nachgewiesen. Epigäische Arten (Vertreter der Gattung *Dendrobaena*, *Dendrodrilus rubidus*, *Lumbricus castaneus* sowie *Lumbricus rubellus*) wurden an manchen Standorten anhand morphologischer Bestimmung nicht nachgewiesen. Das comDNA-Metabarcoding wies insgesamt die höchste Zuverlässigkeit für den Nachweis von Arten auf, da die Anzahl der Standorte, an denen die jeweilige Art mit dieser Methode nachgewiesen wurde, am häufigsten der Gesamtzahl der Standorte, an denen die Art mit allen Bestimmungsmethoden nachgewiesen wurde, am nächsten lag.

Diese Unterschiede in der Nachweishäufigkeit pro Art zwischen den Methoden könnten durch die Abundanz, das Verhalten oder die Größe der Arten erklärt werden. Die endogäischen Arten *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa* und *Aporrectodea rosea* waren diejenigen mit der höchsten Abundanz, und endogene Arten können als Horizontalgräber potenziell viel eDNA im Boden hinterlassen. Andererseits war die Abundanz der *Octolasion*-Arten sehr gering. Kleine epigäische Arten könnten beispielsweise bei der Handauslese übersehen werden, während andererseits ganze Individuen, insbesondere Jungtiere, in den eDNA-Proben vorhanden sein könnten. Die eDNA von Vertikalgräbern wie *Lumbricus terrestris* könnte dagegen sehr ungleichmäßig im Boden verteilt sein, vor allem in ihren senkrechten Röhren und ihrer Losung an deren Ausgängen an der Bodenoberfläche. Daher könnten sie aufgrund der im Rahmen dieses Vorhabens zufällig verteilten Probenahmepunkte durch das eDNA-Metabarcoding weniger wahrscheinlich nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit, diesem Effekt zu begegnen wäre, einen Teil der eDNA-Proben gezielt dort zu entnehmen, wo oberflächlich erkennbare Spuren tiefgrabender Regenwürmer erkennbar sind sowie die gezielte Beprobung von Mikrohabitaten wie Totholz, Dunghaufen oder Moospolstern für die vollständige Erfassung der epigäischen Arten. Diese Vorgehensweise steht jedoch möglicherweise einer grundsätzlich anzustrebenden Standardisierung bei der Probenahme entgegen und erfordert zudem vom Probennehmer eine höhere Qualifikation als bei einer einheitlichen und beobachtungsunabhängigen Probenahme. Derartige methodische Fragen sollten bei der Fortentwicklung und Standardisierung künftiger Probenahmemethoden diskutiert werden.

Abbildung 24: Anzahl der Standorte, an denen jede Regenwurmart mit allen Bestimmungsmethoden bzw. mit jeder einzelnen Bestimmungsmethode nachgewiesen wurde

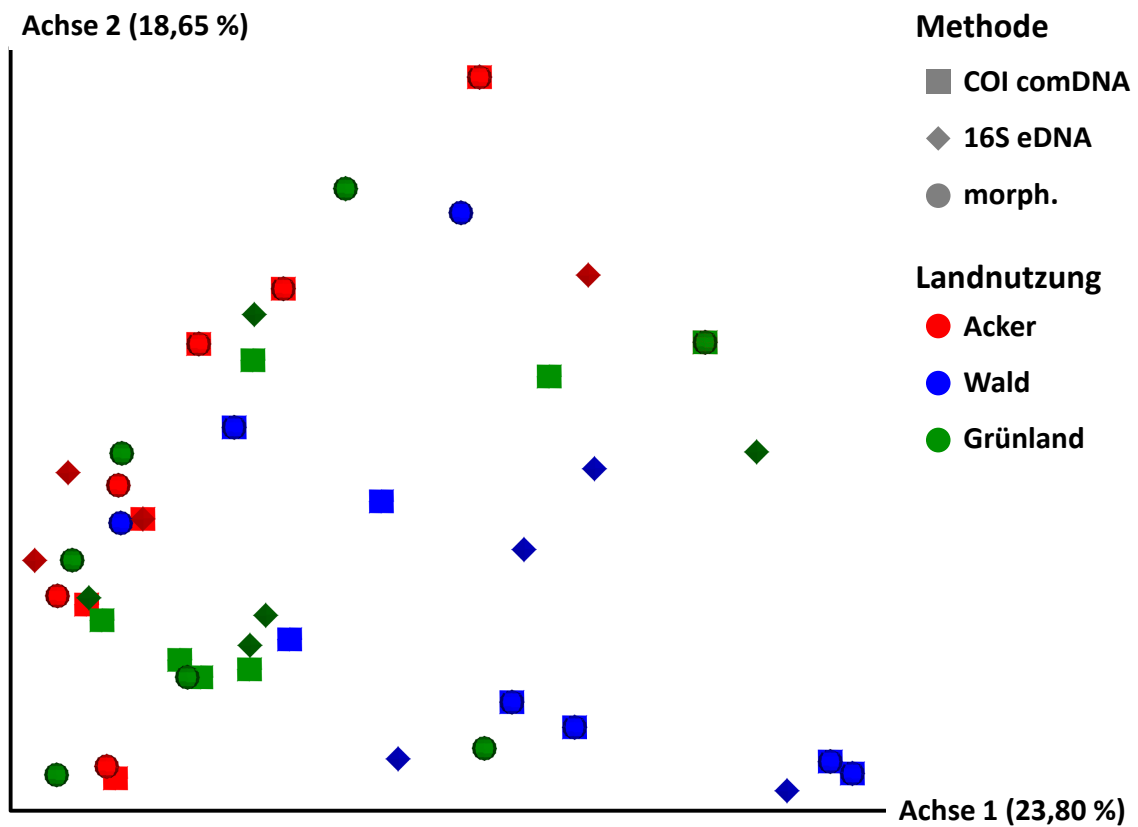


Quelle: eigene Darstellung, ECT Oekotoxikologie GmbH

5.1.2.5 Hauptkoordinatenanalyse

Abbildung 25 zeigt eine Hauptkoordinatenanalyse auf der Grundlage der Ähnlichkeit (Jaccard-Koeffizient) zwischen den Daten über das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Arten pro Standort und Bestimmungsmethode. Etwa 40 % der Gesamtvariation im Datensatz wird durch die ersten beiden Achsen erklärt. Es ist ein kontinuierlicher Gradient in der Artenzusammensetzung von Ackerland zu Waldstandorten mit einer teilweise starken Überlappung zu erkennen. Die Grünlandstandorte ordnen sich zwischen den beiden anderen Landnutzungsformen ein. Es gibt kein offensichtlich unterschiedliches Muster zwischen den drei Bestimmungsmethoden. Das bedeutet, dass alle drei Bestimmungsmethoden in der Lage sind, zwischen Standorten mit unterschiedlicher Artenzusammensetzung zu differenzieren, auch wenn der Grad der Trennung zwischen den Standorten bei jeder Bestimmungsmethode unterschiedlich sein kann.

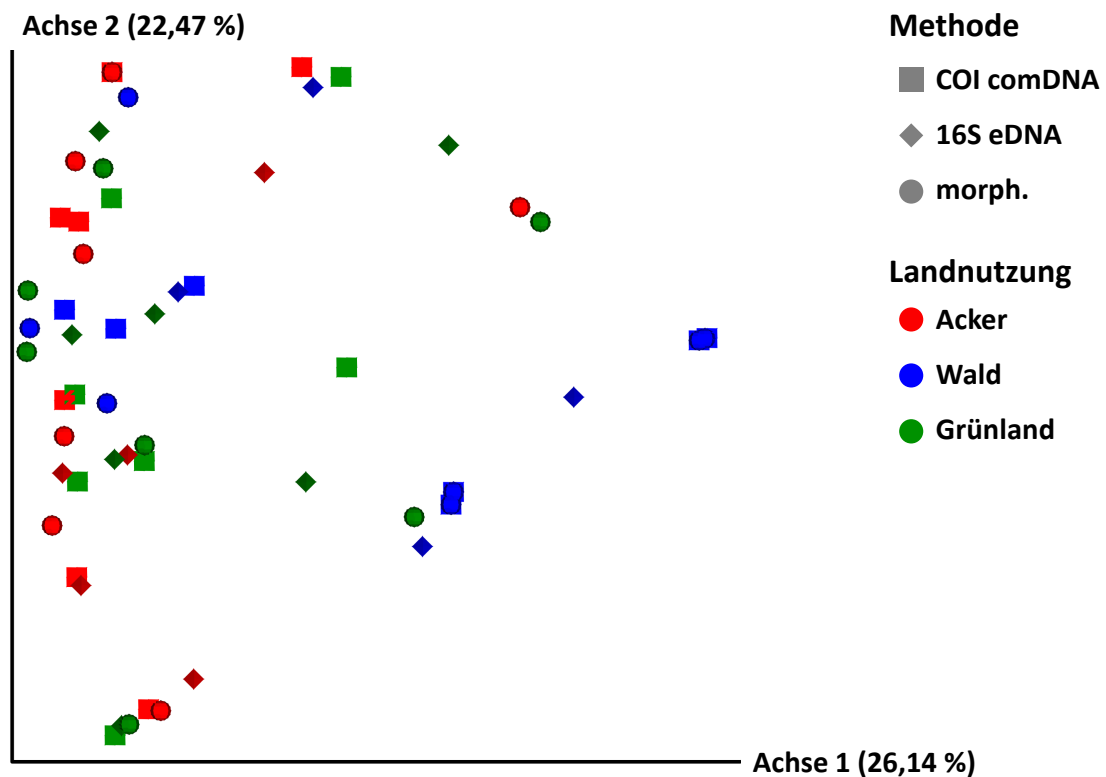
Abbildung 25: Hauptkoordinatenanalyse auf Grundlage der Ähnlichkeit (Jaccard-Koeffizient) zwischen Standorten und Bestimmungsmethoden bezüglich der Regenwurm-Artensammensetzung (Präsenz/Absenz)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Ein ähnliches Muster zeigt sich unter Einbeziehung der Abundanz bzw. der Anzahl der Metabarcoding-Reads (Bray-Curtis-Koeffizient). Auch hier ist keine deutlich andere Verteilung der Datenpunkte aufgrund der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden erkennbar (Abbildung 26). Mit knapp 49 % wird ein etwas höherer Anteil der Gesamtvariation im Datensatz als bei der Verwendung des Jaccard-Koeffizienten durch die ersten beiden Achsen erklärt.

Abbildung 26: Hauptkoordinatenanalyse auf Grundlage der Unähnlichkeit (Bray-Curtis-Koeffizient) zwischen Standorten und Bestimmungsmethoden bezüglich der Regenwurm-Artenzusammensetzung und Abundanz

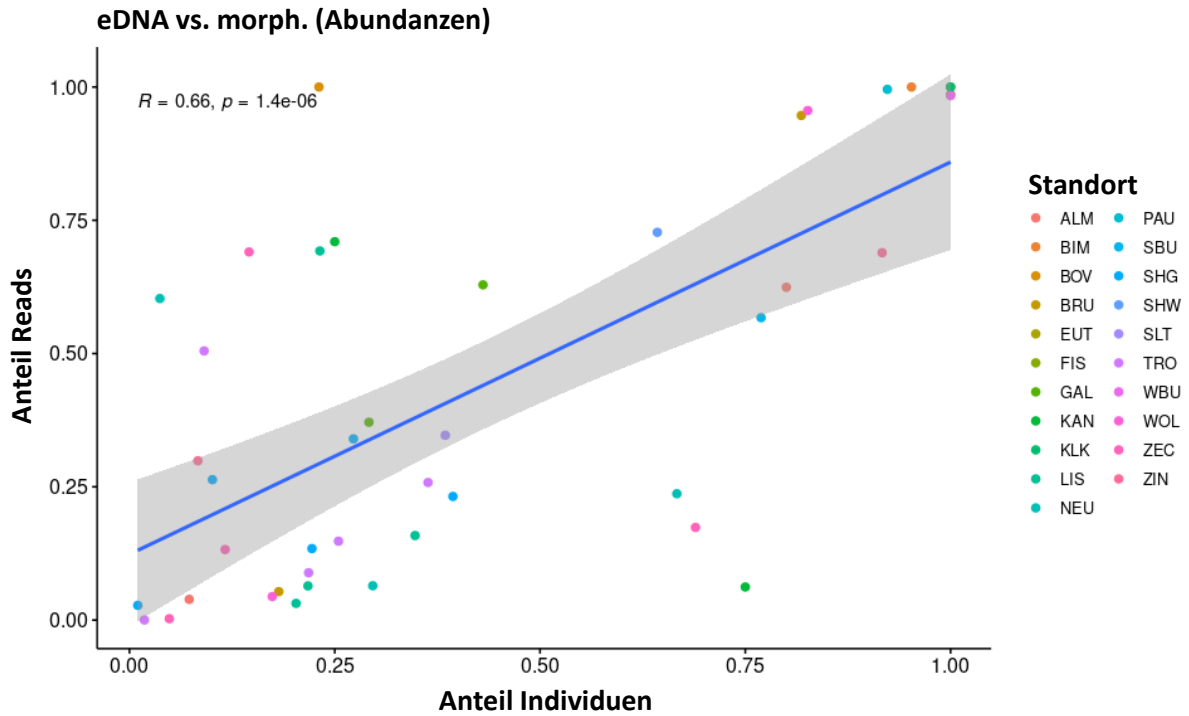


Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

5.1.2.6 Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von Arten und der relativen Anzahl von eDNA-Metabarcoding-Reads

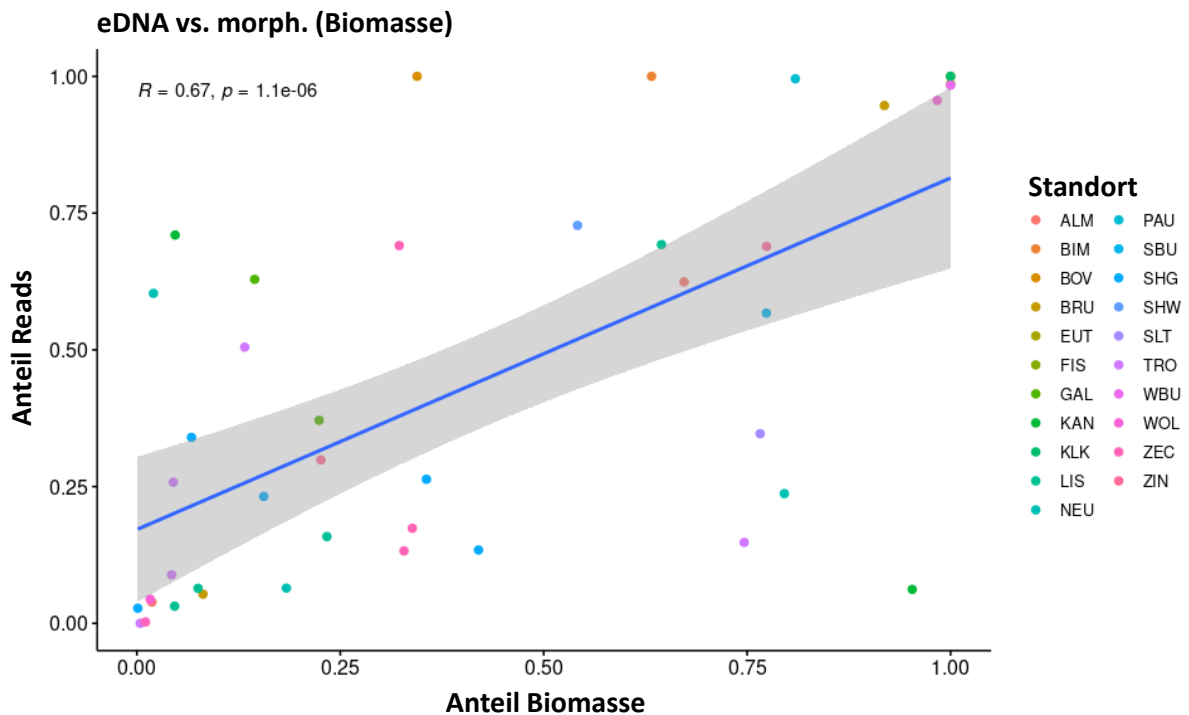
Die Ergebnisse des Metabarcoding liefern keine direkten Daten zur Abundanz oder Biomasse der auf diese Weise nachgewiesenen Arten, sondern lediglich eine zunächst wenig aussagekräftige Anzahl von Sequenzierungs-Reads pro ASV. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob es eine sichtbare Korrelation zwischen der relativen Abundanz oder Biomasse der Arten und der relativen Anzahl der eDNA-Sequenzierungsdaten gibt. Abbildung 27 zeigt eine schwache, aber statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen dem Anteil der durch eDNA-Metabarcoding gewonnenen Sequenzierungs-Reads und der relativen Abundanz der an jedem Probenahmeort morphologisch bestimmten Arten. Betrachtet man die Korrelation zwischen der relativen Biomasse und den eDNA-Metabarcoding-Reads, so ergibt sich praktisch das gleiche Bild (Abbildung 28). Diese Korrelationen, die auf den Daten für alle Arten zusammen beruhen, sind daher nicht geeignet, um die relative Häufigkeit von Arten oder die Biomasse aus der relativen Anzahl von Sequenzierungs-Reads vorherzusagen, da viele Datenpunkte außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls der Korrelationslinie liegen.

Abbildung 27: Korrelation zwischen der relativen Abundanz der Regenwurmarten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

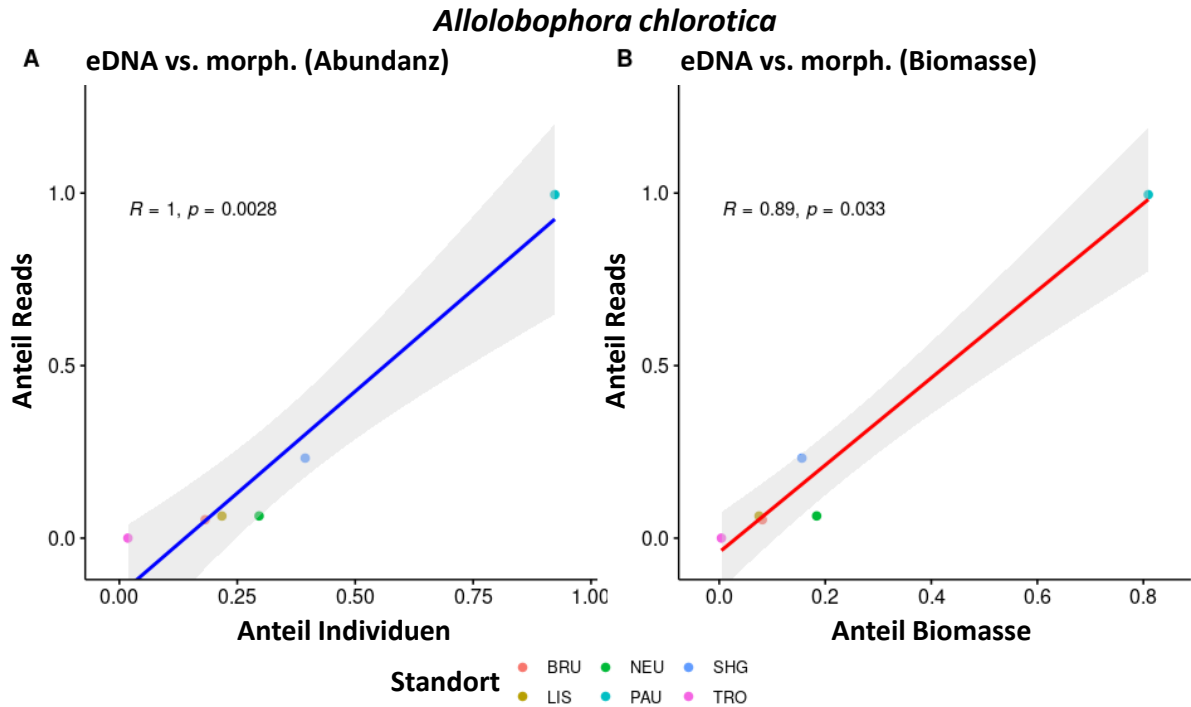
Abbildung 28: Korrelation zwischen der relativen Biomasse der Regenwurmarten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

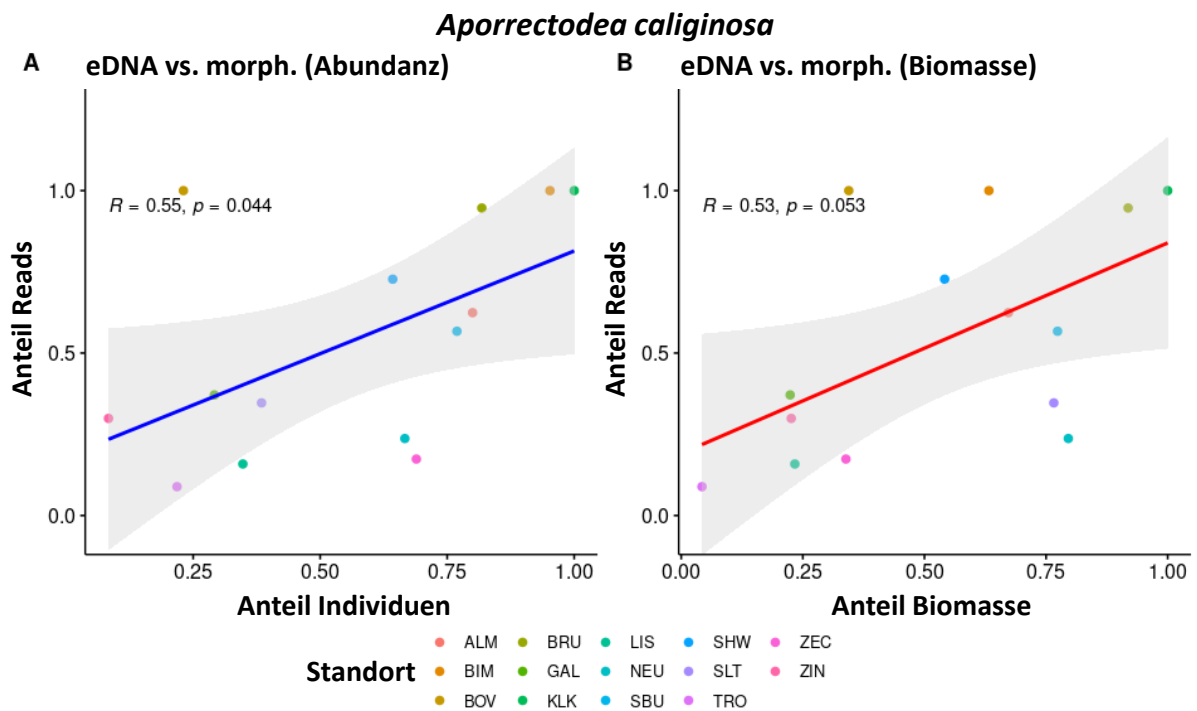
Wie sich im Rahmen der Betrachtung der Nachweishäufigkeit pro Art und Methode (Abschnitt 5.1.2.4) andeutete, scheint es bei den verschiedenen Regenwurmartentypen unter anderem aufgrund ihres Verhaltens bzw. ihrer Lebensform Unterschiede in der Menge und Verteilung der im Boden vorhandenen eDNA zu geben, so dass die Stärke dieser Korrelationen zwischen den Arten variieren könnte. Aus diesem Grund wurden diese Analysen einzeln für diejenigen Arten durchgeführt, die über genügend Datenpunkte verfügten, d. h. sie wurden häufig genug sowohl durch morphologische Bestimmung als auch durch eDNA-Metabarcoding am selben Standort nachgewiesen. Konkret handelte es sich dabei um die fünf Arten *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea longa*, *Aporrectodea rosea* und *Lumbricus terrestris*. Die Ergebnisse für die endogäische Art *A. chlorotica* finden sich in Abbildung 28 und zeigen eine starke und statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von *A. chlorotica* und dem Anteil der eDNA-Metabarcoding-Reads. Bei *A. caliginosa*, ebenfalls einer endogäischen Art, gab es dagegen eine nur sehr schwache und nur knapp statistisch signifikante Korrelation zwischen der relativen Abundanz und den eDNA-Metabarcoding-Reads. Für die relative Biomasse war die Korrelation ebenso schwach und nicht statistisch signifikant (Abbildung 30). Bei der endogäischen Art *A. rosea* wiederum war die Korrelation stark und statistisch signifikant für die relative Abundanz und deutlich sichtbar, wenn auch nicht statistisch signifikant für die relative Biomasse (Abbildung 31). Bei der Betrachtung der anektischen Arten zeigte sich, dass es keine Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von *A. longa* und der Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads gab (Abbildung 32), was gleichermaßen auch für *L. terrestris* galt (Abbildung 33). Es gab also Anzeichen dafür, dass die Korrelationen bei endogäischen Arten stärker sein könnten als bei anektischen Arten, was in der Folge näher untersucht wurde, indem die Korrelationen für die nach ihren ökologischen Gruppen zusammengefassten Arten berechnet wurden. Das Ergebnis bestätigte die Annahme: während für epigäische (Abbildung 34) und anektische Arten (Abbildung 36) keine statistisch signifikanten Korrelationen festgestellt werden konnten, zeigte sich für die endogäischen Arten eine starke und statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse und dem Anteil der eDNA-Metabarcoding-Reads (Abbildung 35).

Abbildung 29: Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von *Allolobophora chlorotica* und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



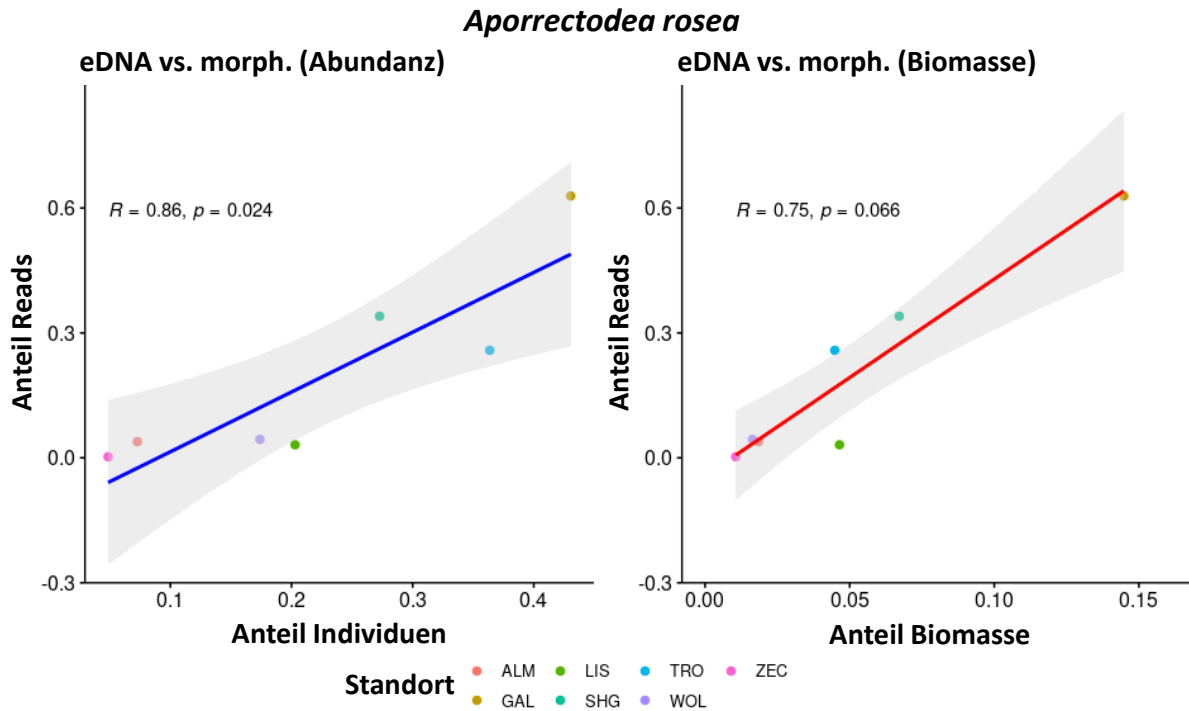
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 30: Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von *Aporrectodea caliginosa* und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



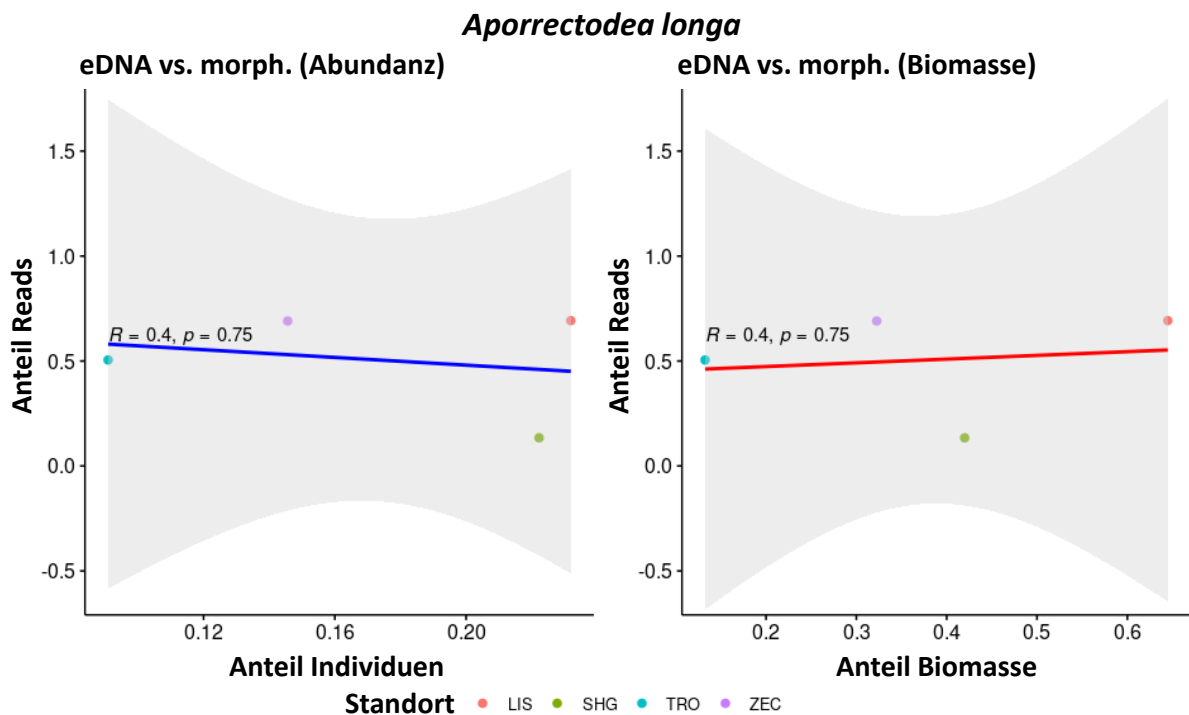
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 31: Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von *Aporrectodea rosea* und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



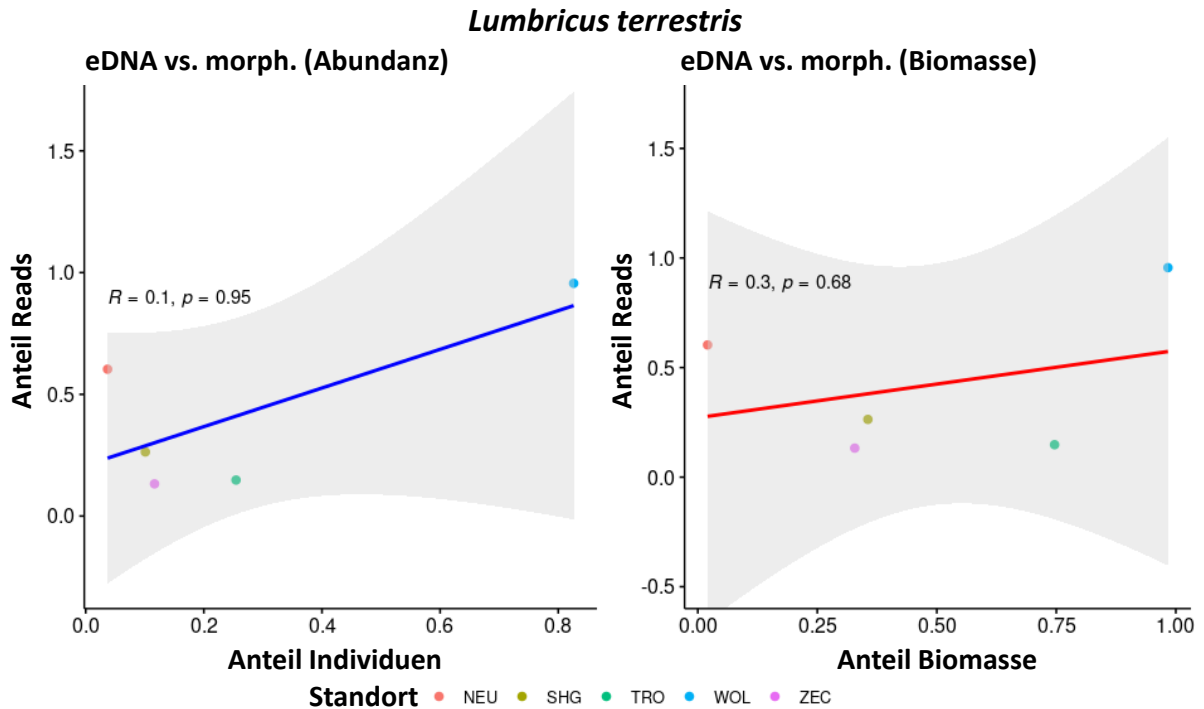
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 32: Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von *Aporrectodea longa* und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



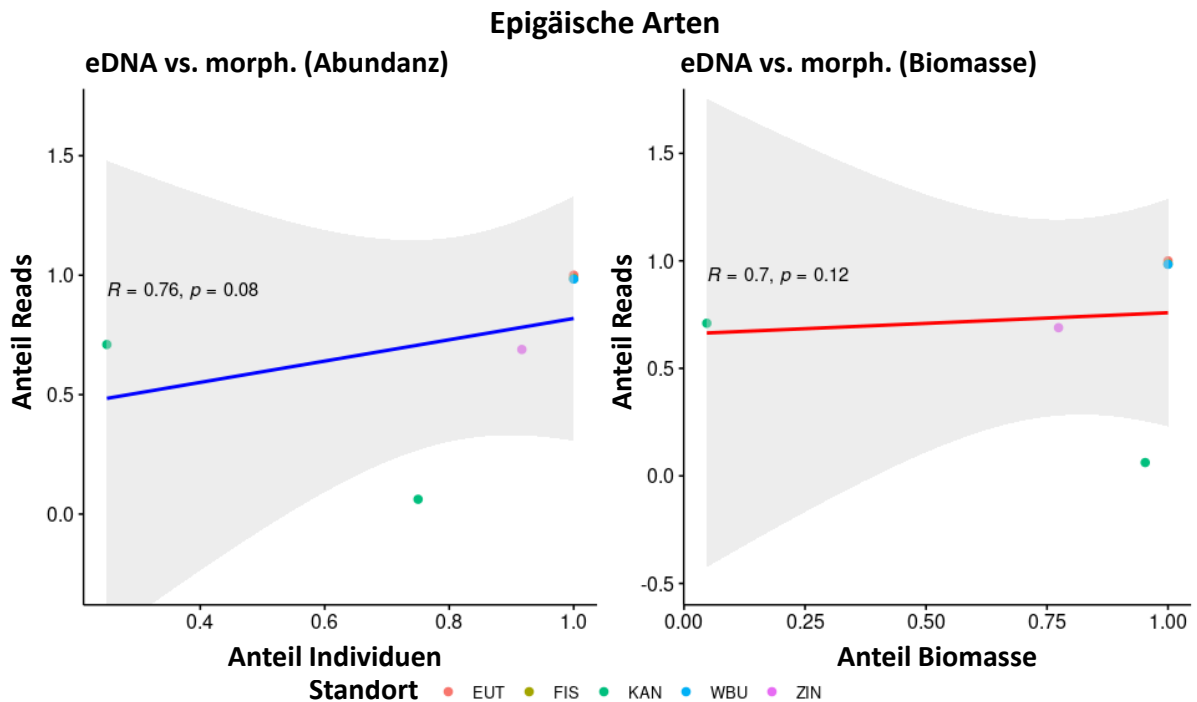
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 33: Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse von *Lumbricus terrestris* und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



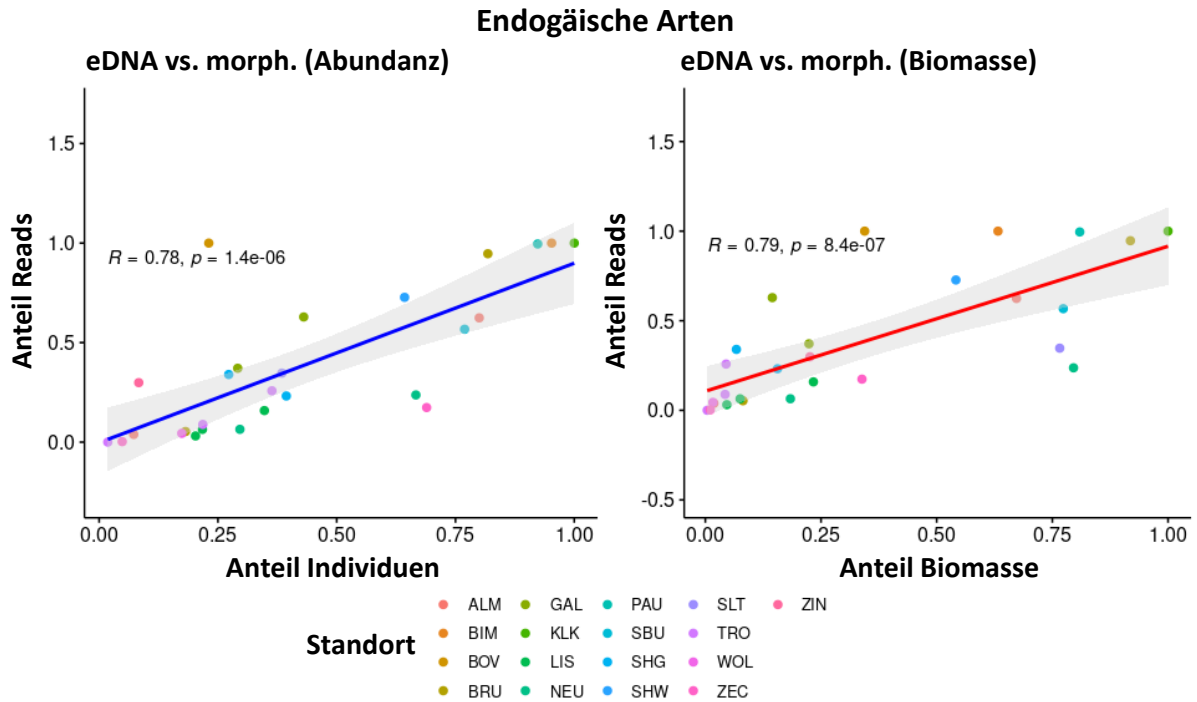
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 34: Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse epigäischer Arten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



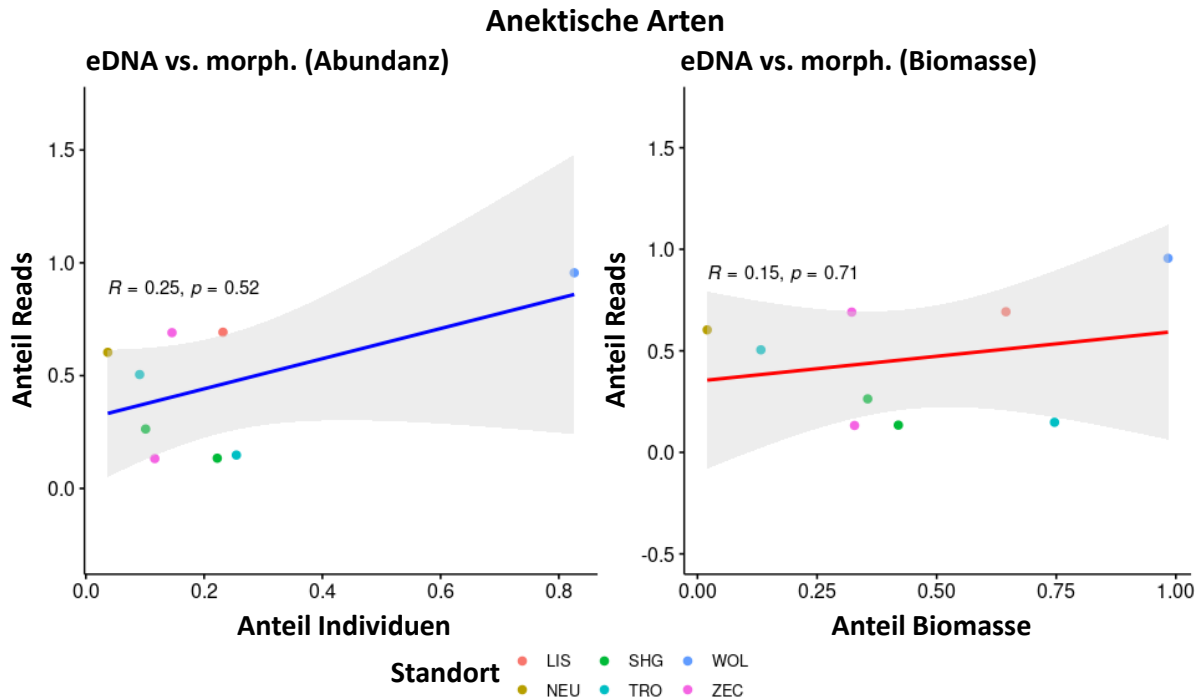
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 35: Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse endogäischer Arten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 36: Korrelation zwischen der relativen Abundanz und Biomasse anektischer Arten und der relativen Anzahl der eDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

5.1.2.7 Zusammenfassung des Regenwurm-Methodenvergleichs

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Regenwürmer lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ▶ Durch comDNA-Metabarcoding wurden häufig mehr Arten nachgewiesen als durch eDNA-Metabarcoding und durch morphologische Bestimmung.
- ▶ comDNA-Metabarcoding ist in der Lage, Individuen einer Art zuzuordnen, die morphologisch schwer zu bestimmen sind, z. B. Jungtiere, kryptische Arten und Fragmente.
- ▶ Im Durchschnitt wurden mittels eDNA-Metabarcoding ähnlich viele Arten nachgewiesen wie bei der morphologischen Identifizierung.
- ▶ Einige Arten scheinen eine höhere oder geringere Wahrscheinlichkeit zu haben, durch eDNA-Metabarcoding entdeckt zu werden als andere.
- ▶ Kleine epigäische Arten wurden in einigen Fällen anhand klassischer Probenahme und morphologischer Bestimmung nicht nachgewiesen.
- ▶ Alle drei Bestimmungsmethoden können zwischen Standorten mit unterschiedlicher Artenzusammensetzung differenzieren, der Grad der Trennung kann je nach Bestimmungsmethode unterschiedlich sein.
- ▶ Der relative Anteil der eDNA-Sequenzierungs-Reads zeigt Potenzial als Surrogat der relativen Abundanz oder Biomasse für endogäische, aber nicht für epigäische und anektische Arten.

5.1.3 Enchytraeiden

Mit den drei verwendeten und zu vergleichenden Methoden wurden auf den 25 untersuchten Bodendauerbeobachtungsflächen insgesamt 104 Enchytraeidenarten nachgewiesen, 84 davon mit validem Namen. Das sind gut zwei Drittel der bislang in Deutschland bekannten Enchytraeidenarten. Diese hohe Prozentzahl zeigt an, dass die Probenflächen gut und repräsentativ ausgewählt worden sind. Die verbleibenden 20 Arten sind neu für die Wissenschaft und müssen formal beschrieben werden. Morphologische Kurzdiagnosen und DNA-Barcodes liegen für die meisten von ihnen bereits vor; einige wurden im Rahmen dieses Projektes erstellt.

Die durchschnittliche Artenzahl pro BDF, differenziert nach Habitattypen, betrug 17,5 (8 – 25) für Ackerstandorte, 20 (9 – 29) für Waldstandorte, und 22 (15 – 31) für Grünlandstandorte; die durchschnittliche Abundanz betrug, in derselben Reihenfolge, 13287, 37567, und 31381 Ind./m².

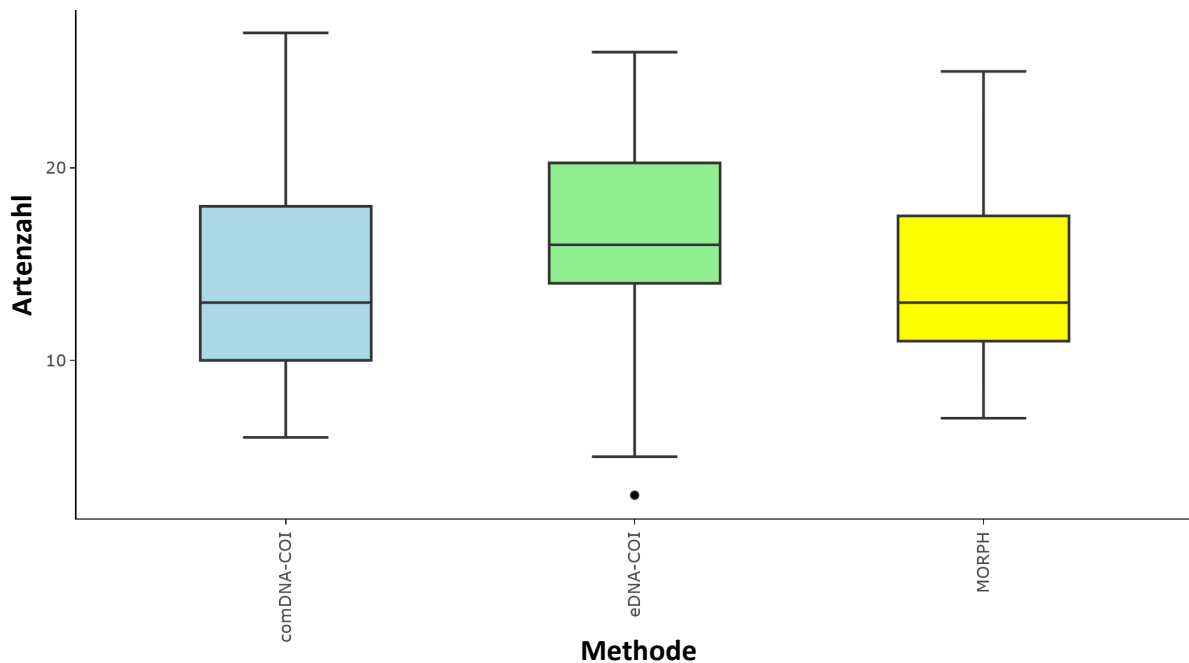
Im Folgenden werden die drei Methoden hinsichtlich Artenzahl, Artenzusammensetzung und Artabundanz verglichen. In einem vierten Schritt wird das unterschiedliche ökologische Verhalten der Arten in den Methodenvergleich mit einbezogen, und dieser Vergleich anhand eines Beispiels, eines sauren Buchenwaldstandortes im Nationalpark Eifel (WBU, siehe Abschnitt 4.1), durchgeführt.

Um eine Vergleichbarkeit der drei mit unterschiedlichen Methoden erstellten Datensätze zu gewährleisten, wurden die in Abschnitt 5.1.1.1 vorgestellten Bereinigungsverfahren vorgenommen. Der Vergleich der anhand der drei Bestimmungsmethoden identifizierten Enchytraeidenarten pro Standort anhand von UpSet-Diagrammen und Artenlisten findet sich im Anhang B.2.

5.1.3.1 Artenzahl

Im Gesamtvergleich aller 25 Probestellen lieferten alle drei Methoden vergleichbare Artenzahlen (Abbildung 37), wobei die Methode des eDNA-Metabarcodings erhöhte Werte zeigte.

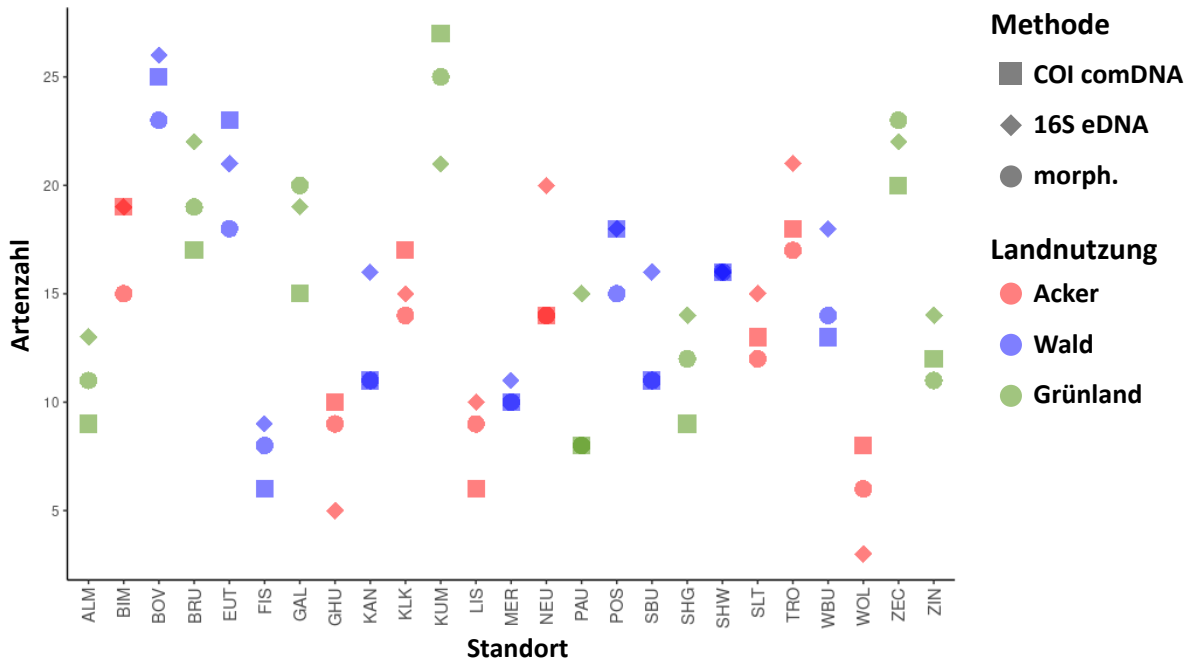
Abbildung 37: Box-Whisker-Plot (vgl. 5.1.1.2.2), der die Verteilung des Artenreichtums der Enchytraeiden pro Bestimmungsmethode über alle Standorte zeigt. Links: comDNA, Mitte: eDNA, rechts: Morphologie



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Auch im Einzelvergleich der Standorte sowie im Vergleich der Nutzungstypen lieferten die drei Methoden vergleichbare Ergebnisse. Abbildung 38 zeigt die Artenzahlen je Standort und Methode. Die Abweichungen zwischen den Methoden sind so gering, dass jede von ihnen für eine Standortcharakterisierung herangezogen werden kann, wenn Artenzahl ein Zielparameter ist. Zudem zeigt es sich, dass keine der drei Methoden grundsätzlich besser oder schlechter ist als die anderen: Alle drei liefern, je nach Standort, Maximal- oder Minimalwerte.

Abbildung 38: Artenreichtum der Enchytraeiden pro Bestimmungsmethode und Standort. Nutzungstypen sind farblich, Bestimmungsmethoden mit Symbolen unterschieden (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

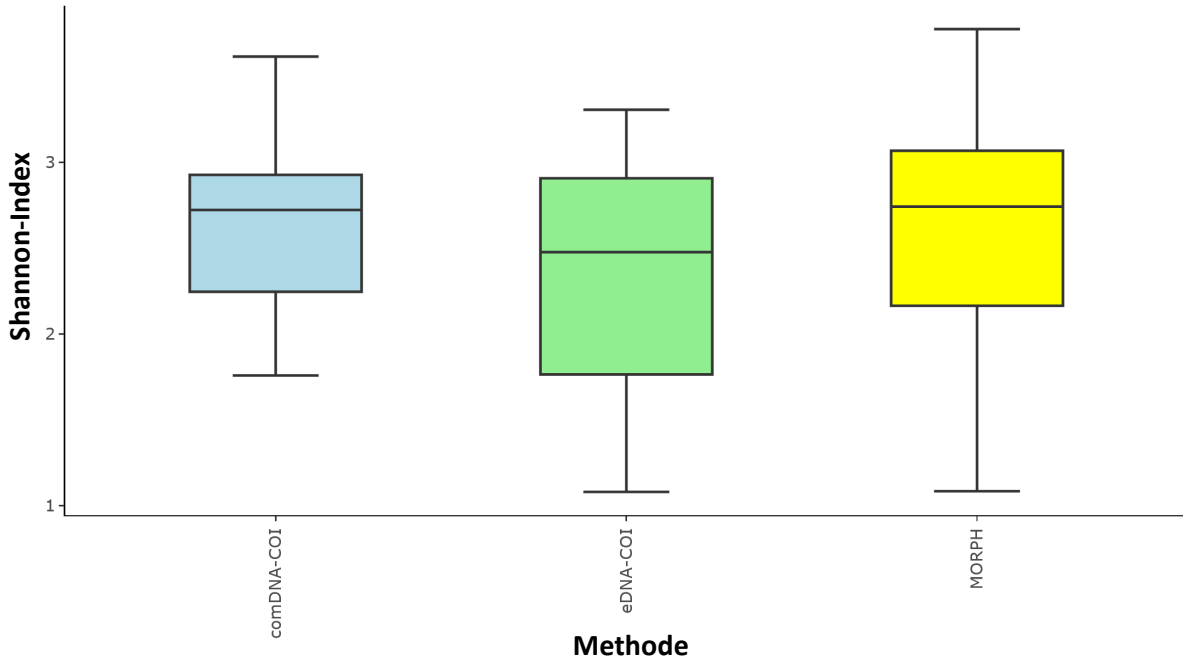
Die Artenzahl ist ein wichtiger Parameter für die biologische Beurteilung eines Standorts, hat aber für den Methodenvergleich nur eingeschränkte Aussagekraft, weil derselben Artenzahl bei zwei Standorten unterschiedliche Arten zugrunde liegen können. Es ist also unerlässlich, die Artidentität mit hinzuzuziehen.

5.1.3.2 Artenzusammensetzung

Eine erste Annäherung für die Beurteilung der Vergleichbarkeit der drei Bestimmungsmethoden mit Hinblick auf die Artenzusammensetzung gibt Abbildung 39, eine Darstellung des über alle Standorte hinweg kalkulierten Shannon-Index (zu Details siehe Abschnitt 5.1.2.2). In den Shannon-Index gehen die Artidentität und Artabundanz mit ein. Diversitäts-Werte divergierten am meisten bei den DNA-basierten Bestimmungsmethoden, dies könnte mit methodenbedingter Unsicherheit der quantitativen Daten (Schwankungen der Anzahl von Sequenzierungs-Reads) zusammenhängen. Wichtiger ist hier der mediane Diversitätsindex, bei allen drei Methoden fast gleich; signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt (Kruskal-Wallis-Test).

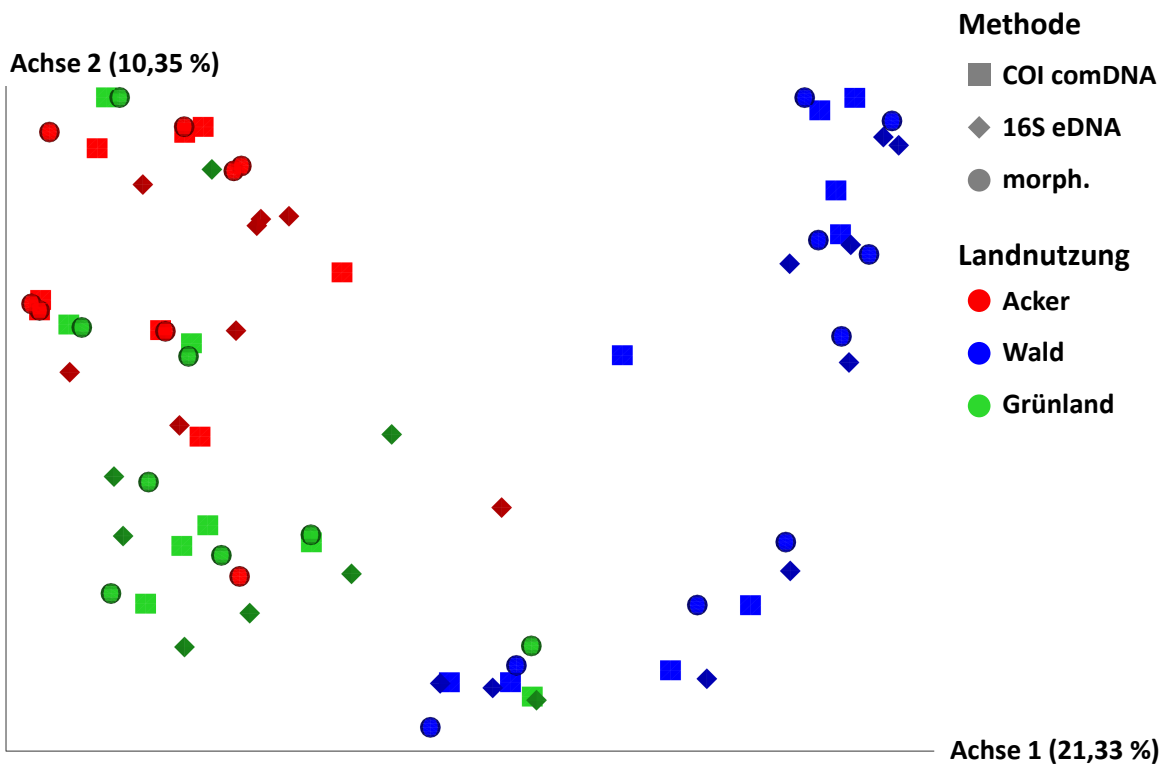
Weiteren Aufschluss gibt Abbildung 40, welche die Unterschiede der einzelnen Standorte nach Nutzungstyp im Hinblick auf Vorkommen oder Fehlen von Arten in einem zweidimensionalen Hauptkoordinatendiagramm, dem die jeweiligen Jaccard-Indices zugrunde liegen, darstellt (zu Details siehe Abschnitt 5.1.1.2.4). Mit allen drei Methoden wird zum einen der Nutzungstyp Wald von den Nutzungstypen Acker und Grünland abgegrenzt; zum anderen zeigen sich Acker und Grünland stark durchmischt, sind aber nicht deckungsgleich.

Abbildung 39: Box-Whisker-Plot, der die Verteilung der Diversität (Shannon-Index) der Enchytraeiden pro Bestimmungsmethode über alle Standorte zeigt



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Abbildung 40: Hauptkoordinatenanalyse auf Grundlage der Ähnlichkeit (Jaccard-Koeffizient) zwischen Standorten und Bestimmungsmethoden bezüglich der Enchytraeiden-Artenzusammensetzung (Präsenz/Absenz)

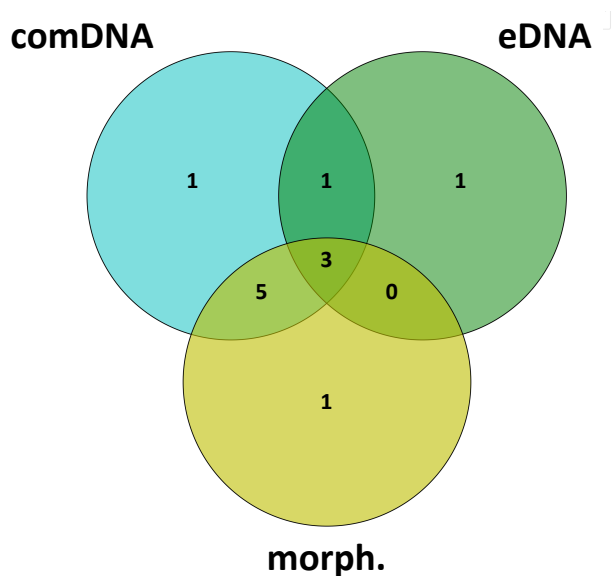


Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Für einen genaueren Vergleich der drei Bestimmungsmethoden und der Suche nach Gründen für Unterschiede ist es hilfreich, ins Detail zu gehen und die jeweiligen Artenlisten direkt miteinander zu vergleichen. Dies müsste Standort für Standort geschehen, wird aber hier, aus Platzgründen, an nur zwei Beispielen vorgestellt, einem mit vergleichsweise minimaler und einem mit besonders guter Übereinstimmung der Artenlisten, wie sie mit den drei unterschiedlichen Bestimmungsmethoden erstellt worden sind.

Schlechte Übereinstimmung zeigt der Ackerstandort Großenhül (GHU) in Bayern (Abbildung 41). Nur drei der 12 Arten wurden mit allen drei Methoden nachgewiesen. Jede Methode hat eine ‚exklusive‘ Art, die von den jeweils anderen Methoden nicht entdeckt worden ist. Die größte Übereinstimmung besteht zwischen morphologischer Bestimmung und comDNA-Metabarcoding (67 %).

Abbildung 41: Venn-Diagramm zur Veranschaulichung der Übereinstimmungen und Unterschiede der drei Methoden hinsichtlich von Enchytraeiden-Artenfunden am Standort Großenhül (GHU)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 17 und weitere Daten bestätigen, dass das Hauptproblem hier in der Durchführung des eDNA-Metabarcodings zu suchen ist. Hier standen nur 198 Reads zur Auswertung zur Verfügung, gegenüber 22888 Reads beim comDNA-Metabarcoding. Offensichtlich war die Menge an isolierter eDNA unzureichend, um einen Großteil der Arten zu entdecken. Diese Vermutung wird unterstützt durch die ungewöhnlich niedrige Abundanz von errechneten 2956 Ind./m² in den für morphologische Bestimmung und comDNA-Metabarcoding bestimmten Proben.

Tabelle 17: Methodenvergleich zum Artennachweis am Standort Großenhül (GHU), Bayern

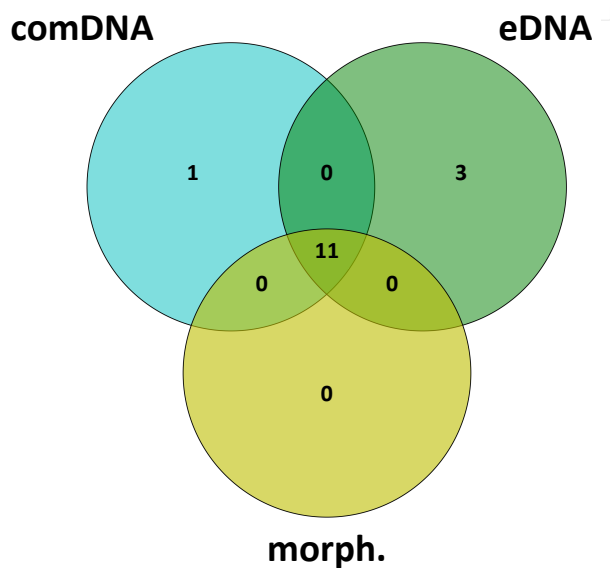
Taxon	morph	comDNA	eDNA
<i>Cernosvitoviella</i> sp.	*		
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	*	*	
<i>Enchytronia christenseni</i>	*	*	
<i>Enchytronia parva</i>		*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	
<i>Fridericia isseli</i>	*	*	
<i>Fridericia sylvatica</i>			*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Marionina mendax</i>	*	*	
Summe	10	10	5

Weitere Unterschiede können auf unterschiedliche Weise erklärt werden:

- ▶ *Cernosvitoviella* sp. war mit nur einem juvenilen Tier in den Proben vertreten, und die DNA dieser sehr kleinen Art hat offensichtlich für einen comDNA-Metabarcoding-Nachweis nicht ausgereicht.
- ▶ Das Fehlen von *Enchytronia parva* in der morphologischen Bestimmung geht offenbar auf einen Bestimmungsfehler zurück oder auf einen Fehler in der DNA-Referenzdatenbank. Zur Klärung könnte das der DNA-Referenzsequenz zugrundeliegende Exemplar, wenn es denn vorliegt, morphologisch nachuntersucht werden.
- ▶ *Fridericia sylvatica*, nur mit eDNA-Metabarcoding nachgewiesen, ist eine an diesem Standort zu erwartende Art, die offensichtlich aus Zufallsgründen in den für morphologische Bestimmung und comDNA-Metabarcoding bestimmten Proben fehlte. Nachbesammlung des Standorts würde hier Klarheit verschaffen.

Gute Übereinstimmung zeigte der Grünland-Standort Zingst (ZIM) in Mecklenburg-Vorpommern (Abbildung 42): Elf der 15 insgesamt nachgewiesenen Arten wurden mit jeder der drei verwendeten Methoden aufgedeckt. Der Nachweis von drei Arten nur mit eDNA-Metabarcoding (Tabelle 18) deutet darauf hin, dass der Artenbestand noch nicht komplett erfasst ist. Der Nachweis der sehr kleinen Art *Hemifridericia parva* nur mit comDNA-Metabarcoding deutet auf einen Bestimmungsfehler. Allerdings sind auch Fehler in der Referenzdatenbank oder bei der rechnerischen Aufbereitung der Daten möglich. *Bryodrilus parvus* wurde selten gefunden.

Abbildung 42: Venn-Diagramm zur Veranschaulichung der Übereinstimmungen und Unterschiede der drei Methoden hinsichtlich von Enchytraeiden-Artensfunden am Standort Zingst (ZIN)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 18: Methodenvergleich zum Artennachweis am Standort Zingst (ZIM) in Mecklenburg-Vorpommern

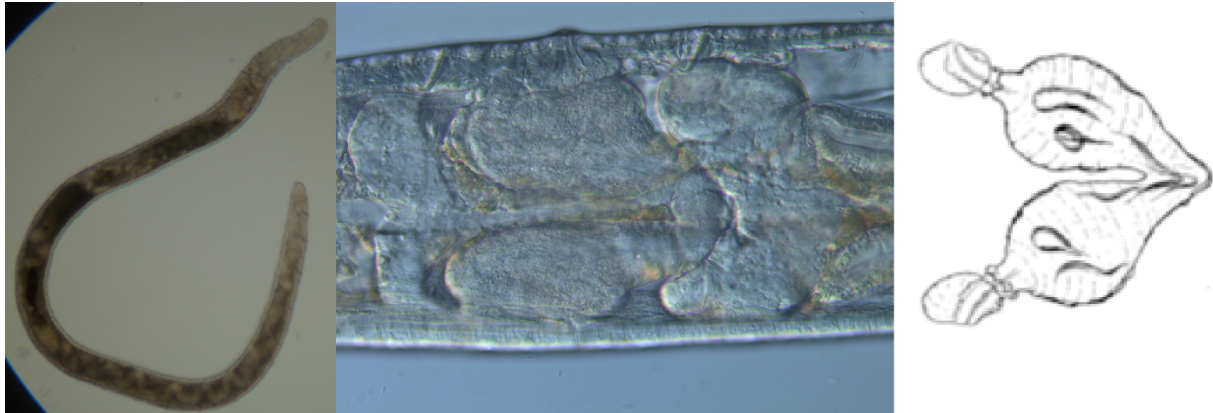
Taxon	morph	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>			*
<i>Bryodrilus parvus</i>			*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Cognettia varisetosa</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia cylindrica</i>	*	*	*
<i>Fridericia dura</i>	*	*	*
<i>Fridericia paroniana</i>			*
<i>Fridericia ratzeli</i>	*	*	*
<i>Hemifridericia parva</i>		*	
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	*
<i>Marionina communis</i>	*	*	*
Summe	11	12	14

Zusammenfassend kann eine gute Übereinstimmung der drei Methoden konstatiert werden, wenn es sich um Präsenz/Absenz-Daten von Arten handelt. Selbst für den Standort Großenhül (GHU) kann anhand der eDNA-Metabarcoding-Daten eine Aussage getroffen werden, wenn das ökologische Verhalten der Arten in die Auswertung mit einbezogen wird (s. u.; Abschnitt 5.1.2.4).

Es soll abschließend noch einmal hervorgehoben werden, dass Unterschiede im Artnachweis auf unterschiedliche aber weitgehend behebbare Faktoren zurückgehen können. Diese seien hier noch einmal kurz vorgestellt:

1. Ein Nachweis mit morphologischer Bestimmung bei Nichtnachweis durch comDNA- und eDNA-Metabarcoding kann auf einer Fehlbestimmung beruhen, oder auf dem Fehlen von DNA-Referenzsequenzen dieser Art, oder darauf, dass DNA-Referenzsequenzen zwar vorhanden sind, diese aber von einem fehlbestimmten Individuum stammen, oder von einer anderen genetischen Linie innerhalb eines Artenkomplexes. Ebenfalls möglich sind Fehler bei der DNA-Amplifizierung. Diese verwirrende Vielzahl von Faktoren kann durch eine einfache Sanger-Sequenzierung der morphologisch identifizierten Individuen geklärt werden. Dies wurde innerhalb dieses Projektes auch mehrfach durchgeführt. Ein Beispiel ist *Enchytronia pratensis* Chalupský, 1994 (Abbildung 43), dessen Nachweis auf der BDF Sülstorf (SLT) in Mecklenburg-Vorpommern ein Erstfund nach der Originalbeschreibung darstellt, und deren COI-DNA-Barcodesequenz deshalb naturgemäß noch unbekannt war. Erst die Sanger-Sequenzierung machte diese Art den beiden DNA-basierten Methoden zugänglich.
Ein Negativbeispiel ist *Fridericia hegemon*: Diese größte mitteleuropäische terrestrische Enchytraeidenart wurde an vier Standorten morphologisch nachgewiesen aber niemals mit den DNA-Methoden, obwohl eine publizierte COI-Referenzsequenz für die Art verfügbar ist. Da aufgrund der Körpergröße Mangel an zu amplifizierendem DNA-Material als Grund auszuschließen ist, ist davon auszugehen, dass entweder DNA nicht amplifiziert wurde (sog. ‚primer bias‘) oder dass der in Deutschland vorherrschende Genotyp ein anderer als der in der Referenzdatenbank vorliegende ist. Dies würde bedeuten, dass es sich bei *F. hegemon* um eine Gruppe kryptischer Arten handelt. Das Problem wurde leider zu spät erkannt, wird aber leicht durch Sanger-Sequenzierung von Referenzexemplaren, die zum Glück isoliert worden sind, gelöst werden können.
2. Ein Nachweis mit eDNA-Metabarcoding bei Nichtnachweis durch morphologische Bestimmung und comDNA-Metabarcoding kann darauf beruhen, dass diese Art tatsächlich an diesem Standort vorkommt, in den für morphologische Bestimmung und comDNA-Metabarcoding bestimmten Proben aber aus Zufallsgründen fehlte, oder darauf, dass eine Laborkontamination oder ein Fehler in der Datenbearbeitung zu einem artifizialen Resultat geführt hat. Wiederholte Probenahme und eDNA-Sequenzierung sollte hier eine Klärung verschaffen.
3. Ein Nachweis mit comDNA-Metabarcoding bei Nichtnachweis durch morphologische Bestimmung beruht entweder auf juvenilen Individuen, die bei gewissen Arten morphologisch nicht zur Art bestimmbar sind, und bei denen die DNA-Methoden in einem klaren Vorteil sind, oder auf Fehlbestimmung. Auch hier ist wiederholte Beprobung des Standorts, verbunden mit einer Nachuntersuchung des den Referenzsequenzen zugrundeliegenden Exemplars, zu empfehlen.

Abbildung 43: *Enchytronia pratensis* Chalupský, 1994. Links, Habitus; Mitte, mikroskopische Details der Spermathekenregion; Rechts, Zeichnung der Spermatheke aus der Originalbeschreibung



Quelle: Links, Mitte: eigene Darstellung, Rüdiger M. Schmelz; Rechts: Chalupský (1994), Fig. 5

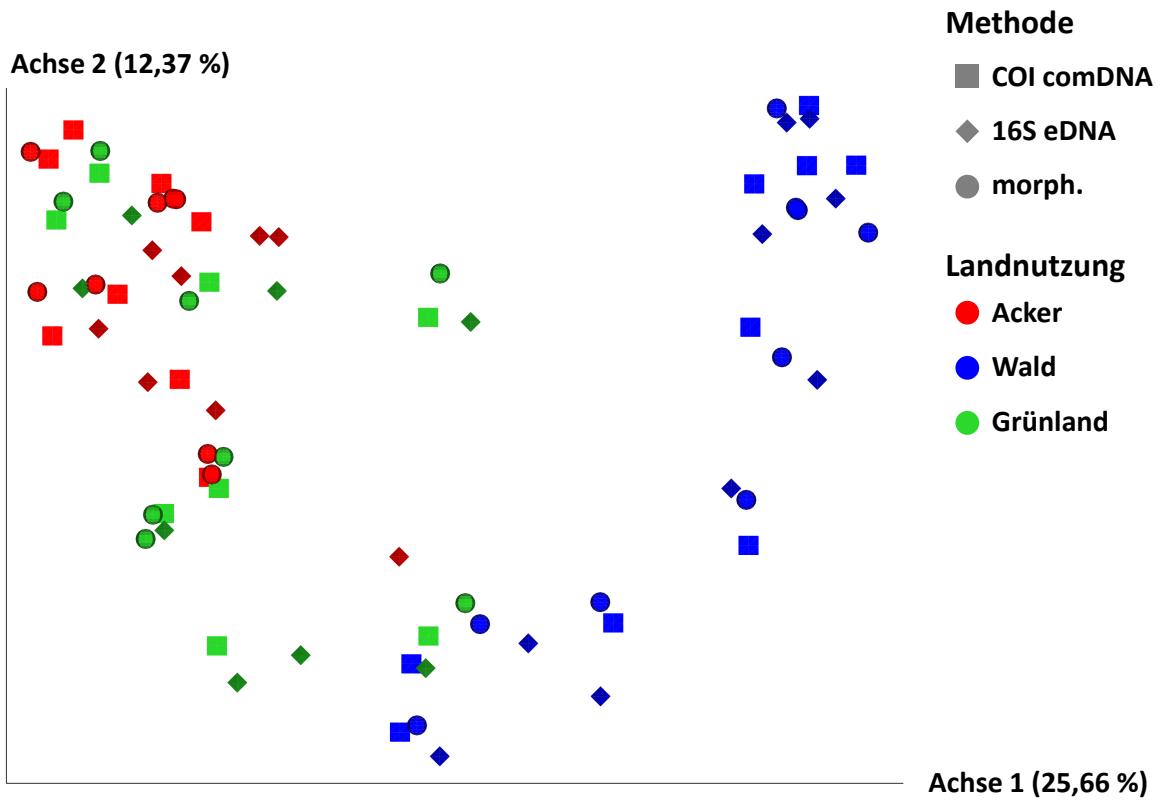
5.1.3.3 Artenabundanz

Die DNA-Metabarcoding-Methoden produzieren quantitative Daten in Form von Lesezahlen, ‚number of reads‘, die im Idealfall die quantitativen Verhältnisse der DNA-Sequenzen in den Ausgangsproben widerspiegeln und in einem Verhältnis zur Abundanz oder Biomasse stehen sollten. Dies wurde im Rahmen dieses Projektes getestet.

Zunächst wurden in einer Hauptkoordinatenanalyse (siehe Abschnitt 5.1.1.2.4) die Unähnlichkeiten auf der Grundlage von Artenabundanzen (Bray-Curtis Koeffizient) zwischen Standorten und Bestimmungsmethoden verglichen, wobei die Anzahl der Reads als Proxy für die Abundanz verstanden wurden (Abbildung 44). Mit allen drei Methoden wird zum einen der Nutzungstyp Wald von den Nutzungstypen Acker und Grünland abgegrenzt; zum anderen zeigen sich Acker und Grünland stark durchmischt, sind aber nicht deckungsgleich. Das Ergebnis unterscheidet sich nicht von der auf Präsenz und Absenz von Arten basierten Analyse (vgl. Abbildung 40).

In einem zweiten Schritt wurden die mit der morphologischen Methode ermittelten Abundanzen in Biomasse umgerechnet. Hierfür wurde für jede Art ein ihr entsprechender mittlerer Wert ermittelt, der auf umfangreichen Messungen beruhte. Hintergrund war die Überlegung, dass die Lesezahlen idealerweise die DNA-Menge repräsentieren und dass diese eher der Biomasse als der Abundanz einer Art entspricht: Enchytraeiden unterscheiden sich in der Biomasse in der Größenordnung von 1 : 1000, wenn man die kleinsten und größten Arten gegenüberstellt (z. B. *Marionina deminuta*, Biovolumen 0,009 mm³, vs. *Fridericia hegemon*, Biovolumen 9 mm³). Weiterhin wurden sämtliche Werte in Prozente umgerechnet, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Als Ergebnis wird hier beispielhaft die bereits aus Tabelle 17 bekannte Artentabelle zum Standort Großenhül (GHU) vorgestellt, die nun vier Datensätze, in Prozentwerte umgerechnet, enthält (Tabelle 19).

Abbildung 44: Hauptkoordinatenanalyse auf Grundlage der Unähnlichkeit (Bray-Curtis-Koeffizient) zwischen Standorten und Bestimmungsmethoden bezüglich der Enchytraeiiden-Artenzusammensetzung plus Artenabundanz



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

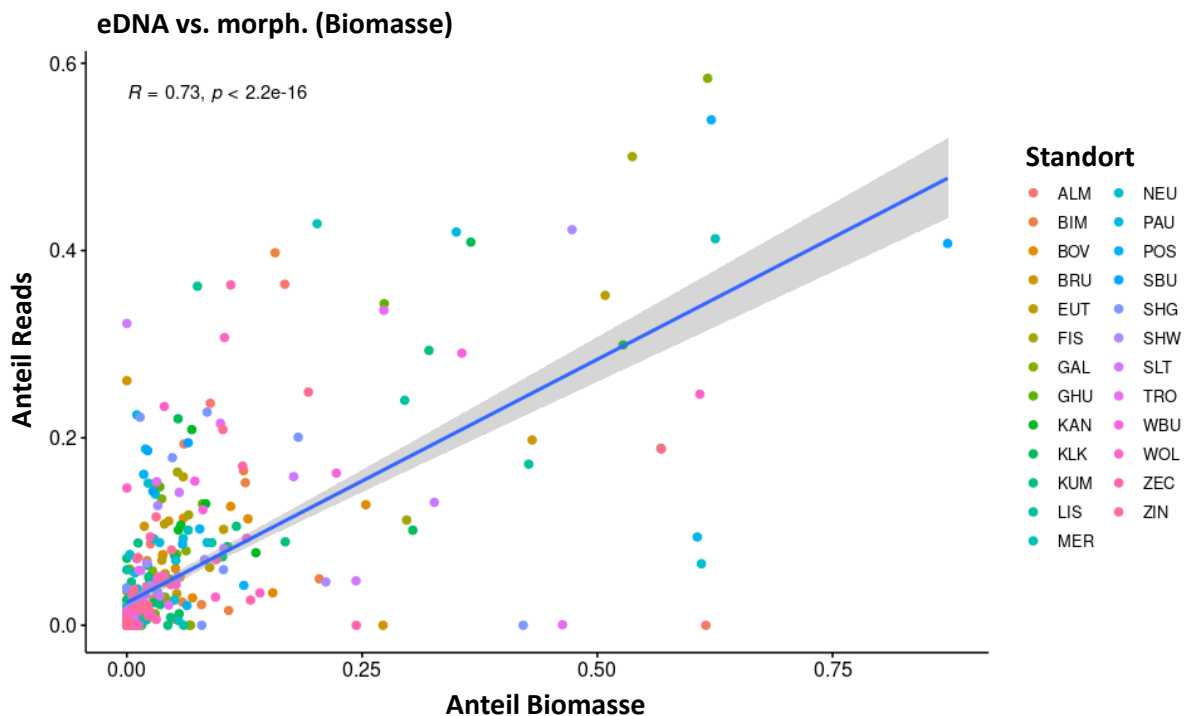
Nun wurde untersucht, ob es eine sichtbare Korrelation zwischen der relativen Abundanz oder Biomasse der Arten und der relativen Anzahl der comDNA- oder eDNA-Sequenzierungsdaten gab.

Abbildung 45 zeigt eine schwache ($R = 0,73$), aber statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen dem Anteil der durch comDNA-Metabarcoding gewonnenen Sequenzierungs-Reads und der relativen Biomasse der an jedem Probenahmeort morphologisch bestimmten Arten. Allerdings liegen fast alle Punkte außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls der Korrelationslinie; deshalb kann die relative Anzahl von Sequenzierungs-Reads nicht die Biomasse von Arten vorhersagen. Dasselbe gilt für die anderen möglichen Kombinationen eDNA-Abundanz, eDNA-Biomasse, comDNA-Abundanz (nicht gezeigt hier). In allen drei Fällen ist der Korrelationskoeffizient noch geringer als in Abbildung 45.

Tabelle 19: In Prozentwerte umgerechnete Daten zu Abundanz, Biomasse, comDNA-Reads, eDNA-Reads der am Standort Großenhül (GHU) gefundenen Arten

Relative (%):	Abundanz	Biomasse	comDNA	eDNA
<i>Cernosvitoviella</i>	1,7	0,1	0	0
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	25,8	3,4	13,2	10,1
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	0	3,4	0,9	0
<i>Enchytronia christenseni</i>	3,5	1	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	0	1	0,7	45,5
<i>Fridericia bulboides</i>	8,6	4,4	15,1	0
<i>Fridericia christeri</i>	29,3	10,1	35	40,9
<i>Fridericia galba</i>	10,4	59,2	19,2	0
<i>Fridericia isseli</i>	1,7	4,4	0,9	0
<i>Fridericia sylvatica</i>	0	9	0	2,5
<i>Henlea perpusilla</i>	8,6	3,7	14,6	1
<i>Marionina mendax</i>	10,4	0,4	0,4	0
	Ind. m ⁻²	mg m ⁻²	Gesamt-Reads	Gesamt-Reads
	2956	3,124	22888	198

Abbildung 45: Korrelation zwischen der relativen Biomasse der Enchytraeiden-Arten und der relativen Anzahl der comDNA-Metabarcoding-Reads (Standortkürzel siehe Tabelle 4)



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

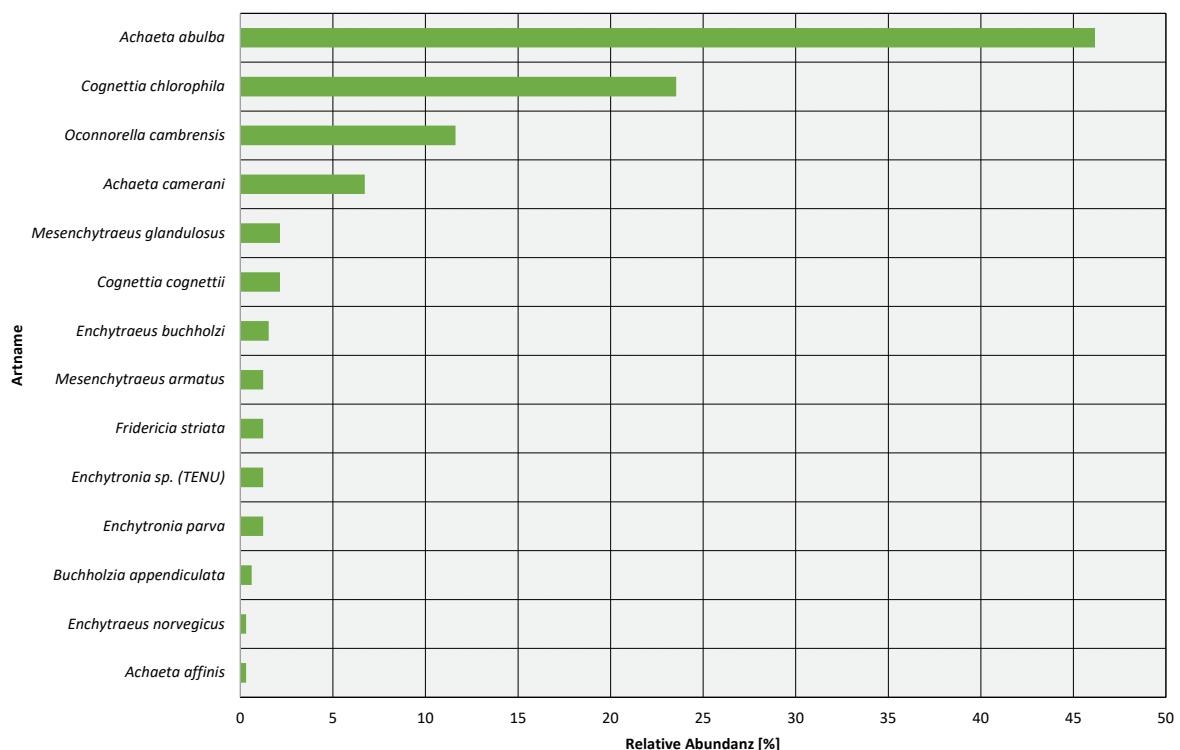
Abschließend ist also festzustellen, dass sich die Anzahl von Metabarcoding-Reads sich nicht als Proxy für Biomasse oder Abundanz einzelner Arten verwenden lässt. Im Folgenden soll aber anhand eines Beispiels gezeigt werden, dass sie dennoch nicht nutzlos sind.

5.1.3.4 Abundanz ökologischer Gruppen

Der Standort Wächterbuche (WBU) im Nationalpark Eifel in Nordrhein-Westfalen wird bestockt von einem alten Buchenwald auf Braunerde mit einem pH von 3,4 (CaCl₂). Vierzehn Arten wurden nachgewiesen, elf davon mit jeder der drei Methoden; deren Übereinstimmung hinsichtlich Präsenz/Absenz ist also relativ gut. Fünf Arten wurden nur mit eDNA-Metabarcoding nachgewiesen. Ein Vergleich der quantitativen Werte zeigt, dass Metabarcoding-Reads (Abbildung 48, Abbildung 49) nicht zur Vorhersage von Abundanz- und nur sehr bedingt zur Vorhersage von Biomassewerten einzelner Arten herangezogen werden können. Fasst man hingegen die Arten zu ökologischen Gruppen zusammen, ändert sich das Bild. Die Präferenzen der einzelnen Enchytraeiden-Arten im Hinblick auf verschiedene Umweltparameter (pH, Feuchte, Salinität) sind gut bekannt (Graefe & Schmelz 1999). In allen vier Graphen (Abbildung 46 bis Abbildung 49) dominieren die Säurezeiger oder Mäßigsäure-Zeiger mit > 90 %. Starksäure-Zeiger oder Schwachsäure-Neutralzeiger sind entsprechend schwach vertreten.

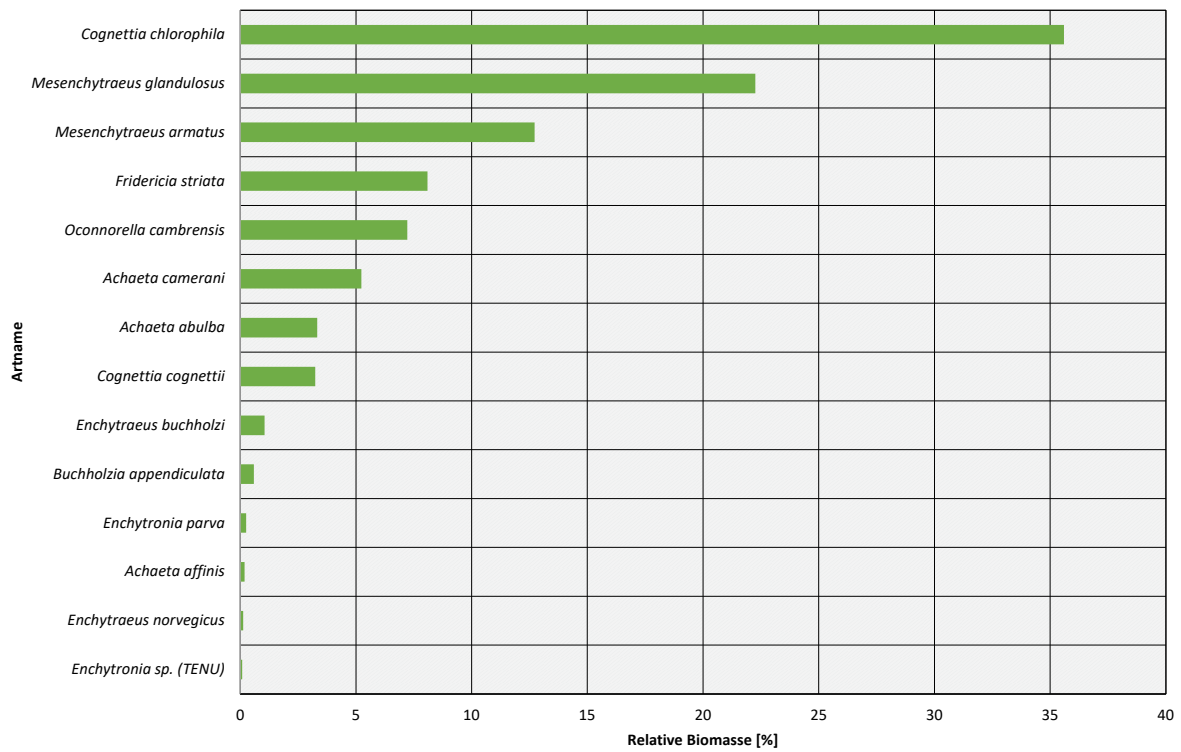
Es besteht also die Möglichkeit, dass das quantitative DNA-Metabarcoding doch Verwendung finden kann, wenn man sich statt auf Arten auf ökologisch/funktionell umschriebene Artengruppen konzentriert. Dieser Aspekt kann hier nicht weiterverfolgt werden, sollte aber in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Abbildung 46: Relative Artenabundanz der Enchytraeiden am Standort Wächterbuche (WBU)



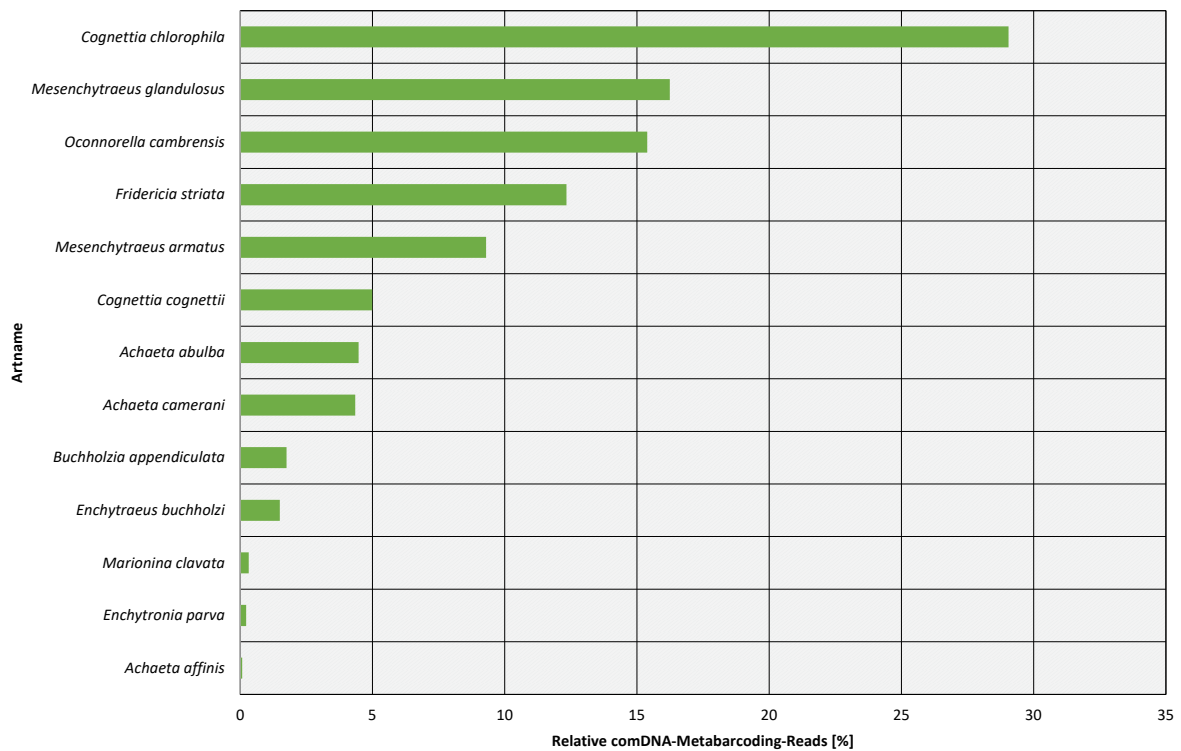
Quelle: eigene Darstellung, Rüdiger M. Schmelz

Abbildung 47: Relative Biomasse der Enchytraeiden am Standort Wächterbuche (WBU)



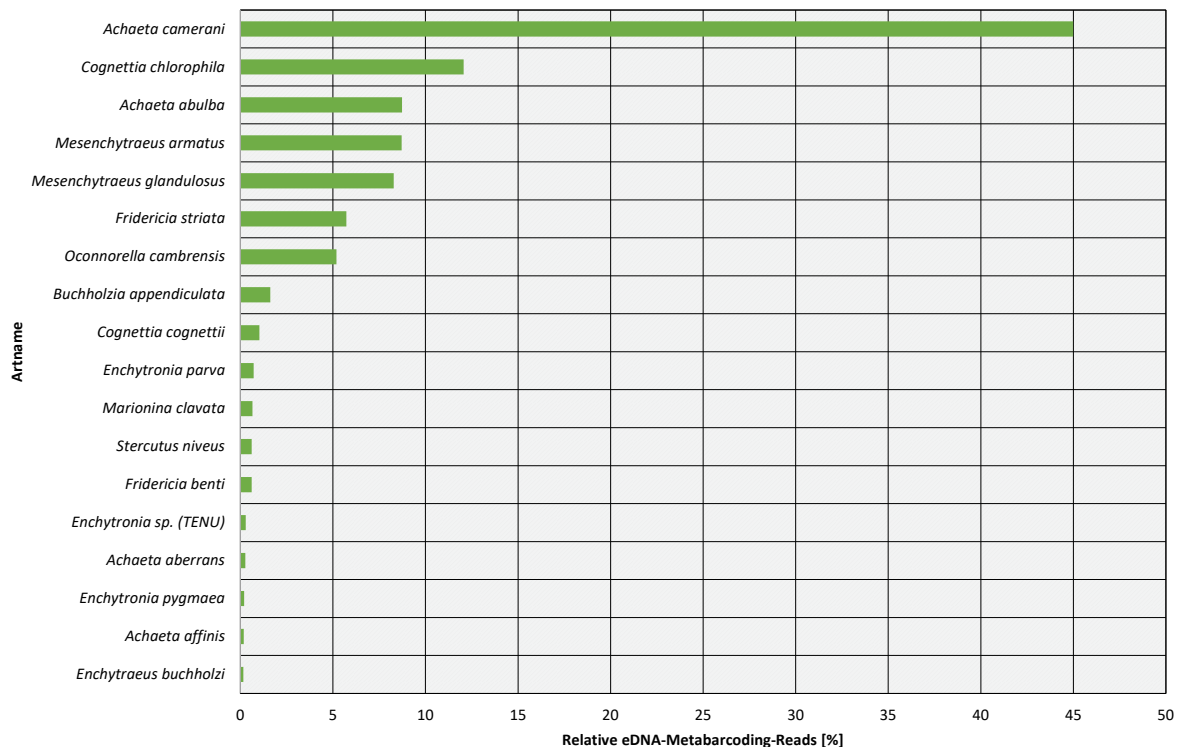
Quelle: eigene Darstellung, Rüdiger M. Schmelz

Abbildung 48: Relative comDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden am Standort Wächterbuche (WBU)



Quelle: eigene Darstellung, Rüdiger M. Schmelz

Abbildung 49: Relative eDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden am Standort Wächterbuche (WBU)



Quelle: eigene Darstellung, Rüdiger M. Schmelz

5.1.3.5 Zusammenfassung des Enchytraeiden-Methodenvergleichs

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Enchytraeiden lassen sich wie folgt zusammenfassen:

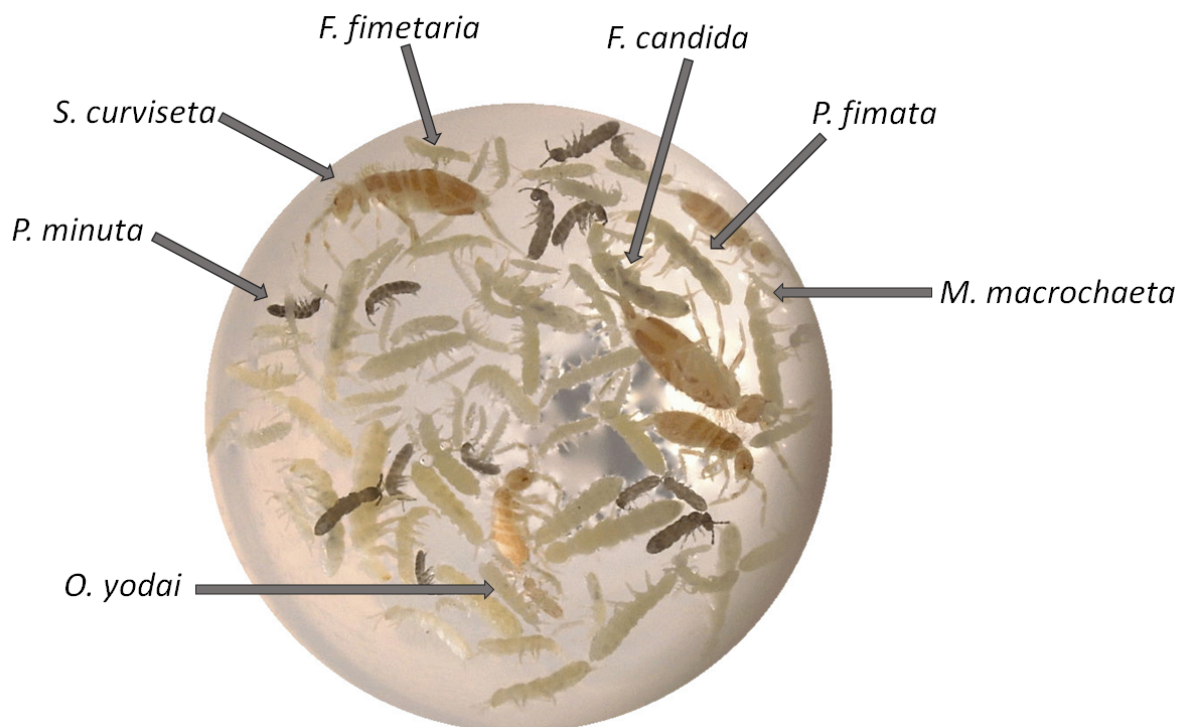
- ▶ Die Artenzahl und Artenzusammensetzung eines Standortes werden mit jeder der drei Methoden angemessen beschrieben. Eine Kombination der Methoden führt zu besseren Resultaten.
- ▶ DNA-Metabarcoding-Methoden eignen sich nicht zur Vorhersage von Abundanz oder Biomasse einzelner Arten, aber es gibt Hinweise, dass sie den quantitativen Anteil ökologischer/funktioneller Gruppen angemessen beschreiben.
- ▶ Jede Methode hat ihre spezifischen Fehlerquellen. Ein Großteil ist mit Rekurs auf andere Methoden behebbar.
- ▶ Für die DNA-Metabarcoding-Methoden kann die Bedeutung einer kompletten und gut kuratierten Referenz-Datenbank nicht stark genug betont werden; mit ihr steht und fällt die Aussagekraft dieser Methode.
- ▶ Ebenso bleibt klassische Taxonomie unabdingbar: viele neue Arten harren noch der Beschreibung, mittels morphologischer Charakteristika und DNA-Sequenzen.

5.1.4 Collembolen

5.1.4.1 Positivkontrollen

Ein Satz von drei identischen Positivkontrollen wurde vorbereitet, um die Metabarcoding- und Bioinformatik-Pipeline zu durchlaufen. Sie bestanden aus Scheingemeinschaften („mock communities“) aus sieben Collembolenarten, die alle aus permanenten Laborkulturen des „Department of Ecoscience“ der Universität Aarhus stammten (Abbildung 50). Siehe Tabelle 20 für die Anzahl der Individuen, die jedem „MN Bead Tube Typ A“ des „NucleoSpin® Soil“ Kits hinzugefügt wurden. Der DNA-Gehalt wurde für alle drei Proben gemessen, während die Bibliothekserstellung und die Sequenzierung nur für ein Replikat durchgeführt wurden. Dieses Replikat wurde 10- und 100-fach verdünnt, da die DNA-Konzentration sehr weit über den für die PCR und einen MiSeq-Sequenzierungslauf empfohlenen 10 ng/l lag.

Abbildung 50: Positivkontrolle („mock community“) aus sieben Collembolenarten aus permanenten Laborkulturen des „Department of Ecoscience“ der Universität Aarhus



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Die unverdünnte Probe ergab keine Reads, wahrscheinlich weil die DNA-Konzentration zu hoch war und die PCR nicht erfolgreich war. Alle hinzugefügten Collembolenarten wurden in der Positivkontrolle gefunden. *Proisotoma minuta* wurde jedoch nur in der niedrigsten 10-fachen Verdünnung gefunden und hatte nur eine Anzahl von 20 Reads, obwohl diese erwartungsgemäß mindestens so hoch sein sollte wie die von *Mesaphorura macrochaeta*, einer der kleinsten Collembolenarten. In der 100-fachen Verdünnung wurde *P. minuta* nicht nachgewiesen, d. h. es handelte sich um ein falsch negatives Ergebnis (Tabelle 20). Es gab zwei falsch positive Artnachweise: *Sminthurinus aureus* wurde sowohl in anderen eDNA- als auch in comDNA-Proben gefunden, während *Hypogastrura purpureescens* ein Artefakt war, das nur in einer Probe (10-fache Verdünnung) der Positivkontrolle nachgewiesen wurde und durch eine verbesserte Bioinformatik entfernt werden könnte.

Es bestand kein allgemeiner Zusammenhang zwischen der Anzahl der Reads und der DNA-Konzentration, so dass selbst ein 10-facher Unterschied in der DNA-Konzentration zwischen den beiden Proben keinen Einfluss auf die Anzahl der Reads hatte. Diese einfachen Positivkontrollen zeigen die aktuellen Herausforderungen beim Metabarcoding, die nicht nur für Collembolen relevant sind. In dieser Hinsicht ist bei der Verwendung des allgemein verwendeten Schwellenwerts für die MSCT (Drake et al. 2022) Vorsicht geboten, da die Anzahl der Reads zwischen den Arten stark variiert und wahrscheinlich durch die Biomasse der Arten und die PCR-Verzerrung beeinflusst wird.

Tabelle 20: Eine comDNA-Positivprobe durchlief alle Schritte der Metabarcoding-Pipeline von der DNA-Extraktion bis zur Bibliotheksvorbereitung und Sequenzierung in zwei Verdünnungen, dem 10- und 100-fachen des DNA-Extrakts der ursprünglichen, unverdünnten Proben-DNA, hergestellt mit dem „NucleoSpin® Soil“ Kit

Hinzugefügte Art	Anzahl von Individuen aus dauerhaften Laborkulturen	Vorgeschlagen von der Bioinformatik-Pipeline	% Übereinstimmung mit Referenz	Anzahl DNA-Reads pro Probe	
				Verdünnung	
				10-fach	100-fach
<i>Folsomia candida</i>	10	X	100	34864	19528
<i>Protaphorura fimata</i>	10	X	99,7	9766	10885
<i>Folsomia fimetaria</i> (L1)	20	X	91,7	7731	8264
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	20	X	100	3354	104
<i>Onychiurus yodai</i>	10	X	100	2271	1341
<i>Sinella curviseta</i>	5	(X)*	100	1698	2291
<i>Proisotoma minuta</i>	10	X	99,4	20	0
<i>Hypogastrura purpureascens</i>		X	99,7	344	0
<i>Sminthurinus aureus</i>		X	100	0	536

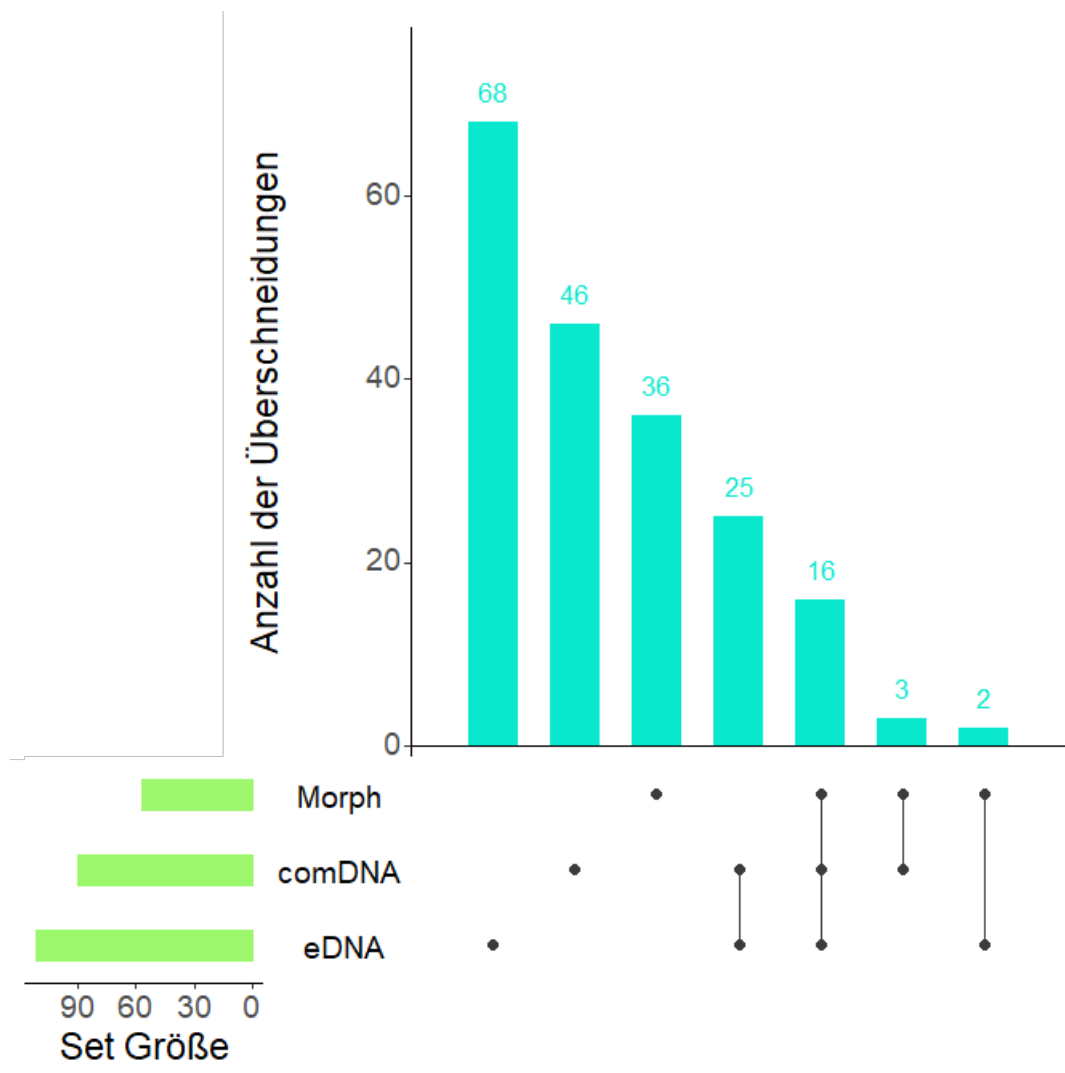
*Nicht in der Genbank-Referenzdatenbank, abgeglichen mit dem eigenen Barcode

5.1.4.2 Artenzahl

Die eDNA-Metabarcoding-Methode ergab die höchste Anzahl von 111 Arten mit sogar 68 Arten, die für diese Methode ‚exklusiv‘ waren (Abbildung 51 und Abbildung 52). Morphospezies-Bestimmung und comDNA-Metabarcoding lieferten 57 bzw. 52 Arten mit eindeutigen binomialen Artnamen. Die meisten Morphospezies, d. h. 63 %, die durch morphologische Bestimmung identifiziert wurden, wurden weder durch das eDNA- noch das comDNA-Metabarcoding erkannt. Die Anzahl der Taxa einschließlich der Taxa ohne endgültigen Artnamen, denen jedoch noch eine taxonomische Identität auf Artniveau (OTU) zugewiesen wurde, ist in Abbildung 53 dargestellt.

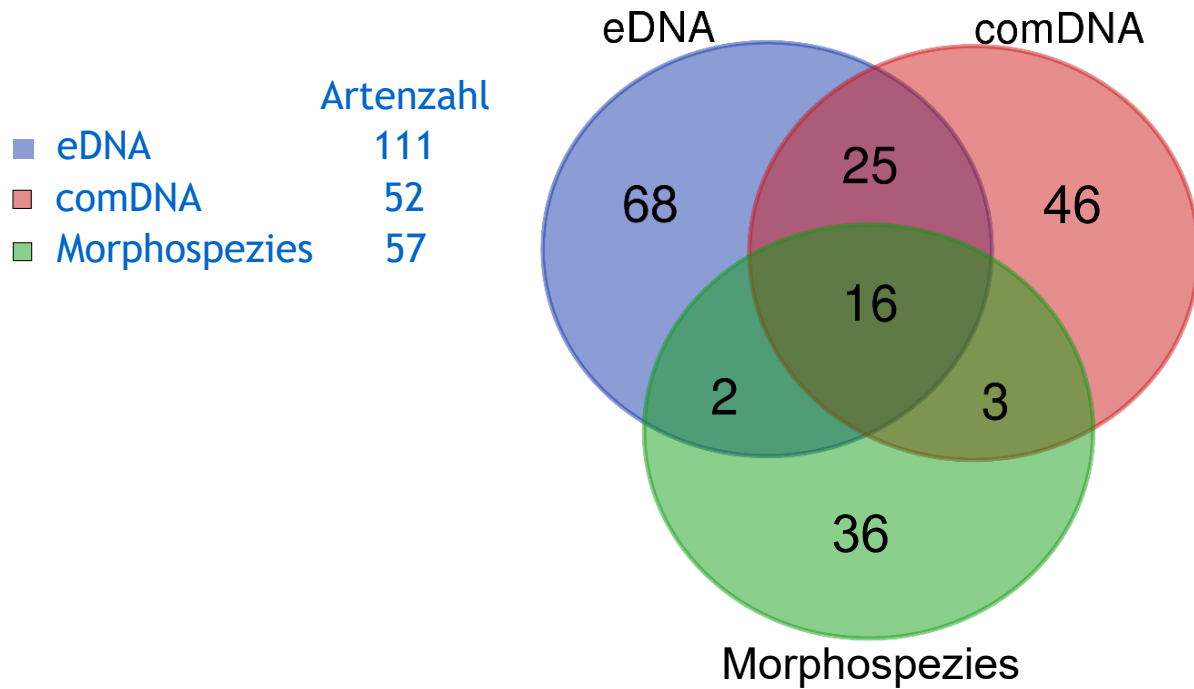
Die Anzahl der Taxa aus dem comDNA-Metabarcoding und die Anzahl der Morphospezies waren sehr ähnlich, im Gegensatz zu der höheren Anzahl von Taxa bei der eDNA-Methode. Der Vergleich der anhand der drei Bestimmungsmethoden identifizierten Collembolenarten pro Standort anhand von UpSet-Diagrammen und Artenlisten findet sich im Anhang B.3.

Abbildung 51: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der erfassten Collembola-Arten von allen 22 Standorten nach morphologischer Bestimmung (Morph), comDNA- und eDNA-Metabarcoding zeigt



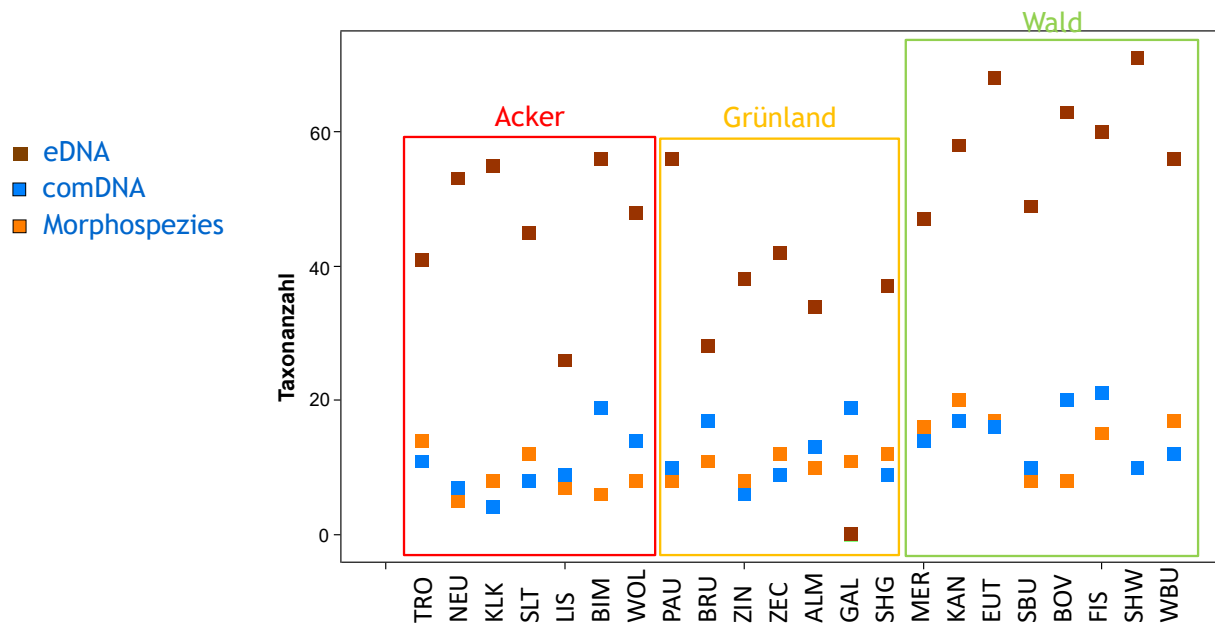
Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Abbildung 52: Venn-Diagramm der Collembolenarten von allen 22 Standorten, das die morphologische Bestimmung mit den beiden DNA-basierten Methoden comDNA- und eDNA-Metabarcoding vergleicht



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Abbildung 53: Vergleichende Leistung in Bezug auf die Anzahl an Collembolen-Taxa durch Morphospezies-Bestimmung, eDNA- und comDNA-Metabarcoding (Standortkürzel siehe Tabelle 4)

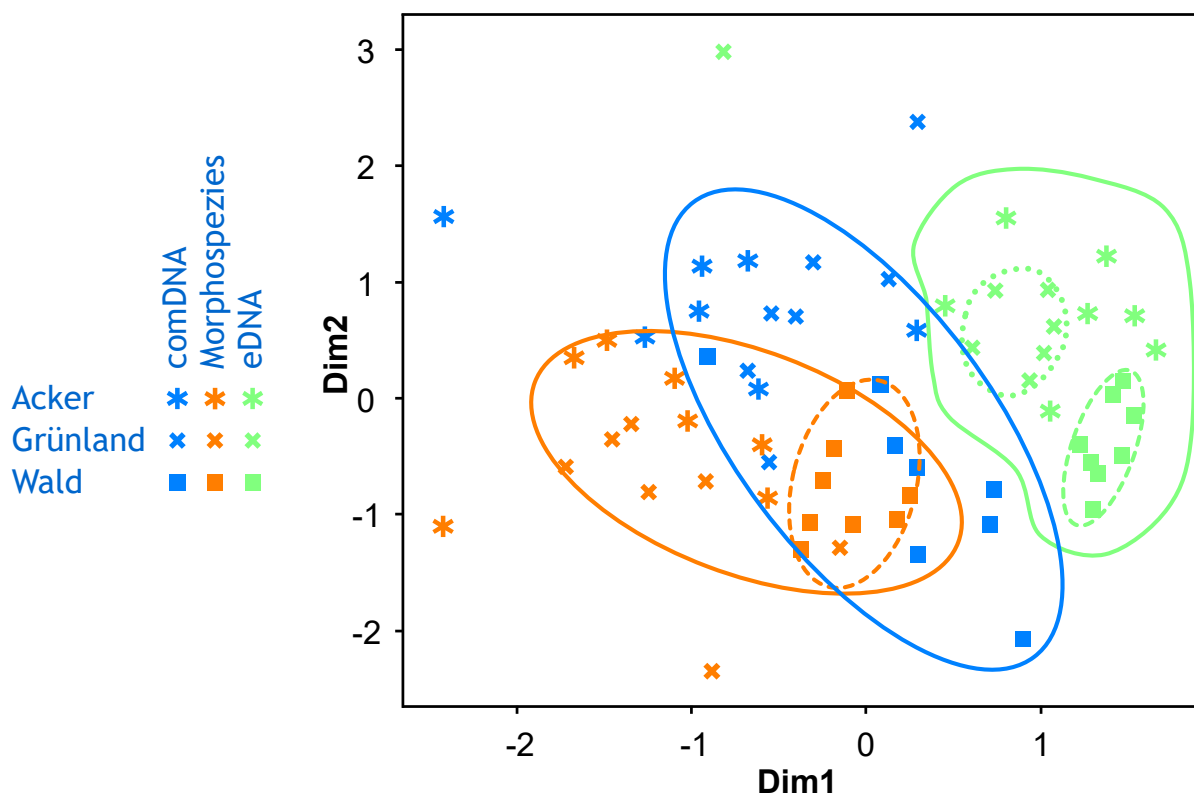


Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

5.1.4.3 Artenzusammensetzung

Der dramatische Unterschied in der Artenzusammensetzung zwischen den drei Methoden wird auch durch eine NMDS-Darstellung (nicht-metrische multidimensionale Skalierung) der binären Daten in den ersten beiden Dimensionen (Dim1 und Dim2) veranschaulicht (Abbildung 54), d. h. alle Zählungen und Reads wurden in Nullen und Einsen umgewandelt. Die Artenzusammensetzung aus dem eDNA-Metabarcoding überschneidet sich nicht mit den beiden anderen Methoden, während das comDNA-Metabarcoding und die morphologische Bestimmungsmethode einige Überschneidungen aufweisen. Die Waldstandorte bilden Habitat-Cluster (angezeigt durch gestrichelte Linien) innerhalb der Methoden-Cluster für die morphologische Bestimmung und das eDNA-Metabarcoding, für letzteres ebenfalls die Grünlandstandorte. Ausreißer befinden sich außerhalb der Methoden-Cluster wie z. B. der Standort Galgenberg (GAL), an dem keine Collembolen mittels eDNA-Metabarcoding identifiziert wurden, am oberen Rand der Grafik bei Dim2 = 3.

Abbildung 54: NMDS-Biplot der Abstandsmatrix des Jaccard-Ähnlichkeitskoeffizienten der mit den drei Methoden ermittelten Daten über die Anwesenheit/Abwesenheit von Arten. Gestrichelte Linien zeigen Habitat-Cluster innerhalb der Methoden-Cluster an



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

5.1.4.4 Zusammenfassung des Collembolen-Methodenvergleichs

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Collembolen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ▶ comDNA war in der Lage, Individuen aus Proben von Referenzarten von Laborkulturen nachzuweisen, aber die relative Anzahl der Metabarcoding-Reads stimmte erwartungsgemäß nicht mit der relativen Häufigkeit der Art überein.
- ▶ Im Durchschnitt entdeckte der eDNA-Ansatz eine höhere Anzahl von Arten als morphologische Identifizierungen und comDNA.

- ▶ Morphologische Identifizierungen und comDNA erkennen eine ähnliche Anzahl von Arten, aber unter Berücksichtigung der Referenzdatenbank wurden verschiedene Arten erkannt.
- ▶ Aufgrund der unvollständigen Collembolen-Referenzdatenbank können eDNA und comDNA zur Bestimmung des Artenreichtums verwendet werden, jedoch nicht zur Schätzung der Diversität, da die Anzahl der Reads möglicherweise nicht die Artverhältnisse widerspiegelt.
- ▶ Bevor die DNA-Ansätze als Alternative zu morphologischen Identifizierungen in Betracht gezogen werden, müssen die verfügbaren Referenzdatenbanken verbessert werden, um eine zuverlässige Artenliste zu erstellen.

5.1.5 Mögliche Gründe für Diskrepanzen zwischen den Bestimmungsmethoden

Anhand der oben dargestellten Ergebnisse wurde festgestellt, dass es häufig Unterschiede im Artenspektrum gibt, das mit den einzelnen Bestimmungsmethoden an den einzelnen Standorten festgestellt wurde. Möglichen Gründe für diese Diskrepanzen sind insbesondere:

- ▶ Einige der Diskrepanzen, die in den mit den drei Methoden erstellten Taxonverzeichnissen festgestellt wurden, scheinen mit dem erreichten taxonomischen Auflösungsgrad zusammenzuhängen. comDNA-Metabarcoding kann die Artidentität von morphologisch nicht identifizierbaren Individuen, insbesondere von Jungtieren und Fragmenten, aufdecken. Einer der Hauptvorteile der DNA-basierten Methoden ist, dass sie auf jedes einzelne Exemplar angewendet werden können, auch wenn es beschädigt ist oder sich in einem juvenilen Entwicklungsstadium befindet und daher keine diagnostischen morphologischen Merkmale aufweist. Zum Beispiel konnten für die Regenwürmer einige Exemplare, die aufgrund morphologischer Merkmale nur der Gattung *Lumbricus* zugeordnet werden konnten, anhand der COI- und 16S-Marker in zahlreichen Proben auf Artniveau identifiziert werden.
- ▶ Morphologische Fehlbestimmungen können bei taxonomisch schwierigen oder schwer zu beobachtenden Taxa auftreten, z. B. bei schlecht erhaltenen Exemplaren, insbesondere wenn nur wenige Individuen zur Verfügung stehen.
- ▶ Kleine Individuen wie Jungtiere oder einige epigäische Arten können bei der Handauslese von Regenwürmern übersehen werden.
- ▶ Bei den Collembolen wurden zwei unterschiedliche Probensätze für die morphologische Bestimmung und das comDNA-Metabarcoding verwendet.
- ▶ Die Menge und Verteilung der eDNA, die von den verschiedenen Arten im Boden hinterlassen wird, variiert je nach Häufigkeit, Verhalten und Größe der Tiere.
- ▶ eDNA kann noch im Boden vorhanden sein, obwohl es keine lebenden Exemplare mehr gibt, z. B. aufgrund von Trockenheit oder dem Verlassen von Röhren durch anektische Regenwurmart.
- ▶ Diskrepanzen können auch durch das Vorhandensein von fehlerhaften oder falsch gekennzeichneten COI- oder 16S-Sequenzen in den Referenzdatenbanken entstehen. Zum Beispiel wurde bei den Regenwürmern die Art *Proctodrilus antipae* sowohl morphologisch als auch durch 16S-eDNA-Metabarcoding am Standort Schwanheim II (SHG) identifiziert. Die durch COI-comDNA-Metabarcoding an derselben Stelle nachgewiesene Art war jedoch *Proctodrilus tuberculatus*, möglicherweise weil die entsprechende ASV mit COI-Referenzsequenzen mit falschen taxonomischen Bezeichnungen übereinstimmten.

- Arten mit einer geringen Anzahl von Sequenzierungs-Reads wurden fälschlicherweise in der Metabarcoding-Bioinformatik-Pipeline ausgeschlossen.

5.2 Vergleich mit Erwartungswerten nach Bodennutzung

Aufgabe des Vorhabens war auch der Vergleich der Ergebnisse mit denen des UBA-Vorhabens „Erfassung und Analyse des Bodenzustands im Hinblick auf die Umsetzung und Weiterentwicklung der Nationalen Biodiversitätsstrategie“ (Römbke et al. 2012). Im Rahmen dieses Vorhabens wurden insbesondere für Lumbriciden und Enchytraeiden sogenannte Erwartungswerte abgeleitet und wissenschaftlich publiziert (Jänsch et al. 2013, Römbke et al. 2013). Es war zu prüfen, ob sich an den im Rahmen des vorliegenden Vorhabens beprobten Standorten bezüglich dieser Erwartungswerte ähnliche Muster zeigten oder ob erweiterte Probenahmen notwendig wären. Das heißt, es wurde die Lebensraumfunktion gemäß BBodSchG (1998) der beprobten Standorte anhand der Erwartungswerte und der im vorliegenden Vorhaben erhobenen Daten im sogenannten Referenzansatz (Breure et al. 2005, Römbke et al. 2016b) beurteilt. Das Prinzip dieses Ansatzes ist ein Vergleich zwischen den standortspezifischen Regenwurm- bzw. Enchytraeiden-gemeinschaft mit einer Referenzgemeinschaft (= Erwartungswerte), wobei Abundanz, Artenzahl und Gemeinschaftszusammensetzung als Beurteilungsendpunkte verwendet werden (Römbke et al. 2012, Jänsch et al. 2013). Der Grundgedanke ist, dass jeder Standort spezifische Boden- und Standortparameter sowie eine dadurch bedingte spezifische Regenwurmgemeinschaft aufweist (Römbke & Breure 2005). Standorte können auf der Grundlage von Boden- und Standortparametern in Biotoptypen eingeteilt werden. Diese Biotoptypen sind in einem hierarchischen System organisiert, das in der „Roten Liste der gefährdeten Biotoptypen Deutschlands“ (Riecken et al. 2006) niedergelegt ist. Es umfasst 44 Grundtypen (erste Ebene) mit etwa 1000 hierarchisch abgeleiteten Untertypen. Dieses Konzept wird von deutschen Behörden (insbesondere dem Bundesamt für Naturschutz) vor allem im Zusammenhang mit der europäischen Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie (EU 1992), dem Naturschutzmanagement oder der Zulassung von gentechnisch veränderten Organismen verwendet (Toschki et al. 2015). Für ausgewählte Lebensraumtypen der ersten Ebene wurden von Jänsch et al. (2013) für Regenwürmer bzw. Römbke et al. (2013) für Enchytraeiden die Stetigkeit, mittlere Abundanz und mittlere Artenzahl der häufigsten Regenwurm- und Enchytraeidenarten in Deutschland ermittelt. Die Stetigkeitslisten der Arten dienen als Referenz- bzw. Erwartungswerte für die im Rahmen des vorliegenden Vorhabens untersuchten Standorte. Das heißt, die Zusammensetzung der Regenwurm- und Enchytraeidengemeinschaften sowie die Gesamtvorkommen an den einzelnen Untersuchungsstandorten können mit den jeweiligen Werten verglichen werden, die für solche Standorte in Deutschland ermittelt wurden. Die Robustheit und Verlässlichkeit der Erwartungswerte muss jedoch noch verbessert werden, da sie bis auf wenige Ausnahmen derzeit nur für die vier Haupt-Landnutzungsformen, repräsentiert durch Biotoptypen der ersten Ebene (d. h. Grünland, Ackerflächen, Laub- und Nadelwälder), vorliegen.

5.2.1 Methodik

Die Erwartungswerte gemäß Jänsch et al. (2013) bzw. Römbke et al. (2013) wurden ausschließlich auf der Basis von faunistischen Daten abgeleitet, die mit klassischen Beprobungsmethoden sowie morphologischer Artbestimmung erhoben wurden. Somit sind mit DNA-basierten Bestimmungsmethoden erhobene Daten aufgrund der abweichenden Probenahme bei eDNA sowie der insgesamt höheren taxonomischen Auflösung nicht direkt mit diesen Erwartungswerten vergleichbar. Zudem liefern die DNA-basierten Methoden keine mit den Erwartungswerten vergleichbaren quantitativen Daten. Daher wurden zunächst nur die Ergebnisse der im vorliegenden Vorhaben mit morphologischer Bestimmung erhobenen Daten mit diesen Erwartungswerten verglichen. Abhängig vom Ergebnis des Vergleichs wurden die Ergebnisse der anderen

beiden Bestimmungsmethoden hinzugezogen, um das Vergleichsergebnis einzuordnen und zu verfeinern. So wurde zum Beispiel in Fällen, in denen am jeweiligen Standort zu erwartende Arten im vorliegenden Vorhaben nicht gefunden wurden, überprüft, ob diese ggf. anhand der molekularen Bestimmungsmethoden nachgewiesen werden konnten. Auf diese Weise konnte eingeschätzt werden, ob es sich am jeweiligen Standort tatsächlich um eine Abweichung von den Erwartungswerten oder um eine Unzulänglichkeit der klassischen Beprobungs- und Bestimmungsmethodik handelte. Im letzteren Fall konnte somit ein offensichtlicher Mehrwert der molekularen Bestimmungsmethoden demonstriert werden.

Im Folgenden werden die Stetigkeit, die mittlere Gesamtabundanz und die durchschnittliche Artenzahl adulter Regenwürmer und der Enchytraeiden, getrennt nach den vier Haupt-Landnutzungsformen/Biotoptypen auf der ersten hierarchischen Ebene der Habitatklassifikation (Riecken et al. 2006) laut Jänsch et al. (2013) und Römbke et al. (2013) dargestellt. In Tabelle 21 ist die Stetigkeit der 10 häufigsten Regenwurmartarten in Deutschland (von 46; Lehmitz et al. 2014) aufgeführt, getrennt für die vier Biotoptypen Nr. 33 (Ackerflächen), 34 (Grünland), 43 (Nadelwälder) und 44 (Laubwälder) (Riecken et al. 2006) gemäß Jänsch et al. (2013) dargestellt. Diejenigen Arten, die in einer Landnutzung mit einer Stetigkeit von mindestens 50 % vorkommen, sind durch ihre fettgedruckten Nummern gekennzeichnet. Darüber hinaus werden die mittlere Abundanz und die Artenzahl pro Landnutzung (plus Standardabweichung) angegeben. In Tabelle 22 finden sich die äquivalenten Angaben für 25 Enchytraeidenarten gemäß Römbke et al. (2013).

Tabelle 21: Stetigkeit, mittlere Gesamtabundanz und mittlere Artenzahl der Lumbriciden, getrennt nach den vier Landnutzungen bzw. Hauptbiotoptypen gemäß Jänsch et al. 2013 (Basis: nur bis zur Art bestimmte Tiere). n = Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Standorte, SD = Standardabweichung. Fett gedruckt: Arten mit einer Stetigkeit $\geq 50\%$

Regenwurmart	Äcker: 33 (n = 86)	Grünland: 34 (n = 48)	Laubwald: 43 (n = 65)	Nadelwald: 44 (n = 27)
<i>Allolobophora chlorotica</i>	31,4 %	35,4 %	0,0 %	0,0 %
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	84,9 %	91,7 %	36,9 %	25,9 %
<i>Aporrectodea longa</i>	19,8 %	10,4 %	3,1 %	0,0 %
<i>Aporrectodea rosea</i>	55,8 %	56,3 %	33,8 %	25,9 %
<i>Dendrobaena octaedra</i>	2,3 %	12,5 %	72,3 %	77,8 %
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	0,0 %	8,3 %	55,4 %	29,6 %
<i>Lumbricus castaneus</i>	9,3 %	31,3 %	16,9 %	7,4 %
<i>Lumbricus rubellus</i>	24,4 %	62,5 %	73,8 %	59,3 %
<i>Lumbricus terrestris</i>	55,8 %	75,0 %	20,0 %	7,4 %
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	17,4 %	41,7 %	26,2 %	25,9 %
Σ (Ind./m ²) \pm SD	49,3 \pm 86,2	75,6 \pm 92,6	36,6 \pm 68,4	18,3 \pm 24,5
Mittlere Artenzahl \pm SD	3,3 \pm 1,9	5,0 \pm 2,3	3,9 \pm 2,3	2,9 \pm 2,3

Tabelle 22: Stetigkeit, mittlere Gesamtabundanz und mittlere Artenzahl der Enchytraeiden, getrennt nach den vier Landnutzungen bzw. Hauptbiotoptypen gemäß Römcke et al. 2013 (Basis: nur bis zur Art bestimmte Tiere). n = Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Standorte, SD = Standardabweichung. Fett gedruckt: Arten mit einer Stetigkeit $\geq 50\%$

Enchytraeidenart	Äcker: 33 (n = 24)	Grünland: 34 (n = 38)	Laubwald: 43 (n = 34)	Nadelwald: 44 (n = 18)
<i>Achaeta aberrans</i>	12,5 %	5,3 %	52,9 %	38,9 %
<i>Achaeta abulba</i>	8,3 %	5,3 %	23,5 %	66,7 %
<i>Achaeta affinis</i>	8,3 %	5,3 %	64,7 %	27,8 %
<i>Achaeta bohemica</i>	4,2 %	7,9 %	17,6 %	55,6 %
<i>Achaeta camerani</i>	0,0 %	0,0 %	55,9 %	55,6 %
<i>Buchholzia appendiculata</i>	16,7 %	63,2 %	29,4 %	33,3 %
<i>Cognettia sphagnetorum</i>	8,3 %	10,5 %	94,1 %	100,0 %
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	95,8 %	44,7 %	50,0 %	0,0 %
<i>Enchytraeus christenseni</i>	91,7 %	63,2 %	29,4 %	38,9 %
<i>Enchytraeus lactaeus</i>	50,0 %	13,2 %	5,9 %	0,0 %
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	29,2 %	34,2 %	55,9 %	50,0 %
<i>Enchytronia minor</i>	50,0 %	31,6 %	0,0 %	0,0 %
<i>Fridericia bisetosa</i>	25,0 %	50,0 %	11,8 %	16,7 %
<i>Fridericia bulboides</i>	83,3 %	86,8 %	2,9 %	22,2 %
<i>Fridericia christeri</i>	70,8 %	23,7 %	0,0 %	0,0 %
<i>Fridericia galba</i>	62,5 %	55,3 %	23,5 %	11,1 %
<i>Fridericia paroniana</i>	62,5 %	15,8 %	8,8 %	0,0 %
<i>Fridericia ratzeli</i>	8,3 %	65,8 %	14,7 %	5,6 %
<i>Fridericia striata</i>	0,0 %	0,0 %	55,9 %	16,7 %
<i>Henlea perpusilla</i>	83,3 %	55,3 %	2,9 %	5,6 %
<i>Henlea ventriculosa</i>	37,5 %	71,1 %	0,0 %	0,0 %
<i>Marionina clavata</i>	0,0 %	2,6 %	73,5 %	83,3 %
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>	0,0 %	0,0 %	76,5 %	16,7 %
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>	0,0 %	0,0 %	26,5 %	55,6 %
<i>Oconorella cambrensis</i>	0,0 %	0,0 %	76,5 %	72,2 %
Σ (Ind./m²) \pm SD	20165 \pm 14561	13834 \pm 11312	51241 \pm 30677	52087 \pm 43837
Mittlere Artenzahl \pm SD	13,7 \pm 4,3	12,2 \pm 5,2	12,4 \pm 5,5	9,2 \pm 3,9

Die Stetigkeit ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer Art an einem bestimmten Standort eines Biotoptyps. Daher lassen sich keine festen Grenzwerte für die Beurteilung eines konkreten Standorts festlegen. Vielmehr müssen die Häufigkeit und das Ausmaß der beobachteten Abweichungen von diesen Erwartungswerten in einem Weight-of-Evidence-Ansatz (Linkov et al. 2009), d. h. einem breiten Bewertungsansatz, beurteilt werden. In der Tierökologie wird die Stetigkeit einer Art häufig in vier Klassen unterteilt (Schaefer & Tischler 1983), denen für dieses Vorhaben die in Tabelle 23 genannten Wahrscheinlichkeiten des Vorkommens zugewiesen wurden.

Tabelle 23: Beurteilungskriterium für den Vergleich der nachgewiesenen Oligochätenfauna mit den Erwartungswerten (vgl. z. B. Schaefer & Tischler 1983)

Stetigkeit	Bezeichnung	Klassifizierung
0 % – 25 %	Selten	Vorkommen wenig wahrscheinlich
> 25 % – 50 %	Wenig verbreitet	Vorkommen möglich
> 50 % – 75 %	Häufig	Vorkommen wahrscheinlich
> 75 % – 100 %	Sehr häufig	Vorkommen sehr wahrscheinlich

Diese vier Gruppen wurden um drei weitere Gruppen erweitert, um auch zu erfassen, wenn charakteristische Arten auf den Untersuchungsflächen nicht gefunden wurden. Für die sich ergebenden verschiedenen Ausprägungen wurden zwei sich ergänzende Darstellungsweisen verwendet:

1. Ein Farbenschema, welches die folgenden Bedeutungen hat (Tabelle 24):
 - a. Grün: Übereinstimmung zwischen Erwartung und realer Erfassung;
 - b. Orange: Abweichung vorhanden, aber relativ gering bzw. akzeptabel;
 - c. Rot: Fehlende Übereinstimmung zwischen Erwartungswerten und realer Erfassung;
 - d. Weiß/Grau: Fehlend/vorhanden, aber ohne Konsequenz für die Beurteilung des Vergleichs zwischen Erwartungswerten und realer Erfassung.
2. Symbol für den Grad der jeweiligen Übereinstimmung bzw. Abweichung.

Tabelle 24: Klassifizierungsschema beobachteter Übereinstimmungen mit oder Abweichungen von den Erwartungswerten, getrennt nach den Endpunkten Präsenz/Absenz sowie Siedlungsdichte bzw. Artenzahl. SD = Standardabweichung

Präsenz/Absenz:	
(+)	Vorhanden und Vorkommen wenig wahrscheinlich
+	Vorhanden und Vorkommen möglich
++	Vorhanden und Vorkommen wahrscheinlich
+++	Vorhanden und Vorkommen sehr wahrscheinlich
-	Fehlend und Vorkommen wenig wahrscheinlich oder möglich
--	Fehlend obwohl Vorkommen wahrscheinlich
---	Fehlend obwohl Vorkommen sehr wahrscheinlich
Siedlungsdichte bzw. Artenzahl:	
	Innerhalb erwarteter Siedlungsdichte \pm SD / Artenzahl
	Außerhalb erwarteter Siedlungsdichte \pm SD / Artenzahl
	> Faktor 2 außerhalb erwarteter Siedlungsdichte \pm SD / Artenzahl

5.2.2 Regenwürmer

An den im Rahmen des Projektes beprobten Ackerstandorten wurden weitestgehend die gemäß Jänsch et al. (2013) zu erwartenden Regenwurmgemeinschaften vorgefunden (Tabelle 25). Abgesehen von einzelnen Auffälligkeiten ist vor allem das Fehlen der mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an Ackerstandorten zu erwartenden Art *Aporrectodea caliginosa* am Standort Wolferschwenda (WOL) erwähnenswert. Am Standort Neuhaus (NEU) wurden morphologisch juvenile Exemplare der Gattung *Lumbricus* nachgewiesen, die durch comDNA Metabarcoding als *L. terrestris* identifiziert wurden. Diese Art wurde auch in den eDNA-Proben nachgewiesen. Außerdem wurde in den eDNA-Proben zusätzlich *Aporrectodea rosea* gefunden, womit unter Hinzunahme der DNA-basierten Bestimmungsmethoden an diesem Standort alle mit hoher Wahrscheinlichkeit erwartete Arten nachgewiesen wurden.

Tabelle 25: Vergleich der Regenwurmgemeinschaft an den beprobten Ackerstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Jänsch et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4

Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Allolobophora chlorotica</i>	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
<i>Aporrectodea longa</i>	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-
<i>Aporrectodea rosea</i>	--	++	--	++	-- ²⁾	--	++	++
<i>Dendrobaena octaedra</i>	-	-	-	-	-	- ²⁾	-	-
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lumbricus castaneus</i>	-	-	-	-	-	-	- ¹⁾	-
<i>Lumbricus rubellus</i>	-	-	-	-	-	(+)	-	-
<i>Lumbricus terrestris</i>	++	++	--	--	-- ^{1) 2)}	--	++	++
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
Summe Adulte [Ind./m²]	2,4	44,0	5,6	55,2	41,6	3,2	42,4	13,6
Artenzahl	2	3	1	4	3	2	6	2

¹⁾ zusätzlich mit comDNA-Metabarcoding nachgewiesen; ²⁾ zusätzlich mit eDNA-Metabarcoding nachgewiesen

An den beprobten Grünlandstandorten wurde ebenfalls überwiegend die zu erwartende Regenwurmzönose nachgewiesen (Tabelle 26). Auch hier fehlte an zwei Standorten, Paulinenaue (PAU) und Schwanheim II (SHG), die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an Grünlandstandorten zu erwartende Art *Aporrectodea caliginosa*. In beiden Fällen wurde diese jedoch sowohl durch das comDNA- als auch das eDNA-Metabarcoding nachgewiesen. An den Standorten Almesbach Stallkoppel (ALM) und Zeckerin (ZEC) wurde sowohl in den comDNA- als auch eDNA-Proben zusätzlich *Lumbricus rubellus* gefunden, womit unter Hinzunahme der DNA-basierten Bestimmungsmethoden an diesen Standorten alle mit hoher Wahrscheinlichkeit erwartete Arten nachgewiesen wurden. Am Standort Bruchsal (BRU) wurde auch unter Berücksichtigung der DNA-basierten Bestimmungsmethoden insgesamt eine relativ hohe Anzahl von Abweichungen zu den Erwartungswerten beobachtet. Dies ist jedoch wenig überraschend, da diese BDF auf einem schmalen Grünstreifen zwischen einer Autobahn und einer Forstfläche lag. Die Probenahme erfolgte in unmittelbarer Nähe zur Autobahn, sodass eine starke anthropogene Beeinflussung dieser Fläche wahrscheinlich ist. Weitere Untersuchungen zur Lebensraumfunktion dieses Standorts wären demnach empfehlenswert.

Tabelle 26: Vergleich der Regenwurmgemeinschaft an den beprobten Grünlandstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Jänsch et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4

Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Allolobophora chlorotica</i>	- ^{1) 2)}	+	+	-	+	+	-	-
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	+++	+++	+++	+++	--- ^{1) 2)}	--- ^{1) 2)}	+++	+++
<i>Aporrectodea longa</i>	- ^{1) 2)}	- ¹⁾	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-
<i>Aporrectodea rosea</i>	++	--	++	++	--	++	++	--
<i>Dendrobaena octaedra</i>	-	-	-	-	-	-	-	- ²⁾
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lumbricus castaneus</i>	-	-	- ¹⁾	-	-	-	-	-
<i>Lumbricus rubellus</i>	-- ^{1) 2)}	--	++	--	++	--	-- ^{1) 2)}	++
<i>Lumbricus terrestris</i>	++	--	++	++	--	++	++	--
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	-	-	+	-	-	-	- ¹⁾	
Summe Adulte [Ind./m²]	44,0	8,8	57,6	8,0	30,4	79,2	82,4	25,6
Artenzahl	3	2	8	4	3	5	4	2

¹⁾ zusätzlich mit comDNA-Metabarcoding nachgewiesen; ²⁾ zusätzlich mit eDNA-Metabarcoding nachgewiesen

An den im Rahmen des Projektes beprobten Waldstandorten wurden vielfach Abweichungen von dem gemäß Jänsch et al. (2013) zu erwartenden Artenspektrum beobachtet (Tabelle 27). So wurde die insbesondere an Nadelwaldstandorten mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erwartende Art *Dendrobaena octaedra* anhand morphologischer Bestimmung nur am Standort Kandel (KAN) sowie im Zuge des eDNA-Metabarcodings am Standort Fichte Süd (FIS) nachgewiesen. Auch die mit einer Wahrscheinlichkeit von > 50 % an Waldstandorten zu erwartenden Arten *Dendrodrilus rubidus* und *Lumbricus rubellus* wurden anhand morphologischer Bestimmung nur an wenigen Standorten gefunden. Beide Arten wurden jedoch an weiteren Standorten mittels eDNA-Metabarcoding nachgewiesen. An den Standorten Schlegeler Buchberg (SBU) und Schwanheim 1 (SHW) konnten zudem juvenile Exemplare der Gattung *Lumbricus* im comDNA-Metabarcoding *L. rubellus* zugeordnet werden. Am Standort Merzalben (MER) wurden gar keine Regenwurmindividuen gefunden, und in der eDNA-Probe zu diesem Standort wurde lediglich *L. rubellus* nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist die starke Trockenheit an der überwiegenden Anzahl der Standorte im Untersuchungszeitraum, von der insbesondere epigäische Arten betroffen gewesen sein könnten. Insgesamt wiesen insbesondere die Standorte Bovenden (BOV), Merzalben (MER), Possen (POS), Schwanheim 1 (SHW) und Wächterbuche (WBU) auch unter Berücksichtigung der DNA-basierten Bestimmungsmethoden eine erhöhte Anzahl an Abweichungen zu den Erwartungswerten auf, sodass für eine abschließende Beurteilung der Lebensraumfunktion dieser Standorte weitere Untersuchungen durchgeführt werden sollten.

Tabelle 27: Vergleich der Regenwurmgemeinschaft an den beprobten Waldstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Jänsch et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4

Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Allolobophora chlorotica</i>	-	-	-	-	-	-	- ¹⁾	-	-
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Aporrectodea longa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	- ²⁾
<i>Aporrectodea rosea</i>	+	-	-	-	-	- ¹⁾	-	+	-
<i>Dendrobaena octaedra</i>	--	--	--- ²⁾	++	--	--	--	--	--
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	--	++	-	-- ²⁾	--	--	-- ²⁾	--	--
<i>Lumbricus castaneus</i>	-	-	-	-	-	-	+	- ²⁾	-
<i>Lumbricus rubellus</i>	--	--	++	++	-- ²⁾	--	-- ^{1) 2)}	-- ^{1) 2)}	--
<i>Lumbricus terrestris</i>	-	-	-	-	-	(+)	- ^{1) 2)}	(+)	-
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	-	-	-	-	-	-	-	- ^{1) 2)}	-
Summe Adulte [Ind./m²]	8,0	1,6	4,0	10,4	0,0	2,4	10,4	22,4	3,2
Artenzahl	3	1	1	2	0	2	2	4	1

¹⁾ zusätzlich mit comDNA-Metabarcoding nachgewiesen; ²⁾ zusätzlich mit eDNA-Metabarcoding nachgewiesen

5.2.3 Enchytraeiden

Die an den beprobten Ackerstandorten nachgewiesene Enchytraeidengemeinschaft entsprach überwiegend den bekannten Erwartungswerten (Tabelle 28). Auffällig erscheint zwar zunächst das gänzliche Fehlen der laut Römbke et al. (2013) an Ackerstandorten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit erwarteten Art *Enchytraeus christenseni* an allen im Rahmen des Vorhabens beprobten Standorten. Hierfür gibt es jedoch eine einfache Erklärung, die mit der komplizierten Taxonomie der Gattung *Enchytraeus* zusammenhängt. *E. christenseni* (= *E. minutus*) wurde (wie auch *E. buchholzi*) lange als eine Platzhalterart verwendet. An vielen Probenahmestellen finden sich kleine Exemplare der Gattung *Enchytraeus*, die sich morphologisch nicht weiter einzelnen Arten zuordnen lassen. Es lässt sich hier nur beobachten, dass bei einigen Exemplaren die Coelomocyten refraktile Granula haben und bei anderen nicht. Für diese beiden Typen (oder ‚Morphospezies‘) wurden früher die Namen *buchholzi* und *christenseni* (= *minutus*) vergeben, um zwei Namen für diese beiden Typen zu haben. Darin liegt die in Römbke et al. (2013) beschriebene teilweise sehr hohe Stetigkeit dieser beiden ‚Arten‘ begründet. Allerdings gibt es für *E. christenseni* eine recht gute Artbeschreibung (Schmelz & Collado 2010), und die dort aufgeführten Merkmale wurden an den im Rahmen des Vorhabens gesammelten Individuen nur selten gefunden. *E. buchholzi* wurde innerhalb des Vorhabens jedoch weiterhin als Artenkomplex behandelt. Dies führte zu der Situation, dass Individuen, die im vorliegenden Datensatz unter *E. buchholzi* zusammengefasst wurden, früher teilweise auch *E. christenseni* zugeschrieben worden wären (Schmelz & Collado 2010). Daher darf das anscheinende Fehlen dieser ‚Art‘ im vorliegenden Fall nicht als tatsächliche Abweichung von den Erwartungswerten gewertet werden, weswegen *E. christenseni* aus dem Vergleich mit den Erwartungswerten ausgeschlossen wurde. Darüber

hinaus wurden am Standort Saarlouis-Lisdorf (LIS) mit dem Fehlen der mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit erwarteten Arten *Fridericia bulboides* und *Henlea perpusilla* deutliche Abweichungen zu den Erwartungswerten beobachtet. Letztere Art fehlte zudem auch am Standort Wolferschwenda (WOL). Zwei Arten, die laut Römbke et al. (2013) mit einer Wahrscheinlichkeit von > 50 % an Ackerstandorten zu erwarten wären wurden an zwei Standorten zusätzlich mit den DNA-basierten Methoden identifiziert: *Fridericia christeri* mittels comDNA-Metabarcoding am Standort Bad Bramstedt (BIM) sowie *Fridericia paroniana* mittels eDNA-Metabarcoding am Standort LIS.

An den beprobten Grünlandstandorten wurde an einigen Standorten eine erhöhte Anzahl an Abweichungen von den Erwartungswerten der Enchytraeidengemeinschaft beobachtet (Tabelle 29), insbesondere an den Standorten Bruchsal (BRU), Galgenberg (GAL) und Schwanheim II (SHG). Allerdings wurden am Standort SHG zwei weitere mit einer Wahrscheinlichkeit > 50 % an Grünlandstandorten zu erwartende Arten anhand der DNA-basierten Bestimmungsmethoden nachgewiesen: *Fridericia galba* mittels comDNA- und eDNA-Metabarcoding sowie *Fridericia ratzeli* mittels eDNA-Metabarcoding. Am Standort Kümmelwiese (KUM) wie auch an den Standorten BRU und GAL fehlte die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit erwartete Art *Fridericia bulboides* während hier gleichzeitig eine stark erhöhte Artenzahl gefunden wurde. Einige Arten, die mit einer Wahrscheinlichkeit von > 50 % zu erwarten wären wurden zusätzlich mit den DNA-basierten Methoden identifiziert: *Buchholzia appendiculata* mittels eDNA-Metabarcoding an den Standorten Almesbach Stallkoppel (ALM) und Paulinenaue (PAU), *Enchytraeus christenseni* am Standort BRU mittels comDNA- und eDNA-Metabarcoding sowie *Fridericia ratzeli* mittels eDNA-Metabarcoding am Standort PAU. Somit wären auch unter Berücksichtigung der DNA-basierten Methoden an den Standorten BRU, GAL und KUM weitere Untersuchungen zur Lebensraumfunktion dieser Standorte empfehlenswert.

An den im Rahmen des Vorhabens beprobten Waldstandorten wurde überwiegend die dort zu erwartende Enchytraeidengemeinschaft vorgefunden (Tabelle 30). Auffällig war das häufige Fehlen der an diesen Standorten mit hoher Wahrscheinlichkeit erwarteten Art *Mesenchytraeus glandulosus*, die jedoch neben Eutin (EUT) und Wächterbuche (WBU) mittels eDNA-Metabarcoding zumindest an zwei weiteren Standorten, Kandel (KAN) und Merzalben (MER) nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus wurden an einigen Standorten mittels der DNA-basierten Bestimmungsmethoden weitere Arten, die mit einer Wahrscheinlichkeit von > 50 % an Waldstandorten zu erwarten wären, detektiert: *Achaeta aberrans* mittels eDNA-Metabarcoding an den Standorten EUT, MER und WBU, *Achaeta camerani* mittels eDNA-Metabarcoding am Standort Possen (POS), *Mesenchytraeus pelicensis* mittels eDNA-Metabarcoding am Standort Fichte Süd (FIS) sowie *Achaeta affinis* und *Marionina clavata* mittels comDNA- und eDNA-Metabarcoding am Standort WBU. Eine vergleichsweise hohe Anzahl an Abweichungen zu den Erwartungswerten wurde an den Standorten Schlegeler Buchberg (SBU) und Schwanheim 1 (SHW) beobachtet. Hier fehlten neben *M. glandulosus* auch die ebenfalls mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit erwarteten Arten *Cognettia sphagnetorum* und *Oconnorella cambrensis*. Dafür traten hier vermehrt für diese Standorte eher untypische Arten der Gattungen *Enchytronia*, *Fridericia* und *Henlea* auf, was sich im Falle des Standorts SBU möglicherweise mit dem relativ hohen Boden-pH von 4,9 erklären lässt. Hier wurde jedoch zusätzlich eine sehr niedrige Gesamtabundanz festgestellt. Daher ist für diese Standorte eine Störung der Lebensraumfunktion nicht auszuschließen, weswegen weitere Untersuchungen empfehlenswert wären.

Tabelle 28: Vergleich der Enchytraeidengemeinschaft an den beprobten Ackerstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Römcke et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4

Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Achaeta aberrans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Achaeta abulba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Achaeta affinis</i>	- 2)	-	(+)	-	- 2)	-	-	- 1)
<i>Achaeta bohémica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Achaeta camerani</i>	-	-	(+)	-	-	-	-	-
<i>Buchholzia appendiculata</i>	(+)	-	-	-	- 2)	(+)	-	-
<i>Cognettia sphagnetorum</i> s.l.	-	-	- 1)	-	- 2)	- 2)	-	-
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Enchytraeus christenseni</i> *	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Enchytraeus lactaeus</i>	-	-	- 1) 2)	- 2)	-	-	+	-
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enchytronia minor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fridericia bisetosa</i>	(+)	-	- 1)	-	(+)	-	- 2)	-
<i>Fridericia bulboides</i>	+++	+++	+++	---	+++	+++	+++	+++
<i>Fridericia christeri</i>	-- 1)	++	++	++	++	++	++	++
<i>Fridericia galba</i>	--	++	--	++	++	--	++	--
<i>Fridericia paroniana</i>	++	--	--	-- 2)	--	--	++	--
<i>Fridericia ratzeli</i>	-	-	-	-	- 2)	-	(+)	-
<i>Fridericia striata</i>	-	-	- 1)	-	-	-	-	-
<i>Henlea perpusilla</i>	+++	+++	+++	---	+++	+++	+++	---
<i>Henlea ventriculosa</i>	+	-	+	-	+	-	-	+
<i>Marionina clavata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oconorella cambrensis</i>	- 1) 2)	-	-	-	-	-	-	-
Gesamtabundanz [Ind./m²]	7181	4176	34072	5093	9167	38197	22918	3463
Artenzahl	15	10	15	11	14	12	17	6

¹⁾ zusätzlich mit comDNA-Metabarcoding nachgewiesen; ²⁾ zusätzlich mit eDNA-Metabarcoding nachgewiesen

* aus dem Vergleich ausgeschlossen, siehe Text für weitere Erläuterungen

Tabelle 29: Vergleich der Enchytraeidengemeinschaft an den beprobten Grünlandstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Römcke et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4

Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Achaeta aberrans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Achaeta abulba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Achaeta affinis</i>	-	-	-	(+)	- ²⁾	- ²⁾	-	- ²⁾
<i>Achaeta bohemica</i>	-	-	-	(+)	-	-	-	-
<i>Achaeta camerani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Buchholzia appendiculata</i>	-- ²⁾	++	++	++	-- ²⁾	--	++	++
<i>Cognettia sphagnetorum</i> s.l.	-	-	-	(-)	- ²⁾	-	-	(+)
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enchytraeus christenseni</i> *	--	-- ^{1) 2)}	--	++	--	--	--	--
<i>Enchytraeus lactaeus</i>	(+)	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Enchytronia minor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fridericia bisetosa</i>	- ²⁾	+	+	+	-	-	+	-
<i>Fridericia bulboides</i>	+++	---	---	---	+++	+++	+++	+++
<i>Fridericia christeri</i>	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-
<i>Fridericia galba</i>	++	--	++	++	--	-- ^{1) 2)}	++	--
<i>Fridericia paroniana</i>	(+)	(+)	(+)	-	-	-	(+)	- ²⁾
<i>Fridericia ratzeli</i>	++	++	--	++	-- ²⁾	-- ²⁾	++	++
<i>Fridericia striata</i>	-	-	-	-	-	- ²⁾	-	-
<i>Henlea perpusilla</i>	--	--	++	++	++	--	++	++
<i>Henlea ventriculosa</i>	++	++	--	--	++	--	++	++
<i>Marionina clavata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oconorella cambrensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamtabundanz [Ind./m²]	48027	94474	16756	22205	41966	6774	34530	17825
Artenzahl	11	19	20	28	8	12	23	11

¹⁾ zusätzlich mit comDNA-Metabarcoding nachgewiesen; ²⁾ zusätzlich mit eDNA-Metabarcoding nachgewiesen

* aus dem Vergleich ausgeschlossen, siehe Text für weitere Erläuterungen

Tabelle 30: Vergleich der Enchytraeidengemeinschaft an den beprobten Waldstandorten mit den Erwartungswerten gemäß Römcke et al. (2013). Erläuterung des Klassifizierungsschemas in Tabelle 24, Standortkürzel siehe Tabelle 4

Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Achaeta aberrans</i>	--	-- ²⁾	-	++	-- ²⁾	--	--	--	-- ²⁾
<i>Achaeta abulba</i>	-	(+)	--	-	-	-	-	-	(+)
<i>Achaeta affinis</i>	++	++	+	++	++	++	++	++	-- ^{1) 2)}
<i>Achaeta bohémica</i>	-	-	--	-	-	- ²⁾	-	-	-
<i>Achaeta camerani</i>	--	--	++	++	++	-- ²⁾	--	--	++
<i>Buchholzia appendiculata</i>	+	+	-	- ²⁾	-	+	+	+	+
<i>Cognettia sphagnetorum</i> s.l.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	+++
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	- ^{1) 2)}
<i>Enchytraeus christenseni</i>	- ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enchytraeus lactaeus</i>	-	-	-	-	-	-	- ^{1) 2)}	- ²⁾	-
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	++	++	-	--	++	++	--	--	++
<i>Enchytronia minor</i>	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
<i>Fridericia bisetosa</i>	(+)	-	-	-	- ¹⁾	(+)	(+)	(+)	-
<i>Fridericia bulboides</i>	-	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fridericia christeri</i>	-	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fridericia galba</i>	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	(+)	-
<i>Fridericia paroniana</i>	- ^{1) 2)}	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-
<i>Fridericia ratzeli</i>	-	-	-	- ¹⁾	-	-	- ^{1) 2)}	(+)	-
<i>Fridericia striata</i>	++	++	-	++	--	++	--	--	++
<i>Henlea perpusilla</i>	-	- ¹⁾	-	-	-	-	-	(+)	-
<i>Henlea ventriculosa</i>	-	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-
<i>Marionina clavata</i>	--	++	+++	++	++	++	--	++	-- ^{1) 2)}
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>	---	+++	-	---	---	---	---	---	+++
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>	- ^{1) 2)}	- ²⁾	-- ²⁾	-	-	-	-	-	-
<i>Oconorella cambrensis</i>	+++	+++	++	+++	+++	+++	---	---	+++
Gesamtabundanz [Ind./m²]	34225	99618	24497	38350	21339	63764	9626	54342	16399
Artenzahl	24	18	8	11	10	15	11	16	12

¹⁾ zusätzlich mit comDNA-Metabarcoding nachgewiesen; ²⁾ zusätzlich mit eDNA-Metabarcoding nachgewiesen

5.3 Kostenabschätzung pro Bestimmungsmethode

Für die Akzeptanz und Anwendbarkeit der in diesem Vorhaben verwendeten Bestimmungsmethoden im Routinebetrieb sind auch wirtschaftliche Überlegungen wesentlich. Daher wird an dieser Stelle der Versuch unternommen, die je nach Bestimmungsmethode pro BDF anfallenden Kosten abzuschätzen. Es muss deutlich betont werden, dass es sich hierbei nur um eine recht grobe Annäherung handeln kann, da die tatsächlichen Kosten nur projektspezifisch verbindlich kalkuliert werden können. So sind unter anderem Reisekosten, Projektmanagement und Berichtserstellung in der Abschätzung grundsätzlich nicht berücksichtigt. Für die Interpretation der angegebenen Kosten sind zudem folgende Annahmen bzw. Rahmenbedingungen zu beachten. Für die Arbeiten zur Probenahme im Freiland und die morphologische Bestimmung sind die Kosten für Verbrauchsmaterialien und Gerätebenutzung in Relation zu den anfallenden Lohnkosten annähernd vernachlässigbar. Daher wurde der Aufwand hierfür in Arbeitsstunden pro Personalgruppe beziffert und mit den Verrechnungssätzen der ECT, die als marktgängige Leistungen gegenüber Auftraggebern angewandt werden, für das Jahr 2022 multipliziert, um einen annähernden Marktpreis zu errechnen. Auf diese Weise wurden auch die Unterschiede im Lohnniveau, die naturgemäß zwischen den Ländern der im Projektkonsortium beteiligten Institutionen bestehen, bereinigt. Anders wurde hinsichtlich der Kosten vorgegangen, die durch die Tätigkeiten im Zusammenhang mit der Bestimmung anhand DNA-basierter Methoden anfallen. Hier stellen die verwendeten Reagenzien und Geräte einen wesentlichen Kostenfaktor dar. Während für die klassischen Beprobungs- und Bestimmungsmethoden der Arbeitsaufwand weitestgehend linear zur zu bearbeitenden Probenzahl ansteigt, sinken die Kosten pro Probe für die genetischen Arbeiten mit höheren Probenzahlen deutlich. Dies liegt unter anderem an den hohen Fixkosten, die für einen einzelnen Sequenzierunslauf eines Illumina MiSeq PE300 anfallen und in dem bis zu 600 Proben parallel bearbeitet werden können. Daher wurden hier die von den beteiligten Projektpartnern angesetzten Marktpreise pro Probe, ohne weitere Differenzierung zwischen Material- und Personalkosten, angesetzt. Da sich unter anderem aufgrund des unterschiedlichen Lohnniveaus die Marktpreise zwischen Ländern unterscheiden wurde im vorliegenden Fall ein mittlerer Wert aus den Abschätzungen der Marktpreise aus Spanien und Dänemark abgeleitet. Das Ziel dieser Kostenabschätzung war somit schlussendlich, einen Eindruck zu vermitteln, wie sich die verschiedenen Bestimmungsmethoden hinsichtlich der Kosten relativ zueinander einordnen.

Das Ergebnis der Kostenabschätzung ist in Tabelle 31 enthalten. Daraus werden die zum Teil erheblich niedrigeren Kosten deutlich, die die DNA-basierten Bestimmungsmethoden im Vergleich zu den klassisch-morphologischen Methoden verursachen. Aufgrund des im Vergleich zu den Enchytraeiden und Collembolen deutlich höheren Aufwands für die Erstellung einer comDNA-Probe durch die Notwendigkeit der Extraktion der Tiere im Freiland, sind die Gesamtkosten der Regenwurmbestimmung pro Standort mittels comDNA-Metabarcoding ähnlich hoch wie die der morphologischen Bestimmung. Dies ist auch weitgehend unabhängig von der Anzahl der parallel zu bearbeitenden Standorte. Demgegenüber ist die Bestimmung mittels comDNA-Metabarcoding im Vergleich zur morphologischen Bestimmung für die Enchytraeiden und Collembolen pro Standort auch schon für einen einzelnen Standort etwa um den Faktor 3,6 (Collembolen) bis 5 (Enchytraeiden) günstiger. Mit einer steigenden Anzahl gleichzeitig bearbeiteter Standorte verschiebt sich dieses Verhältnis noch weiter zugunsten der Bestimmung mittels comDNA-Metabarcoding. Die Gesamtkosten für die Bestimmung mittels eDNA-Metabarcoding pro Standort liegen ähnlich hoch wie die mittels comDNA-Metabarcoding für die Enchytraeiden oder Collembolen. Für das eDNA-Metabarcoding kommt jedoch begünstigend hinzu, dass anhand derselben eDNA-Probe, ggf. unter Verwendung unterschiedlicher Primer, gleichzeitig eine hohe Anzahl verschiedener Gruppen der Bodenfauna erfasst werden kann.

Tabelle 31: Abschätzung der Kosten pro Bestimmungsmethode in Abhängigkeit von der Standortzahl sowie der Gesamtkosten pro Standort

Variable	Posten	Berechnung	Anzahl Standorte / Kosten [€]					
			1	5	10	25	50	100
A	Anzahl Regenwurmproben (5 pro Standort)		5	25	50	125	250	500
B	Anzahl Bodenkerne für Morphologie oder comDNA (10 pro Standort)		10	50	100	250	500	1000
C	Anzahl Bodenkerne für eDNA-Mischprobe (20 pro Standort)		20	100	200	500	1000	2000
D	Anzahl comDNA-Mischproben (1 pro Standort)		1	5	10	25	50	100
E	Anzahl eDNA-Mischproben (1 pro Standort)		1	5	10	25	50	100
F	Regenwurm Probenahme (Feldarbeit) (€); Gruppe III	=1.6 h*83 €/h*A	664	3320	6640	16600	33200	66400
G	Probenahme Bodenkerne für Morphologie oder comDNA (Feldarbeit) (€); Gruppe III	=0.05 h*83 €/h*B	42	208	415	1038	2075	4150
H	Probenahme Bodenkerne für eDNA (Feldarbeit) (€); Gruppe III	=0.05 h*83 €/h*C	83	415	830	2075	4150	8300
I	Regenwurm Probenherstellung (comDNA) (€); Gruppe III	=0.20 h*83 €/h*A	83	415	830	2075	4150	8300
J	Morphologische Bestimmung und Biomasse der Regenwürmer (€); Gruppe II	=0.60 h*83 €/h*A	345	1725	3450	8625	17250	34500
K	Extraktion der Enchytraeiden ggf. inkl. comDNA-Probenherstellung (€); Gruppe IV	=0.15 h*51 €/h*B	77	383	765	1913	3825	7650
L	Morphologische Bestimmung der Enchytraeiden (€); Gruppe II	=1.80 h*115 €/h*B	2070	10350	20700	51750	103500	207000
M	Extraktion der Collembolen im MacFadyen-Extraktor (€); Gruppe IV	=0.25 h*51 €/h*B	128	638	1275	3188	6375	12750
N	Sortierung der Organismen ggf. inkl. comDNA-Probenherstellung (€); Gruppe III	=0.20 h*83 €/h*B	166	830	1660	4150	8300	16600
O	Herstellung der Objektträger für das Mikroskop (€); Gruppe III	=1.80 h*83 €/h*B	1494	7470	14940	37350	74700	149400

Variable	Posten	Berechnung	Anzahl Standorte / Kosten [€]					
			1	5	10	25	50	100
P	Morphologische Bestimmung der Collembolen (€); Gruppe II	=0.50 h*115 €/h*B	575	2875	5750	14375	28750	57500
Q	DNA-Stabilisierung in Phosphatpuffer (eDNA) (€); Gruppe III		249	581	996	2075	4150	8300
R	DNA-Isolierung (€); mittlerer Marktpreis		125	95	80	65	60	55
S	DNA-Metabarcoding Bibliotheksherstellung und Sequenzierung (€); mittlerer Marktpreis		120	85	60	45	40	35
T	Bioinformatische Analyse (€); mittlerer Marktpreis		80	40	35	25	20	15
U	Gesamtkosten pro Probe (€); mittlerer Marktpreis	=R+S+T	325	220	175	135	120	105
V	Gesamtkosten (€)		325	1100	1750	3375	6000	10500
	Gesamtkosten für morphologische Regenwurm- und Biomassebestimmung pro Standort (€)	=(F+J)/Anzahl Standorte	1009	1009	1009	1009	1009	1009
	Gesamtkosten für morphologische Bestimmung der Enchytraeiden pro Standort (€)	=(G+K+L)/Anzahl Standorte	2188	2188	2188	2188	2188	2188
	Gesamtkosten für morphologische Bestimmung der Collembolen pro Standort (€)	=(G+M+N+O+P)/Anzahl Standorte	2404	2404	2404	2404	2404	2404
	Gesamtkosten für Bestimmung der Regenwürmer mittels comDNA-Metabarcoding pro Standort (€)	=(F+I+V)/Anzahl Standorte	1072	967	922	882	867	852
	Gesamtkosten für Bestimmung der Enchytraeiden mittels comDNA-Metabarcoding pro Standort (€)	=(G+K+V)/Anzahl Standorte	443	338	293	253	238	223
	Gesamtkosten für Bestimmung der Collembolen mittels comDNA-Metabarcoding pro Standort (€)	=(G+M+N+V)/Anzahl Standorte	660	555	510	470	455	440
	Gesamtkosten für die Bestimmung mittels eDNA-Metabarcoding pro Standort (€)	=(H+Q+V)/Anzahl Standorte	657	419	358	301	286	271

6 AP 4: Bewertung der Methoden für den Routinebetrieb

Bei der Beurteilung der Eignung der im vorliegenden Vorhaben verwendeten genetischen Methoden für einen routinemäßigen Einsatz ist ein zentrales Kriterium, inwieweit die Ziele der Boden-Dauerbeobachtung mit den anhand der jeweiligen Bestimmungsmethoden gewonnenen Daten erreicht werden können.

6.1 Zwecke, Nutzung/Anwendungsbereiche und Einschränkungen der Boden-Dauerbeobachtung

Eine Übersicht über die Zwecke sowie die Nutzung bzw. Anwendungsbereiche der Boden-Dauerbeobachtung in Deutschland geben Kaufmann-Boll et al. (2020):

Zwecke der deutschen Boden-Dauerbeobachtung:

- ▶ Beschreibung des aktuellen Bodenzustands;
- ▶ Langfristige Überwachung der Veränderung der Böden;
- ▶ Ableitung von Prognosen zukünftiger Entwicklungen;
- ▶ Referenzflächen für die ubiquitären Veränderungen des Bodenzustands, auch als Kontrollinstrument für die Wirksamkeit politischer Maßnahmen;
- ▶ Basis-BDF: Erfassung von Veränderungen der Bodenmerkmale (Merkmalsdokumentation);
- ▶ Intensiv-BDF: Merkmals- und Prozessdokumentation von Bodenveränderungen (Prozessdokumentation);
- ▶ Bereitstellung einer gesicherten Datengrundlage für umweltfachliche und umweltpolitische Entscheidungsprozesse;
- ▶ Umsetzung der Bodenschutzgesetze von Bund und Ländern.

Nutzung/Anwendungsbereiche der deutschen Boden-Dauerbeobachtung:

- ▶ Planung adäquater Schutz- und Anpassungsmaßnahmen (politisch und fachlich);
- ▶ Regelmäßige Veröffentlichungen mit dem Ziel der Umweltbildung;
- ▶ Nationale und internationale Berichterstattung und Politikberatung;
- ▶ Definition von Maßstäben für tolerierbare/zulässige Stoffeinträge;
- ▶ Überprüfung der Wirkung stofflicher Bodenveränderungen auf andere Medien;
- ▶ Untersuchung von Veränderungen der Böden durch den Klimawandel und Bedeutung von Böden als Kohlenstoffquellen oder -senken;
- ▶ Standort- und nutzungstypische Humusgehalte, Schwankungen, Humuszehrung bzw. -anreicherung, Humusvorräte, Produktionsfunktion;
- ▶ Datengrundlage für die geplante Konzeption des „Global Monitoring Plans“ zu persistenten organischen Schadstoffen;
- ▶ Klimamodellevaluierung.

Anwender der Ergebnisse sind zum einen die Umwelt- und Forstbehörden des Bundes und der Länder sowie universitäre und sonstige Forschungseinrichtungen. Kaufmann-Boll et al. (2020) benennen zudem die folgenden Anwendungs-, Zugriffs- und Nutzungseinschränkungen:

- ▶ Unterschiedliche Konzeptionen, Probenahme- und Untersuchungsmethoden schränken die Vergleichbarkeit von Daten aus verschiedenen Ländern und/oder von verschiedenen Zeitpunkten ein.
- ▶ Die Datenverfügbarkeit liegt in der Verantwortung der betreibenden Länder. Die fachlich beteiligten Behörden erhalten entweder direkten Zugang zu den Bodeninformationssystemen, oder die Daten können auf Anforderung bereitgestellt werden.
- ▶ Inhaltliche Rahmenbedingungen für den Datenaustausch mit dem Bund sind über eine Verwaltungsvereinbarung für den Datenaustausch geregelt. Die technischen Rahmenbedingungen sind nicht geregelt. Für die Öffentlichkeit eignen sich aufbereitete Daten.

Somit lässt sich feststellen, dass das bestehende Programm der Boden-Dauerbeobachtung hinsichtlich der Untersuchung der Bodenfauna noch einige Defizite aufweist. So wird ein Monitoring der Bodenfauna bislang nicht in allen Bundesländern durchgeführt, und wenn ja, werden meist nur Regenwürmer erfasst (siehe Abschnitt 3.1.1). Es existiert keine Harmonisierung der Probenahme- und Auswertungsmethoden und der zu bearbeitenden taxonomischen Gruppen. Außerdem werden die Daten bisher nicht systematisch aufbereitet der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt. Diese Defizite sollten im Rahmen der etwaigen Einführung genetischer Bestimmungsmethoden unbedingt berücksichtigt und so weit wie möglich behoben werden.

6.2 Bewertung der Methoden für den Routinebetrieb in der Boden-Dauerbeobachtung

Wie die im Rahmen dieses Vorhabens erhobenen Daten belegen, ist es möglich, mit genetischen Bestimmungsmethoden die Ziele der Boden-Dauerbeobachtung zu erreichen. Der aktuelle Bodenzustand, so wie ihn die jeweilige Gemeinschaft der Bodenfauna anzeigt, lässt sich mit diesen Methoden beschreiben. Dies gilt insbesondere für qualitative Parameter wie das Vorkommen bzw. Fehlen von Arten, ist mit Einschränkung aber auch auf quantitative Parameter (Artenzahl, Abundanz) anwendbar. Quantitativ können die Artenzahl pro Standort sowie die Anzahl der Metabarcoding-Reads pro Art bzw. ASV/Taxon angegeben werden. Aus den Ergebnissen dieses Vorhabens deutet sich an, dass zumindest für die Regenwürmer hieraus ebenfalls Rückschlüsse hinsichtlich der relativen Abundanz oder Biomasse gezogen werden könnten. Dies sollte daher in zukünftigen und speziell darauf zugeschnittenen Forschungsvorhaben näher untersucht werden. Qualitativ kann für zu untersuchende Standorte die Artenzusammensetzung angegeben werden, ggf. unter Zuordnung von Arten zu verschiedenen ökologischen Gruppen. Die Standortdiversität kann anhand geeigneter Diversitätsindizes charakterisiert werden.

Die an einem Standort erhobenen quantitativen und qualitativen Parameter können für die Überwachung von langfristigen Veränderungen in der Bodenbiologie herangezogen werden, sofern dieselben standardisierten Methoden verwendet werden (z. B. der ISO), um die zu unterschiedlichen Zeitpunkten und an verschiedenen Standorten erhobenen Daten vergleichbar zu machen.

Hierbei sollte die rapide fortschreitende technologische Entwicklung in der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung kein Hindernis für eine Standardisierung darstellen. Modernere Methoden als die derzeit standardmäßig eingesetzte Illumina-Plattform würden eher dazu dienen, robustere Daten zu liefern, besonders im quantitativen Bereich, und Kosten weiter zu senken.

Die Ableitung von Prognosen über zukünftige Entwicklungen ist somit auch mit den genetischen Bestimmungsmethoden grundsätzlich möglich, sofern ausreichende Kenntnisse über die Treiber solcher Entwicklungen vorliegen, was jedoch gleichermaßen auch für die klassisch morphologischen Methoden gilt.

Genetische Bestimmungsmethoden können somit zu einer gesicherten Datengrundlage für umweltfachliche und umweltpolitische Entscheidungsprozesse beitragen. Für einige solcher Entscheidungen sind belastbare Bodengesundheitsindizes/Referenzwerte notwendig (z. B. Europäische Kommission 2021, Pieper et al. 2023). Alle drei im Rahmen dieses Vorhabens verwendeten Bestimmungsmethoden liefern die Instrumente zur Entwicklung solcher Bodengesundheitsindizes, z. B. in Form von Referenzwerten, die auf der Vielfalt der Bodenfauna basieren. Für einige Fragestellungen sind auch quantitative Messungen der Bodenfauna erforderlich, z. B., um die Auswirkungen anthropogener Stressoren bewerten zu können. Hier liefern die molekularen Methoden bislang nur relative Ergebnisse. Außerdem sind genetische Methoden nicht in der Lage, neue Arten oder Genotypen zu registrieren, da die entsprechenden Sequenzen in der Referenzdatenbank noch nicht vorliegen. Daher sollten in bestimmten Fällen, besonders aber bei einem Ersteinsatz genetischer Methoden an einem Standort, klassische Methoden inkl. Probenahme und morphologischer Bestimmung und DNA-basierte Methoden in Kombination angewendet werden, wobei das comDNA-Metabarcoding als Brücke zwischen morphologischen und eDNA-basierten Daten dient:

- ▶ um historische mit zukünftigen Daten zu verknüpfen;
- ▶ für Entscheidungsprozesse, die quantitative Daten erfordern;
- ▶ für eine umfassende Bewertung der Vielfalt an Standorten mit unbekannter Artenzusammensetzung.

Hinsichtlich der für die Anwendung der genetischen Bestimmungsmethoden anfallenden Kosten lässt sich feststellen, dass insbesondere bei Nutzung der eDNA sowie bei höheren Standortzahlen die DNA-basierten Methoden zum Teil erheblich geringere Kosten erzeugen als die klassisch morphologischen Probenahme- und Bestimmungsmethoden. Zudem bietet das eDNA-Metabarcoding den großen Vorteil, dass mit ihm gleichzeitig eine hohe Anzahl verschiedener Gruppen der Bodenfauna erfasst werden kann. Einen limitierenden Faktor stellt aktuell noch die Qualität und Unvollständigkeit der genetischen Referenzdatenbanken dar. Während diese für die Regenwürmer sowohl für COI als auch 16S bereits als ausreichend genau angesehen werden können, besteht für andere Gruppen noch Nachholbedarf, wie insbesondere das Beispiel der Collembolen im vorliegenden Bericht zeigt. Angesichts der Vielzahl der aktuellen internationalen Aktivitäten in diesem Bereich ist jedoch davon auszugehen, dass solche Lücken mittelfristig sukzessive für eine zunehmende Anzahl dieser Gruppen geschlossen werden können.

7 AP 5: Fachgespräch (Workshop) – Vorschläge für das weitere Vorgehen

7.1 Fachgespräch (Workshop)

Die Ergebnisse des Vorhabens wurden am 12. Oktober 2022 in einem 1-tägigen Fachgespräch den Betreibern der BDF und weiteren Interessierten vorgestellt und diskutiert. Ziel des Workshops war zum einen die Information der BDF-Betreiber zu den neuen Methoden, ihren Chancen, Kosten und Auswertungsmöglichkeiten, zum anderen, um den weiteren Bedarf an neuen / adaptierbaren Methoden aus dem Bodenmonitoring zu erfassen. Das Fachgespräch fand zum Erreichen eines größeren Personenkreises sowie zur Vermeidung etwaiger Beschränkungen hinsichtlich der Corona-Pandemie als Videokonferenz statt. Aufgrund der internationalen Ausrichtung des Projektkonsortiums wurde die Veranstaltung in englischer Sprache abgehalten. Es gab ca. 30 externe Teilnehmer*innen, die sich ca. zur Hälfte aus Behördenvertreter*innen, zu ca. einem Drittel aus Mitglieder*innen von Forschungsinstituten und Universitäten sowie einigen Vertreter*innen von Auftragsforschungsinstituten zusammensetzten. Es fand eine rege Diskussion statt, und die Diskussionsbeiträge und Anregungen der Teilnehmer*innen wurden in den entsprechenden Kapiteln dieses Berichts berücksichtigt. Die Tagesordnung des Fachgesprächs findet sich in Tabelle 32.

Tabelle 32: Tagesordnung des Fachgesprächs am 12. Oktober 2022 als Videokonferenz; Moderation: Dr. Frank Glante (Umweltbundesamt), Dr. Jörg Römbke (ECT Oekotoxikologie GmbH)

Time	Title	Presenter(s)
10:00	Welcome	Frank Glante (UBA)
10:10	Short round of introductions	All participants
10:40	Project goals	Jörg Römbke (ECT)
11:00	Introduction to metabarcoding	Antón Vizcaíno (AllGenetics)
11:30	Coffee break	
11:40	Pilot study results	Stephan Jänsch (ECT)
12:00	Results of method comparison: Earthworms	Stephan Jänsch (ECT)
12:30	Results of method comparison: Enchytraeids	Rüdiger M. Schmelz
13:00	Lunch break	
14:00	Results of method comparison: Collembolans	Tiago Natal da Luz (CloverStrategy) / Paul Henning Krogh (Aarhus University)
14:30	Conclusions / Recommendations	Jörg Römbke (ECT)
15:00	Final discussion	All participants
16:00	End of the workshop	

7.2 Empfehlungen für das weitere Vorgehen und Forschungsbedarf

Basierend auf Ergebnissen dieses Projektes lässt sich feststellen, dass die genetischen Bestimmungsmethoden mittels comDNA- und/oder eDNA-Metabarcoding grundsätzlich in der Lage sind, die Ziele der deutschen Boden-Dauerbeobachtung zu erreichen und damit für ein routinemäßiges Monitoring der Bodenfauna geeignet sind. Es bestehen kaum Zweifel daran, dass diese Methoden, insbesondere das eDNA-Metabarcoding, bei der künftigen Überwachung der biologischen Vielfalt des Bodens eine wichtige Rolle spielen wird, wie auch die Anwendung im Rahmen der LUCAS-Bodenuntersuchung bereits zeigt (die allerdings noch final ausgewertet und veröffentlicht werden muss). Dies wird zu einem neuen Maß für die biologische Vielfalt des Bodens führen, und die Frage wird eher sein, ob wir, im Vergleich mit den klassischen Methoden, zu den gleichen oder sogar zuverlässigeren Schlussfolgerungen für die Bewertung der Bodengesundheit kommen. Molekulare Methoden werden zudem bereits erfolgreich in anderen Umweltbereichen eingesetzt, z. B. bei der Bewertung der Qualität von Oberflächengewässern anhand von biologischen Qualitätsindizes (Hering et al. 2018, Kuntke et al. 2020, Vivien et al. 2020), sodass einer routinemäßigen Anwendung auch im Bodenbereich nichts grundsätzlich im Wege stehen sollte. Vor einer Einführung in die behördliche Praxis müssen jedoch noch einige wesentliche Voraussetzungen erfüllt werden (siehe auch Ruppert et al. 2019):

- ▶ Die DNA/Barcoding-Referenzdatenbanken müssen umfassend, gut kuratiert und qualitätskontrolliert sein, um Fehler bei der DNA-basierten Artenregistrierung zu vermeiden.
- ▶ DNA-basierte Methoden müssen standardisiert werden, z. B. im Rahmen der ISO, von der Probenahme im Feld, der Probenvorbereitung, der Metabarcoding-Leistung bis hin zur informatischen Auswertung für die Artenidentifizierung.
- ▶ Es müssen belastbare Schwellenwerte/Indizes für die Bodengesundheit, basierend auf Daten zur Gemeinschaft von Bodenorganismen entwickelt werden (Pieper et al. 2023). Dies kann beispielsweise im Rahmen der durch die EU-Bodenstrategie für 2030 ausgelösten Forschungstätigkeiten erfolgen.

Die folgenden Empfehlungen können für eine künftige Ausgestaltung der Boden-Dauerbeobachtung in Deutschland abgegeben werden:

- ▶ Die Erhebungen bezüglich der Bodenfauna sollten in allen Bundesländern im gleichen Umfang und anhand einheitlicher, standardisierter Methoden erfolgen.
- ▶ Bodenorganismen sollten zunächst mit klassisch morphologischen Methoden regelmäßig (z. B. alle fünf Jahre) erfasst werden, mindestens Regenwürmer, Enchytraeiden und Collembolen. Die Aufnahme weiterer Gruppen (z. B. Nematoden, Milben, Myriapoden, Isopoden) sollte geprüft werden.
- ▶ Die Einführung genetischer Methoden sollte schrittweise erfolgen. So sollte, beginnend mit den Regenwürmern, zunächst eine parallele Anwendung klassisch morphologischer Methoden und eDNA-Barcoding erfolgen. comDNA-Metabarcoding kann als Unterstützung der morphologischen Bestimmung oder bei speziellen Fragestellungen hinzugezogen werden.
- ▶ Die im Rahmen des BDF-Programms erhobenen Daten sollten zentral zusammengeführt werden (z. B. am Umweltbundesamt) und in einheitlich aufbereiteter Form der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden. Eine regelmäßige Übernahme in die bodenzoologische Datenbank „Edaphobase“ wird ebenfalls empfohlen.

- ▶ Langfristig sollte eDNA-Metabarcoding standardmäßig zur Untersuchung und Bewertung der biologischen Vielfalt des Bodens eingesetzt werden, da es die gesamte Bodenfauna erfassen kann.

Aus diesen notwendigen Voraussetzungen und Empfehlungen ergibt sich insbesondere der folgende Forschungsbedarf, der anhand von speziell auf diese Fragestellungen zugeschnittenen Untersuchungen bearbeitet werden sollte:

- ▶ Die Methodik z. B. hinsichtlich der Details des Probenahmedesigns, der Anzahl notwendiger eDNA-Einzelproben für eine Mischprobe sowie der Vorgehensweise bei der DNA-Extraktion und dem Metabarcoding muss verfeinert werden. Dies sollte im Rahmen der Standardisierung der jeweiligen Schritte erfolgen.
- ▶ Die Ableitbarkeit von Korrekturfaktoren zwischen Abundanz/Biomasse und Anzahl der Sequenzierungs-Reads zur Festlegung (vergleichbarer) Quantifizierungsmetriken sollte untersucht werden.
- ▶ Die Abhängigkeit der eDNA-Verfügbarkeit von Bodeneigenschaften sowie der Biologie und dem Verhalten von Bodenorganismen sollte bestimmt werden.
- ▶ Die Verweildauer von DNA im Boden in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen sollte bestimmt werden.
- ▶ Die DNA-Referenzdatenbanken sollten verbessert, erweitert, kuratiert und qualitätsgesichert werden.
- ▶ Arten, die bereits morphologisch und genetisch charakterisiert sind, sollten baldmöglichst auch taxonomisch formal beschrieben und mit gültigen Namen versehen werden, um Diskrepanzen in der Namensgebung zwischen morphologisch bestimmten und sequenzierten Taxa zu beheben.
- ▶ Dasselbe gilt für neue zu entdeckende Arten und Genotypen. Zur genetischen Charakterisierung ist auf das klassische (individuenbasierte) Sanger-Sequenzierungsverfahren zurückzugreifen.
- ▶ Schwellenwerte/Indizes für die Bodengesundheit, z. B. anhand von Referenzwerten, sollten abgeleitet werden.
- ▶ Die Relevanz und Eignung weiterer Organismengruppen, insbesondere Nematoden, Milben, Myriapoden und Isopoden, für künftige Monitoringprogramme sollte überprüft werden.

8 Öffentlichkeitsarbeit

8.1 Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 14th Special Science Symposium (SESSS) on Soil Biodiversity

Das Projekt wurde anhand eines Posters im Rahmen der Tagung: „SETAC Europe 14th Special Science Symposium (SESSS) on Soil Biodiversity“ am 19.-20. November 2019 in Brüssel (Belgien) vorgestellt. Vorgestellt wurden die Ziele, die Struktur sowie erste Ergebnisse des MetaSOL-Projekts, wobei parallel dazu versucht wurde, weitergehende Kooperationen bzw. einen Erfahrungsaustausch mit den Teilnehmern dieser Tagung zu initiieren. Nennenswert sind in diesem Zusammenhang insbesondere die Aktivitäten zur Entwicklung eines Langzeit Biomonitorings von Pflanzenschutzmittelrückständen in Böden der Schweiz, die im Rahmen der Tagung ebenfalls in einem Poster vorgestellt wurden. Eine Synthese der Ergebnisse der Tagung insgesamt wurden in der Zeitschrift „Integrated Environmental Assessment and Management“ vorgestellt (Van Gestel et al. 2020).

8.2 Marktredwitzer Bodenschutztagung

Für das Jahr 2020 wurde ein Beitrag über unser Vorhaben für die Marktredwitzer Bodenschutztagung angemeldet. Diese Veranstaltung wurde jedoch aufgrund der COVID-19 Pandemie ohne einen Ausweichtermin abgesagt.

8.3 SETAC Europe, Kopenhagen

Die ersten Ergebnisse der Hauptstudie wurden in einem Vortrag auf der 32. Jahrestagung der SETAC Europe am 15.-19. Mai 2022 in Kopenhagen (Dänemark) vorgestellt. Die Methodik und Ergebnisse der Pilotstudie wurden in einer Vorab für die Veranstaltung bereits zum 20. April 2022 geforderten Aufzeichnung eines Vortrags vorgestellt, da die Ergebnisse der Hauptstudie zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig vorlagen.

8.4 14th International Symposium on Enchytraeidae (ISE 14)

Die ersten Projektergebnisse zu den Enchytraeiden wurden anhand eines Vortrags auf dem 14th International Symposium on Enchytraeidae am 20.-22. Juni 2022 in Krakau (Polen) vorgestellt.

8.5 12th International Symposium on Earthworm Ecology (ISEE 12)

Die Projektergebnisse wurden in einem Poster auf dem 12th International Symposium on Earthworm Ecology am 10.-15. Juli 2022 in Rennes (Frankreich) vorgestellt.

8.6 15th International Symposium on Aquatic Oligochaeta (ISAO 15)

Das Projekt und ausgewählte Ergebnisse wurden beim 15. Internationalen Symposium zu aquatischen Oligochaeta, veranstaltet am 19.-24. September 2022 im Naturhistorischen Museum in Brüssel, vorgestellt. Titel des Vortrags: "Performance of morphological and DNA-based methods to assess diversity of earthworms and enchytraeids at 25 permanent soil monitoring sites in Germany".

8.7 The 3rd Global Soil Biodiversity Conference

Die Projektergebnisse wurden anhand eines Posters auf der 3rd Global Soil Biodiversity Conference am 13.-15. März 2023 in Dublin (Irland) vorgestellt.

9 Quellenverzeichnis

- Alberdi, A.; Aizpurua, O.; Gilbert, M.T.P.; Bohmann, K. (2018): Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 9, S. 134 – 147
- Alef, K.; Kleiner, D. (1987): Applicability of arginine ammonification as indicator of microbial activity in different soils. *Biol. Fertil. Soils*, 5, S. 148 – 151
- Andersen, K.; Bird, K.L.; Rasmussen, M.; Haile, J.; Breuning-Madsen, H.; Kjaer, K.H.; Orlando, L.; Gilbert, M.T.P.; Willerslev, E. (2012): Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21, S. 1966 – 1979
- Anderson, J.P.E.; Domsch, K.H. (1978): A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 11, S. 215 – 221
- Andrews, S. (2010): FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.
- Arribas, P.; Andújar, C.; Hopkins, K.; Shepherd, M.; Vogler, A.P. (2016): Metabarcoding and mitochondrial metagenomics of endogean arthropods to unveil the mesofauna of the soil. *Methods Ecol. Evol.*, 7, S. 1071 – 1081
- Aylagas, E.; Borja, Á.; Irigoien, X.; Rodríguez-Ezpeleta, N. (2016): Benchmarking DNA metabarcoding for biodiversity-based monitoring and assessment. *Frontiers in Marine Science*, 3, Artikel 96
- Aylagas, E.; Borja, Á.; Muxika, I.; Rodríguez-Ezpeleta, N. (2018): Adapting metabarcoding-based benthic bio-monitoring into routine marine ecological status assessment networks. *Ecological Indicators*, 95, S. 194 – 202
- Baird, D.J.; Hajibabaei, M. (2012): Biomonitoring 2.0: A new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing
- Balech, B.; Sandioniggi, A.; Marzano, M.; Pesole, G.; Santamaria, M. (2022): MetaCOXI: An integrated collection of metazoan mitochondrial cytochrome oxidase subunit-i DNA sequences. *Database* 2022. <https://doi.org/10.1093/database/baab084>
- Bardgett, R.D.; van der Putten, W.H. (2014): Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515 (7528), S. 505 – 511
- Barth, N.; Brandtner, W.; Cordsen, E.; Dann, T.; Emmerich, K.-H.; Feldhaus, D.; Kleefisch, B.; Schilling, S.; Utermann, J. (2000): *Boden-Dauerbeobachtung. Einrichtung und Betrieb von Boden-Dauerbeobachtungsflächen*. In: Rosenkranz, D.; Bachmann, G.; König, W.; Einsele, G. (Hrsg.): *Bodenschutz*. Erich Schmidt Verlag, Berlin, XI/00, 127 S.
- Bartram, J.; Mountjoy, E.; Brooks, T.; Hancock, J.; Williamson, H.; Wright, G.; Moppett, J.; Goulden, N.; Hubank, M. (2016): Accurate sample assignment in a multiplexed, ultrasensitive, high-throughput sequencing assay for minimal residual disease. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18, S. 494 – 506
- BBodSchG (1998): Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz). *Bundesgesetzblatt I*, 502 vom 17. März 1998
- BBodSchV (1999): Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung. Verordnung zur Durchführung des Bundes-Bodenschutzgesetzes. *BGBl I*, 36 vom 16.06.1999, S. 1554 – 1582
- Beck, L. (1983): Zur Bodenbiologie des Laubwaldes. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, 76, S. 37 – 54
- Beck, T. (1971): Die Messung der Katalaseaktivität von Böden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 130(1), S. 68 – 81
- Beylich, A.; Broll, G.; Graefe, U.; Höper, H.; Römbke, J.; Ruf, A.; Wilke, B.-M. (2005): Biologische Charakterisierung von Böden – Ansatz zur Bewertung des Bodens als Lebensraum für Bodenorganismen im Rahmen von Planungsprozessen. *BVB-Materialien*, 13, S. 1 – 78

- Bienert, F.; De Danieli, S.; Miquel, C.; Coissac, E.; Poillot, C.; Brun, J.J.; Taberlet, P. (2012): Tracking earthworm communities from soil DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), S. 2017 – 2030
- Biggs, J.; Ewald, N.; Valentini, A.; Gaboriaud, C.; Dejean, T.; Griffiths, R.A.; Foster, J.; Wilkinson, J.W.; Arnell, A.; Brotherton, P.; Williams, P.; Dunn, F. (2015): Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183, S. 19 – 28
- Bik, H.M.; Porazinska, D.L.; Creer, S.; Caporaso, J.G.; Knight, R.; Thomas, W.K. (2012): Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 27, S. 233 – 243
- Bissett, A.; Fitzgerald, A.; Meintjes, T.; Mele, P.M.; Reith, F.; Dennis, P.G.; Breed, M.F.; Brown, B.; Brown, M.V.; Brugger, J.; Byrne, M.; Caddy-Retalic, S.; Carmody, B.; Coates, D.J.; Correa, C.; Ferrari, B.C.; Gupta, V.V.S.R.; Hamonts, K.; Haslem, A.; Hugenholtz, P.; Karan, M.; Koval, J.; Lowe, A.J.; Macdonald, S.; McGrath, L.; Martin, D.; Morgan, M.; North, K.I.; Paungfoo-Lonhienne, C.; Pendall, E.; Phillips, L.; Pirzl, R.; Powell, J.R.; Ragan, M.A.; Schmidt, S.; Seymour, N.; Snape, I.; Stephen, J.R.; Stevens, M.; Tinning, M.; Williams, K.; Kit Yeoh, Y.; Zammit, C.M.; Young, A. (2016): Introducing BASE: The biomes of australian soil environments soil microbial diversity database. *Gigascience*, 5, Artikel s13742–016
- Bjørnsgaard Aas, A.; Davey, M.L.; Kauserud, H. (2017): ITS all right mama: Investigating the formation of chimeric sequences in the ITS 2 region by DNA metabarcoding analyses of fungal mock communities of different complexities. *Molecular Ecology Resources*, 17, S. 730 – 741
- Blattner, L.; Ebner, J.N.; Zopfi, J.; von Fumetti, S. (2021): Targeted non-invasive bioindicator species detection in eDNA water samples to assess and monitor the integrity of vulnerable alpine freshwater environments. *Ecological Indicators*, 129, Artikel 107916
- BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) (2011): Nationale Strategie zur biologischen Vielfalt, 3. Auflage, 180 S.
- Bohmann, K.; Evans, A.; Gilbert, M.T.P.; Carvalho, G.R.; Creer, S.; Knapp, M.; Douglas, W.Y.; De Bruyn, M. (2014): Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29, S. 358 – 367
- Bokulich, N.A.; Kaehler, B.D.; Rideout, J.R.; Dillon, M.; Bolyen, E.; Knight, R.; Huttley, G.A.; Caporaso, J.G. (2018): Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME q2-featureclassifier plugin. *Microbiome*, 6, Artikel 90
- Bokulich, N.A.; Subramanian, S.; Faith, J.J.; Gevers, D.; Gordon, J.I.; Knight, R.; Mills, D.A.; Caporaso, J.G. (2013): Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina Amplicon Sequencing. *Nature Methods*, 10, S. 57 – 59
- Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; Bai, Y.; Bisanz, J.E.; Bittinger, K.; Brejnrod, A.; Brislawn, C.J.; Brown, C.T.; Callahan, B.J.; Caraballo-Rodríguez, A.M.; Chase, J.; Cope, E.K.; Da Silva, R.; Diener, C.; Dorrestein, P.C.; Douglas, G.M.; Durall, D.M.; Duvallet, C.; Edwardson, C.F.; Ernst, M.; Estaki, M.; Fouquier, J.; Gauglitz, J.M.; Gibbons, S.M.; Gibson, D.L.; Gonzalez, A.; Gorlick, K.; Guo, J.; Hillmann, B.; Holmes, S.; Holste, H.; Huttenhower, C.; Huttley, G.A.; Janssen, S.; Jarmusch, A.K.; Jiang, L.; Kaehler, B.D.; Kang, K.B.; Keefe, C.R.; Keim, P.; Kelley, S.T.; Knights, D.; Koester, I.; Kosciulek, T.; Kreps, J.; Langille, M.G.I.; Lee, J.; Ley, R.; Liu, Y.X.; Loftfield, E.; Lozupone, C.; Maher, M.; Marotz, C.; Martin, B.D.; McDonald, D.; McIver, L.J.; Melnik, A.V.; Metcalf, J.L.; Morgan, S.C.; Morton, J.T.; Naimey, A.T.; Navas-Molina, J.A.; Nothias, L.F.; Orchanian, S.B.; Pearson, T.; Peoples, S.L.; Petras, D.; Preuss, M.L.; Pruesse, E.; Rasmussen, L.B.; Rivers, A.; Robeson, M.S. 2nd; Rosenthal, P.; Segata, N.; Shaffer, M.; Shiffer, A.; Sinha, R.; Song, S.J.; Spear, J.R.; Swafford, A.D.; Thompson, L.R.; Torres, P.J.; Trinh, P.; Tripathi, A.; Turnbaugh, P.J.; Ul-Hasan, S.; van der Hooft, J.J.J.; Vargas, F.; Vázquez-Baeza, Y.; Vogtmann, E.; von Hippel, M.; Walters, W.; Wan, Y.; Wang, M.; Warren, J.; Weber, K.C.; Williamson, C.H.D.; Willis, A.D.; Xu, Z.Z.; Zaneveld, J.R.;

- Zhang, Y.; Zhu, Q.; Knight, R.; Caporaso, J.G. (2019): Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.*, 37(8), S. 852 – 857
- Bouché, M.B. (1972): Lombriciens de France. Paris, France: INRA Publ. 72-2, Institut National de Recherches Agricultrices Annales de Zoologie. *Ecologie animale, hors série 72(2)*, 671 S.
- Bouché, M.B. (1977): Stratégies lombriciennes. In: Lohm, U.; Persson T. (Hrsg.): *Soil organisms as components of ecosystems*. *Ecol. Bull. NFR*, 25, S. 122 – 132
- Bretfeld, G. (1999): Synopses on Palaearctic Collembola: Symphypleona. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz*, 2, S. 1 – 318
- Breure, A.M.; Mulder, C.; Römbke, J.; Ruf, A. (2005): Ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotox. Environ. Safety*, 62, S. 211 – 229
- Briones, M.J.I. (1996): A taxonomic revision of the *Allolobophora caliginosa* complex (Oligochaeta, Lumbricidae): A preliminary study. *Canadian Journal of Zoology*, 74(2), S. 240 – 244
- Bruce, K.; Blackman, R.; Bourlat, S.J.; Hellström, A.M.; Bakker, J.; Bista, I.; Bohmann, K.; Bouchez, A.; Brys, R.; Clark, K.; Elbrecht, V.; Fazi, S.; Fonseca, V.; Hänfling, B.; Leese, F.; Mächler, E.; Mahon, A.R.; Meissner, K.; Panksep, K.; Pawlowski, J.; Schmidt Yáñez, P.; Seymour, M.; Thalinger, B.; Valentini, A.; Woodcock, P.; Traugott, M.; Vasselon, V.; Deiner, K. (2021): A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. *Advanced Books*
- Burkhardt, U.; Russell, D.J.; Bury, R.; Decker, P.; Döhler, M.; Höfer, H.; Römbke, J.; Trog, C.; Vorwald, J.; Wurst, E.; Xyländer, W.E. (2014): The Edaphobase Project of GBIF-Germany – A new online soil-organism zoological data warehouse. *Applied Soil Ecology*, 83, S. 5 – 12
- Bush, A.; Compson, Z.G.; Monk, W.A.; Porter, T.M.; Steeves, R.; Emilson, E.; Gagne, N.; Hajibabaei, M.; Roy, M.; Baird, D.J. (2019): Studying ecosystems with DNA metabarcoding: Lessons from biomonitoring of aquatic macroinvertebrates. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, Artikel 434
- Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. (2016): DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, Artikel 581
- Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; Huttley, G.A.; Kelley, S.T.; Knights, D.; Koenig, J.E.; Ley, R.E.; Lozupone, C.A.; McDonald, D.; Muegge, B.D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J.R.; Turnbaugh, P.J.; Walters, W.A.; Widmann, J.; Yatsunencko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R. (2010): QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 7(5), S. 335 – 336
- Carew, M.E.; Pettigrove, V.J.; Metzeling, L.; Hoffmann, A.A. (2013): Environmental monitoring using next generation sequencing: Rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. *Frontiers in Zoology*, 10, S. 1 – 15
- Chalupský, J. (1994): Czech Enchytraeidae (Oligochaeta). IV. Description of *Enchytronia pratensis* sp.n. and a note on *Marionina communis*. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 57(3-4): 167 – 172
- Chariton, A. (2012): Short and informative DNA products to indirectly measure vascular plant biodiversity. *Molecular Ecology*, 21, S. 3637 – 3639
- Chariton, A.A.; Stephenson, S.; Morgan, M.J.; Steven, A.D.; Colloff, M.J.; Court, L.N.; Hardy, C.M. (2015): Metabarcoding of benthic eukaryote communities predicts the ecological condition of estuaries. *Environmental Pollution*, 203, S. 165 – 174
- Clarke, L.J.; Soubrier, J.; Weyrich, L.S.; Cooper, A. (2014): Environmental metabarcodes for insects: In silico PCR reveals potential for taxonomic bias. *Molecular Ecology Resources*, 14, S. 1160 – 1170

- Cordier, T.; Alonso-Sáez, L.; Apothéloz-Perret-Gentil, L.; Aylagas, E.; Bohan, D.A.; Bouchez, A.; Chariton, A.; Creer, S.; Frühe, L.; Keck, F.; Keeley, N.; Laroche, O.; Leese, F.; Pochon, X.; Stoeck, T.; Pawlowski, J.; Lanzén, A. (2021): Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: A review of current strategies with an implementation roadmap. *Molecular Ecology*, 30, S. 2937 – 2958
- Cordier, T.; Esling, P.; Lejzerowicz, F.; Visco, J.; Ouadahi, A.; Martins, C.; Cedhagen, T.; Pawlowski, J. (2017): Predicting the ecological quality status of marine environments from eDNA metabarcoding data using supervised machine learning. *Environmental Science & Technology*, 51, S. 9118 – 9126
- Creamer, R.E.; Hannula, S.E.; van Leeuwen, J.P.; Stone, D.; Rutgers, M.; Schmelz, R.M.; de Ruiter, P.C.; Bohse Hendriksen, N.; Bolger, T.; Bouffaud, M.L.; Buee, M.; Carvalho, F.; Costa, D.; Dirilgen, T.; Francisco, R.; Griffiths, B.S.; Griffiths, R.; Martin, F.; Martins da Silva, P.; Mendes, S.; Morais, P.V.; Pereira, C.; Philippot, L.; Plassart, P.; Redecker, D.; Römbke, J.; Sousa, J.P.; Wouterse, M.; Lemanceau, P. (2016): Ecological network analysis reveals the inter-connection between soil biodiversity and ecosystem function as affected by land use across Europe. *Applied Soil Ecology*, 97, S. 112 – 124
- Creer, S.; Deiner, K.; Frey, S.; Porazinska, D.; Taberlet, P.; Thomas, W.K.; Potter, C.; Bik, H.M. (2016): The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 7, S. 1008 – 1018
- Cristescu, M.E.; Hebert, P.D. (2018): Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, S. 209 – 230
- Csuzdi, C.; Zicsi, A. (2003): Earthworms of Hungary. *Pedozoologica Hungarica*, 1, 271 S.
- Daghighi, E.; Burkhardt, U.; Filser, J.; Koehler, H. (2016): Techniques for clearing and mounting Collembola from old ethanol collections. *Soil Organisms*, 88, S. 89 – 97
- Datta, D. (2017): Blandr: A bland-altman method comparison package for r.
- De Barba, M.; Miquel, C.; Boyer, F.; Mercier, C.; Rioux, D.; Coissac, E.; Taberlet, P. (2014): DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: Application to omnivorous diet. *Molecular Ecology Resources*, 14, S. 306 – 323
- De Groot, G.A.; Laros, I.; Geisen, S. (2016): Molecular identification of soil eukaryotes and focused approaches targeting protist and faunal groups using high-throughput metabarcoding. In: Martin, F.; Uroz, S. (Hrsg.): *Microbial Environmental Genomics (MEG)*. Springer (New York, NY)
- De Ruiter, P.C.; Neutel, A.-M.; Moore, J.C. (1994): Modelling food webs and nutrient cycling in agro-ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution*, 9, S. 378 – 383
- De Souza, L.S.; Godwin, J.C.; Renshaw, M.A.; Larson, E. (2016): Environmental DNA (eDNA) detection probability is influenced by seasonal activity of organisms. *PLoS One*, 11, Artikel e0165273
- Deagle, B.E.; Jarman, S.N.; Coissac, E.; Pompanon, F.; Taberlet, P. (2014): DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit i marker: Not a perfect match. *Biology Letters*, 10, Artikel 20140562
- Decaens, T.; Porco, D.; Rougerie, R.; Brown, G.G.; James, S.W. (2013): Potential for DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology. *Appl. Soil Ecol.*, 65, S. 35 – 42
- Deiner, K.; Bik, H.M.; Mächler, E.; Seymour, M.; Lacoursière-Roussel, A.; Altermatt, F.; Creer, S.; Bista, I.; Lodge, D.M.; de Vere, N.; Pfrender, M.E.; Bernatchez, L. (2017): Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26, S. 5872–5895
- Dejean, T.; Valentini, A.; Duparc, A.; Pellier-Cuit, S.; Pompanon, F.; Taberlet, P.; Miaud, C. (2011): Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 6, Artikel e23398

- Dickie, I.A.; Boyer, S.; Buckley, H.L.; Duncan, R.P.; Gardner, P.P.; Hogg, I.D.; Holdaway, R.J.; Lear, G.; Makiola, A.; Morales, S.E.; Powell, J.R.; Weaver, L. (2018): Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies. *Molecular Ecology Resources*, 18, S. 940 – 952
- Don, A.; Steinberg, B.; Schöning, I.; Pritsch, K.; Joschko, M.; Gleixner, G.; Schulze, E.-D. (2008): Organic carbon sequestration in earthworm burrows. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, S. 1803 – 1812
- Dopheide, A.; Xie, D.; Buckley, T.R.; Drummond, A.J.; Newcomb, R.D. (2019): Impacts of DNA extraction and PCR on DNA metabarcoding estimates of soil biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(1), S. 120 – 133
- Drake, L.E.; Cuff, J.P.; Young, R.E.; Marchbank, A.; Chadwick, E.A.; Symondson, W.O.C. (2022): An assessment of minimum sequence copy thresholds for identifying and reducing the prevalence of artefacts in dietary metabarcoding data. *Methods in Ecology and Evolution*, 13(3), S. 694 – 710
- Dunger, W.; Fiedler, H.J. (Hrsg.) (1998): *Methoden der Bodenbiologie*. Gustav Fischer Verlag Jena, 539 S.
- Dunger, W.; Schlitt, B. (2011): Synopses on Palaearctic Collembola: Tullbergiidae. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz*, 6(1), S. 1 – 168
- Dunn, N.; Priestley, V.; Herraiz, A.; Arnold, R.; Savolainen, V. (2017): Behavior and season affect crayfish detection and density inference using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 7, S. 7777 – 7785
- Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C.; Quince, C.; Knight, R. (2011): UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), S. 2194 – 2000
- Edge, T.A.; Baird, D.J.; Bilodeau, G.; Gagné, N.; Greer, C.; Konkin, D.; Newton, G.; Séguin, A.; Beaudette, L.; Bilkhu, S.; Bush, A.; Chen, W.; Comte, J.; Condie, J.; Crevecoeur, S.; El-Kayssi, N.; Emilson, E.J.S.; Fancy, D.L.; Kandalaft, I.; Khan, I.U.H.; King, I.; Kreutzweiser, D.; Lapen, D.; Lawrence, J.; Lowe, C.; Lung, O.; Martineau, C.; Meier, M.; Ogden, N.; Paré, D.; Phillips, L.; Porter, T.M.; Sachs, J.; Staley, Z.; Steeves, R.; Venier, L.; Veres, T.; Watson, C.; Watson, S.; Macklin, J. (2020): The Ecobiomics project: Advancing metagenomics assessment of soil health and freshwater quality in Canada. *Science of the Total Environment*, 710, Artikel 135906
- Elbrecht, V.; Vamos, E.E.; Meissner, K.; Aroviita, J.; Leese, F. (2017): Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, S. 1265 – 1275
- Esling, P.; Lejzerowicz, F.; Pawlowski, J. (2015): Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing. *Nucleic Acids Research*, 43, S. 2513 – 2524
- EC (European Commission) (2021): Concept note for the EU Soil Observatory. Joint Research Centre, Directorate D – Sustainable Resources (Ispra), The Director, Ispra, September 2021, JRC.D/GDS
- Europäische Kommission (2021): Mitteilung der Kommission an das Europäische Parlament, den Rat, den Europäischen Wirtschafts- und Sozialausschuss und den Ausschuss der Regionen: EU-Bodenstrategie für 2030 – Die Vorteile gesunder Böden für Menschen, Lebensmittel, Natur und Klima nutzen. Brüssel, den 17.11.2021, COM(2021) 699 final
- Evans, N.T.; Olds, B.P.; Renshaw, M.A.; Turner, C.R.; Li, Y.; Jerde, C.L.; Mahon, A.R.; Pfrender, M.E.; Lamberti, G.A.; Lodge, D.M. (2016): Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16, S. 29 – 41
- Ewels, P.; Magnusson, M.; Lundin, S.; Käller, M. (2016): MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32, S. 3047 – 3048
- Faber, J.H.; Creamer, R.E.; Mulder, C.; Römbke, J.; Rutgers, M.; Sousa, J.P.; Stone, D.; Griffiths, B.S. (2013): The practicalities and pitfalls of establishing a policy-relevant and cost-effective soil biological monitoring scheme. *Integr. Envir. Assess. Manag.*, 9, S. 276 – 284

- Faber, J.H.; van Wensem, J. (2012): Elaborations on the use of the ecosystem services concept for application in ecological risk assessment for soils. *Science Total Environment*, 415, S. 3 – 8
- FAO; ITPS; GSBI; SCBD; EC (2020): State of knowledge of soil biodiversity – Status, challenges and potentialities, Report 2020. Rom (Italien), FAO.
- Ficetola, G.F.; Miaud, C.; Pompanon, F.; Taberlet, P. (2008): Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4, S. 423 – 425
- Gardi, C.; Montanarella, L.; Arrouays, D.; Bispo, A.; Lemanceau, P.; Jolivet, C.; Mulder, C.; Ranjard, L.; Römbke, J.; Rutgers, M.; Menta, C. (2009): Soil biodiversity monitoring in Europe: ongoing activities and challenges. *Eur. J. Soil Biol.*, 60, S. 807 – 819
- Geerts, A.N.; Boets, P.; Van den Heede, S.; Goethals, P.; Van der Heyden, C. (2018): A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. *Ecological Indicators*, 84, S. 564 – 572
- Gibson, J.F.; Shokralla, S.; Curry, C.; Baird, D.J.; Monk, W.A.; King, I.; Hajibabaei, M. (2015): Large-scale biomonitoring of remote and threatened ecosystems via high-throughput sequencing. *PLoS One*, 10, Artikel e0138432
- Glenn, T.C. (2011): Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11, S. 759 – 769
- Gold, Z.; Sprague, J.; Kushner, D.J.; Zerecero Marin, E.; Barber, P.H. (2021): eDNA metabarcoding as a biomonitoring tool for marine protected areas. *PLoS One*, 16, Artikel e0238557
- Goldberg, C.S.; Sepulveda, A.; Ray, A.; Baumgardt, J.; Waits, L.P. (2013): Environmental DNA as a new method for early detection of new zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32, S. 792 – 800
- Goldberg, C.S.; Turner, C.R.; Deiner, K.; Klymus, K.E.; Thomsen, P.F.; Murphy, M.A.; Spear, S.F.; McKee, A.; Oyler-McCance, S.J.; Cornman, R.S.; Laramie, M.B.; Mahon, A.R.; Lance, R.F.; Pilliod, D.S.; Strickler, K.M.; Waits, L.P.; Fremier, A.K.; Takahara, T.; Herder, J.E.; Taberlet, P. (2016): Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7, S. 1299 – 1307
- Graefe, U.; Schmelz, R.M. (1999): Indicator values, strategy types and life forms of terrestrial Enchytraeidae and other microannelids. In: Schmelz, R.; Sühlo, K. (Hrsg.): Newsletter on Enchytraeidae 6. Universitätsverlag Rasch, Osnabrück, S. 59 – 67
- Graff, O. (1953): Die Regenwürmer Deutschlands. Schriftenreihe der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode, 7, S. 1 – 70
- Griffiths, B.S.; Römbke, J.; Schmelz, R.; Scheffczyk, A.; Faber, J.; Bloem, J.; Peres, G.; Cluzeau, D.; Chabbi, A.; Sutherland, M.; Sousa, J.P.; Martins da Silva, P.; Carvalho, F.; Mendes, S.; Morais, P.; Francisco, R.; Costa, D.; Pereira, C.; Bonkowski, M.; Geisen, S.; Bardgett, R.D.; Bolger, T.; Schmidt, O.; Winding, A.; Hendriksen, N.B.; Johansen, A.; Philippot, L.; Plassart, P.; Bru, D.; Thomson, B.; Griffiths, R.I.; Rutgers, M.; Mulder, C.; Hannula, E.; Creamer, R.; Stone, D. (2016): Selecting cost effective and policy-relevant biological indicators for European monitoring of soil biodiversity and ecosystem function (EcoFINDERS). *Ecol. Indicators.*, 69, S. 213 – 223
- Grosse, M.; Heinrich, U.; Hierold, W. (2019): Fact sheet for the description of long-term field experiments / Steckbrief zur Beschreibung von Dauerfeldversuchen. *BonaRes Series* 2019/2
- Grosse, M.; Hierold, W.; Ahlborn, M.C.; Piepho, H.-P.; Helming, K. (2020): Long-term field experiments in Germany: classification and spatial representation. *Soil*, 6, S. 579 – 596
- Guardiola, M.; Wangenstein, O.S.; Taberlet, P.; Coissac, E.; Uriz, M.J.; Turon, X. (2016): Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. *PeerJ*, 4, Artikel e2807

Guerra, C.A.; Bardgett, R.D.; Caon, L.; Crowther, T.W.; Delgado-Baquerizo, M.; Montanarella, L.; Navarro, L.M.; Orgiazzi, A.; Singh, B.K.; Tedersoo, L.; Vargas-Rojas, R.; Briones, M.J.I.; Buscot, F.; Cameron, E.K.; Cesarz, S.; Chatzinotas, A.; Cowan, D.A.; Djukic, I.; van den Hoogen, J.; Lehmann, A.; Maestre, F.T.; Marín, C.; Reitz, T.; Rillig, M.C.; Smith, L.C.; de Vries, F.T.; Weigelt, A.; Wall, D.H.; Eisenhauer, N. (2021): Tracking, targeting, and conserving soil biodiversity. *Science*, 371, S. 239 – 241

Hajibabaei, M.; Shokralla, S.; Zhou, X.; Singer, G.A.; Baird, D.J. (2011): Environmental barcoding: A next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One*, 6, Artikel e17497

Hebert, P.D.; Ratnasingham, S.; De Waard, J.R. (2003): Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, S. 596 – 599

Heinemeyer, O.; Insam, H.; Kaiser, E.A.; Walenzik, G. (1989): Soil microbial biomass and respiration measurements: An automated technique based on infra-red gas analysis. *Plant and Soil*, 116, S. 191 – 195

Helbing, C.; Hobbs, J. (2019): Environmental DNA standardization needs for fish and wildlife population assessments and monitoring. *Canadian Standards Association*, S. 1–41

Herder, J.; Valentini, A.; Bellemain, E.; Dejean, T.; van Delft, J.; Thomsen, P.; Taberlet, P. (2014): Environmental DNA – a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Nijmegen: Netherlands, Food and Consumer Product Safety Authority

Hering, D.; Borja, A.; Jones, J.I.; Pont, D.; Boets, P.; Bouchez, A.; Bruce, K.; Drakare, S.; Hänfling, B.; Kahlert, M.; Leese, F.; Meissner, K.; Mergen, P.; Reyjol, Y.; Segurado, P.; Vogler, A.; Kelly, M. (2018): Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, 138, S. 192 – 205

Hoffmann, G.G.; Dedeken, M. (1965): Eine Methode zur colorimetrischen Bestimmung der β -Glucosidase-Aktivität in Böden. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 108, S. 193 – 198

Holdaway, R.J.; Wood, J.R.; Dickie, I.A.; Orwin, K.H.; Bellingham, P.J.; Richardson, S.J.; Lyver, P.O.; Timoti, P.; Buckley, T.R. (2017): Using DNA metabarcoding to assess new zealand's terrestrial biodiversity. *New Zealand Journal of Ecology*, 41, S. 251 – 262

Hopkin, S.P. (2007): A key to the Collembola (Springtails) of Britain and Ireland. AIDGAP, Field Studies Council, 246 S.

Hosler, D. (2017): Environmental DNA (eDNA) and monitoring for invasive species

Illumina, Inc. (2017): Effects of index misassignment on multiplexing and downstream analysis. <https://www.illumina.com>

ISO (International Organization for Standardization) (2006): Soil quality – Sampling of soil invertebrates Part 2: Sampling and extraction of microarthropods (Collembola and Acarina). ISO 23611-2. Genf, Schweiz

ISO (International Organization for Standardization) (2007): Soil quality – Sampling of soil invertebrates Part 3: Sampling and soil extraction of enchytraeids. ISO 23611-3. Genf, Schweiz

ISO (International Organization for Standardization) (2016): Soil quality – Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative realtime PCR from DNA directly extracted from soil. ISO 17601. Genf, Schweiz

ISO (International Organization for Standardization) (2017): Soil quality – Identification of ecotoxicological test species by DNA barcoding. ISO 21286. Genf, Schweiz

ISO (International Organization for Standardization) (2018): Soil quality – Sampling of soil invertebrates Part 1: Hand-sorting and extraction of earthworms. ISO 23611-1. Genf, Schweiz

- Jänsch, S.; Bauer, J.; Graf, N.; Scheffczyk, A.; Schmelz, R.M.; Waszak, K.; Weisbrod, B.; Römbke, J. (2016): Bodenzoologische Beprobung, Bestimmung und Bewertung von Lumbriciden und Enchytraeen auf 12 Boden-Dauerbeobachtungsflächen in Thüringen. Unveröff. Bericht der ECT GmbH im Auftrag der Thüringer Landesanstalt für Umwelt und Geologie, Außenstelle Weimar, 105 S.
- Jänsch, S.; Steffens, L.; Höfer, H.; Horak, F.; Roß-Nickoll, M.; Russell, D.; Toschki, A.; Römbke, J. (2013): State of knowledge of earthworm communities in German soils as a basis for biological soil quality assessment. *Soil Organisms*, 85 (3), S. 215 – 233
- Jeffrey, S.; Gardi, C.; Jones, A.; Montanarella, L.; Marmo, L.; Miko, L.; Ritz, K.; Peres, G.; Römbke, J.; Van der Putten, W. (Hrsg.) (2010): *European Atlas of Soil Biodiversity*. European Commission, Publications Office of the European Union, Luxembourg, EUR 24375 EN, 128 S.
- Jerde, C.L.; Chadderton, W.L.; Mahon, A.R.; Renshaw, M.A.; Corush, J.; Budny, M.L.; Mysorekar, S.; Lodge, D.M.; (2013): Detection of asian carp DNA as part of a great lakes basin-wide surveillance program. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70, S. 522 – 526
- Jerde, C.L.; Mahon, A.R.; Chadderton, W.L.; Lodge, D.M. (2011): “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation letters*, 4, S. 150 – 157
- Ji, Y.; Ashton, L.; Pedley, S.M.; Edwards, D.P.; Tang, Y.; Nakamura, A.; Kitching, R.; Dolman, P.M.; Woodcock, P.; Edwards, F.A.; Larsen, T.H.; Hsu, W.W.; Benedick, S.; Hamer, K.C.; Wilcove, D.S.; Bruce, C.; Wang, X.; Levi, T.; Lott, M.; Emerson, B.C.; Yu, D.W. (2013): Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters*, 16, S. 1245 – 1257
- Jones, A.; Fernandes-Ugalde, O.; Scarpa, S.; Eiselt, B. (2021): LUCAS Soil 2022 – ISSG Planning Document. JRC Technical Report, EUR 30331 EN
- Jordana, R. (2012): Synopses on Palaearctic Collembola: Part 1: Capbryinae & Entomobryini. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz*, 7(1), S. 1 – 390
- Jordana, R.; Arbea, J.I.; Simon, C.; Lucianes, M.J. (1997): Collembola: Poduromorpha. *Fauna Ibérica* 8, Museo Nacional de Ciencias Naturales, 807 S.
- Kassambara, A. (2020): Ggpubr: “ggplot2” based publication ready plots.
- Kaufmann-Boll, C.; Kern, M.; Niederschmidt, S. (2020): Bodendaten in Deutschland – Übersicht über die wichtigsten Mess- und Erhebungsaktivitäten für Böden. UBA-Texte Nr. 52/2020, Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 196 S.
- Keith, A.M.; Robinson, D.A. (2012): Earthworms as natural capital: Ecosystem service providers in agricultural soils. *Economology Journal*, Vol. II Year II, S. 91 – 99
- Khan, A.; Mathelier, A. (2017): Intervene: a tool for intersection and visualization of multiple gene or genomic region sets. *BMC Bioinformatics*, 18, Artikel 287
- Kibblewhite, M.G.; Ritz, K.; Swift, M.J. (2008): Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 363, S. 685 – 701
- Kirse, A.; Bourlat, S.J.; Langen, K.; Fonseca, V.G. (2021): Unearthing the potential of soil eDNA Metabarcoding - Towards best practice advice for invertebrate biodiversity assessment. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, Artikel 630560
- Köninger, J.; Panagos, P.; Jones, A.; Briones, M.J.I.; Orgiazzi, A. (2022): In defence of soil biodiversity: Towards an inclusive protection in the European Union. *Biological Conservation*, 268, Artikel 109475
- Koschorreck, J.; Conrad, A.; Körner, A.; Rüter, M.; Schröter-Kermani, C.; Mohaupt, V.; Kolossa-Gehring, M.; Fliedner, A.; Rüdell, H. (2016): Die Umweltprobenbank: Umweltbeobachtung mit Proben von Mensch und Umwelt. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 64 S.

- Kuntke, F.; de Jong, N.; Hesselsøe, M.; Lund Nielsen, J. (2020): Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates. *Ecological Indicators*, 111, Artikel 105982
- Lamb, P.D.; Hunter, E.; Pinnegar, J.K.; Creer, S.; Davies, R.G.; Taylor, M.I. (2019): How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. *Molecular Ecology*, 28, S. 420 – 430
- Lanzén, A.; Dahlgren, T.G.; Bagi, A.; Hestetun, J.T. (2021): Benthic eDNA metabarcoding provides accurate assessments of impact from oil extraction, and ecological insights. *Ecological Indicators*, 130, Artikel 108064
- Lanzén, A.; Lekang, K.; Jonassen, I.; Thompson, E.M.; Troedsson, C. (2016): High-throughput metabarcoding of eukaryotic diversity for environmental monitoring of offshore oil-drilling activities. *Molecular Ecology*, 25, S. 4392 – 4406
- Leese, F.; Bouchez, A.; Abarenkov, K.; Altermatt, F.; Borja, Á.; Bruce, K.; Ekrem, T.; Čiampor Jr., F.; Čiamporová-Zaťovičová, Z.; Costa, F.O.; Duarte, S.; Elbrecht, V.; Fontaneto, D.; Franc, A.; Geiger, M.F.; Hering, D.; Kahlert, M.; Kalamujić Stroil, B.; Kelly, M.; Keskin, E.; Liska, I.; Mergen, P.; Meissner, K.; Pawlowski, J.; Penev, L.; Reyjol, Y.; Rotter, A.; Steinke, D.; van der Wal, B.; Vitecek, S.; Zimmermann, J.; Weigand, A.M. (2018): Chapter Two – Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Bio-monitoring 2.0: A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action. *Advances in Ecological Research*, 58, S. 63 – 99
- Lehmitz, R.; Römbke, J.; Jänsch, S.; Krück, S.; Beylich, A.; Graefe, U. (2014): Checklist of earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae) from Germany. *Zootaxa*, 3866 (2), S. 221 – 245
- Leray, M.; Knowlton, N. (2015): DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, S. 2076 – 2081
- Leray, M.; Yang, J.Y.; Meyer, C.P.; Mills, S.C.; Agudelo, N.C.; Ranwez, V.; Boehm, J.T.; Machida, R.J. (2013): A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding meta-zoan diversity: characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10, Artikel 34
- Levy-Booth, D.J.; Campbell, R.G.; Gulden, R.H.; Hart, M.M.; Powell, J.R.; Klironomos, J.N.; Pauls, K.P.; Swanton, C.J.; Trevors, J.T.; Dunfield, K.E. (2007): Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, S. 2977 – 2991
- Lex, A.; Gehlenborg, N.; Strobel, H.; Vuillemot, R.; Pfister, H. (2014): UpSet: Visualization of intersecting sets. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics (InfoVis)*, 20(12), S. 1983 – 1992
- Linkov, I.; Loney, D.; Cormier, S.; Satterstrom, K.; Bridges, T. (2009): Weight-of-evidence evaluation in environmental assessment: Review of qualitative and quantitative approaches. *Science of the Total Environment*, 407, S. 5199 – 5205
- Loeza-Quintana, T.; Abbott, C.L.; Heath, D.D.; Bernatchez, L.; Hanner, R.H. (2020): Pathway to increase standards and competency of eDNA surveys (PISCeS)—advancing collaboration and standardization efforts in the field of eDNA. *Environmental DANN*, 2, S. 255 – 260
- Macherey-Nagel (2017): Genomic DNA from soil – User manual NucleoSpin® Soil. November 2017/Rev. 07.
- Magoč, T.; Salzberg, S.L. (2011): FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), S. 2957 – 2963
- Mahé, F.; Rognes, T.; Quince, C.; de Vargas, C.; Dunthorn, M. (2015): Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*, 3, Artikel e1420
- Mahon, A.R.; Jerde, C.L.; Galaska, M.; Bergner, J.L.; Chadderton, W.L.; Lodge, D.M.; Hunter, M.E.; Nico, L.G. (2013): Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of asian carps in controlled and field experiments. *PloS One*, 8, Artikel e58316

- Marquina, D.; Andersson, A.F.; Ronquist, F. (2019): New mitochondrial primers for metabarcoding of insects, designed and evaluated using in silico methods. *Molecular Ecology Resources*, 19, S. 90 – 104
- Martin, M. (2011): Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet Journal*, 17, S. 10 – 12
- Martins da Silva, P.; Carvalho, F.; Dirilgen, T.; Stone, D.; Creamer, R.; Bolger, T.; Sousa, J.P. (2016): Traits of collembolan life-form indicate land use types and soil properties across an European transect. *Applied Soil Ecology*, 97, S. 69 – 77
- Matheson, C.D.; Gurney, C.; Esau, N.; Lehto, R. (2010): Assessing PCR inhibition from humic substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3, S. 38 – 45
- McMurdie, P.J.; Holmes, S. (2013): Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8, Artikel e61217
- Mendes, S.; Azul, A.M.; Castro, P.; Römbke, J.; Sousa, J.P. (2016): Protecting soil biodiversity and soil functions: current status and future challenges. In: Castro, P.; Azeiteiro, U.M.; Bacelar Nicolau, P.; Leal Filho, W.; Azul, A.M. (Hrsg.): *Biodiversity and Education for Sustainable Development*. Springer, World Sustainability Series, S. 249 – 263
- Nascimento, E.; Reis, F.; Chichorro, F.; Canhoto, C.; Gonçalves, A.L.; Simões, S.; Sousa, J.P.; Martins da Silva, P. (2019): Effects of management on plant litter traits and consequences for litter mass loss and Collembola functional diversity in a Mediterranean agro-forest system. *Pedobiologia*, 75, S. 38 – 51
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2008): *BLAST® Command Line Applications User Manual*. National Center for Biotechnology Information (US). Edition March 24, 2022, 95 S.
- Ockleford, C.; Adriaanse, P.; Berny, P.; Brock, T.; Duquesne, S.; Grilli, S.; Hernandez-Jerez, A.F.; Bennekou, S.H.; Klein, M.; Kuhl, T.; Laskowski, R.; Machera, K.; Pelkonen, O.; Pieper, S.; Stemmer, M.; Sundh, I.; Teodorovic, I.; Tiktak, A.; Topping, C.J.; Wolterink, G.; Craig, P.; de Jong, F.; Manachini, B.; Sousa, P.; Swarowsky, K.; Auteri, D.; Arena, M.; Rob, S. (2017): Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. *EFSA Journal*, 15(2), Artikel 4690
- Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlenn, D.; Minchin, P.; O'Hara, R.; Simpson, G.; Solymos, P.; Stevens, M.H.H.; Szoecs, E.; Wagner, H. (2020): *Vegan: Community ecology package*.
- Orgiazzi, A.; Bardgett, R.D.; Barrios, E.; Behan-Pelletier, V.; Briones, M.J.I.; Chotte, J.L.; De Deyn, G.B.; Eggleton, P.; Fierer, N.; Fraser, T.; Hedlund, K.; Jeffrey, S.; Johnson, N.C.; Jones, A.; Kandeler, E.; Kaneko, N.; Lavelle, P.; Lemanceau, P.; Miko, L.; Montanarella, L.; de Souza Moreira, F.M.; Ramirez, K.S.; Scheu, S.; Singh, B.K.; Six, J.; van der Putten, W.H.; Wall, D.H. (2016): *Global Soil Biodiversity Atlas*. European Commission, Publications Office of the European Union, Luxemburg
- Orgiazzi, A.; Ballabio, C.; Panagos, P.; Jones, A.; Fernández-Ugalde, O. (2018): LUCAS Soil, the largest expandable soil dataset for Europe: a review. *European Journal of Soil Science*, 69(1), S. 140 – 153
- Pansu, J.; De Danieli, S.; Puissant, J.; Gonzalez, J.-M.; Gielly, L.; Cordonnier, T.; Zinger, L.; Brun, J.-J.; Choler, P.; Taberlet, P.; Cécillon, L. (2015): Landscape-scale distribution patterns of earthworms inferred from soil DNA. *Soil Biol. Biochem.*, 83, S. 100 – 105
- Pawlowski, J.; Apothéloz-Perret-Gentil, L.; Mächler, E.; Altermatt, F. (2020): *Environmental DNA applications in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems. Guidelines*. Federal Office for the Environment, Bern. *Environmental Studies*, 2010, 71 S.
- Pawlowski, J.; Kelly-Quinn, M.; Altermatt, F.; Apothéloz-Perret-Gentil, L.; Beja, P.; Boggero, A.; Borja, A.; Bouchez, A.; Cordier, T.; Domaizon, I.; Feio, M.J.; Filipe, A.F.; Fornaroli, R.; Graf, W.; Herder, J.; van der Hoorn, B.; Iwan Jones, J.; Sagova-Mareckova, M.; Moritz, C.; Barquín, J.; Piggott, J.J.; Pinna, M.; Rimet, F.; Rinkevich, B.;

- Sousa-Santos, C.; Specchia, V.; Trobajo, R.; Vasselon, V.; Vitecek, S.; Zimmerman, J.; Weigand, A.; Leese, F.; Kahlert, M.; 2018. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 637 – 638, S. 1295 – 1310
- Pawlowski, J.; Lejzerowicz, F.; Esling, P. (2014): Next-generation environmental diversity surveys of foraminifera: Preparing the future. *The Biological Bulletin*, 227, S. 93 – 106
- Pearson, D.L.; Hamilton, A.L.; Erwin, T.L. (2011): Recovery plan for the endangered taxonomy profession. *BioScience*, 61, S. 58 – 63
- Pedersen, M.W.; Overballe-Petersen, S.; Ermini, L.; Sarkissian, C.D.; Haile, J.; Hellstrom, M.; Spens, J.; Thomsen, P.F.; Bohmann, K.; Cappellini, E.; Schnell, I.B.; Wales, N.A.; Carøe, C.; Campos, P.F.; Schmidt, A.M.Z.; Gilbert, M.T.P.; Hansen, A.J.; Orlando, L.; Willerslev, E. (2015): Ancient and modern environmental DNA. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370, Artikel 20130383
- Pérez-Losada, M.; Bloch, R.; Breinholt, J.W.; Pfenninger, M.; Domínguez, J. (2012): Taxonomic assessment of Lumbricidae (Oligochaeta) earthworm genera using DNA barcodes. *Eur. J. Soil Biol.*, 48, S. 41 – 47
- Perring, M.P.; Standish, R.J.; Price, J.N.; Craig, M.D.; Erickson, T.E.; Ruthrof, K.X.; Whiteley, A.S.; Valentine, L.E.; Hobbs, R.J. (2015): Advances in restoration ecology: Rising to the challenges of the coming decades. *Ecosphere*, 6, S. 1 – 25
- Pieper, S.; Frauenstein, J.; Ginzky, H.; Glante, F.; Grimski, D.; Kotschik, P.; Marx, K.; Biegel-Engler, A. (2023): The upcoming European Soil Health Law – chances and challenges for an effective soil protection. *Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau*, 37 S.
- Pilliod, D.S.; Laramie, M.B.; MacCoy, D.; Maclean, S. (2019): Integration of eDNA-based biological monitoring within the US geological survey's national streamgauge network. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 55, S. 1505 – 1518
- Pimentel, D.; Wilson, C.; McCullum, C.; Huang, R.; Dwen, P.; Flack, J.; Tran, Q.; Saltman, T.; Cliff, B. (1997): Economic and environmental benefits of biodiversity. *Bioscience*, 47, S. 747 – 758
- Piñol, J.; Senar, M.A.; Symondson, W.O. (2019): The choice of universal primers and the characteristics of the species mixture determine when DNA metabarcoding can be quantitative. *Molecular Ecology*, 28, S. 407 – 419
- Pochon, X.; Zaiko, A.; Fletcher, L.M.; Laroche, O.; Wood, S.A. (2017): Wanted dead or alive? Using metabarcoding of environmental DNA and RNA to distinguish living assemblages for biosecurity applications. *PloS One*, 12, Artikel e0187636
- Porco, D.; Decaëns, T.; Deharveng, L.; James, S.W.; Skarzynski, D.; Erséus, C.; Butt, K.R.; Richard, B.; Hebert, P.D.N. (2013): Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biol. Invasions*, 15, S. 899 – 910
- Porco, D.; Chang, C.-H.; Dupont, L.; James, S.; Richard, B.; Decaëns, T. (2018): A reference library of DNA barcodes for the earthworms from Upper Normandy: Biodiversity assessment, new records, potential cases of cryptic diversity and ongoing speciation. *Appl. Soil Ecol.*, 124, S. 362 – 371
- Potapov, M.B. (2001): Synopses on Palaearctic Collembola: Isotomidae. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz*, 3, S. 1 – 603
- R Core Team (2019) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
- Ratnasingham, S.; Hebert, P.D. (2007): BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7, S. 355 – 364
- Raymond-Leonard, L.; Gravel, D.; Handa, T. (2019): A novel set of traits to describe Collembola mouthparts: taking a bite out of the broad chewing mandible classification. *Soil Biology and Biochemistry*, 138, Artikel 107608

- Riecken, U.; Finck, p.; Rath, U.; Schröder, E.; Ssymank, A. (2006): Rote Liste der gefährdeten Biotoptypen Deutschlands. Zweite fortgeschriebene Fassung 2006. Naturschutz und Biologische Vielfalt, 34, 318 S.
- Römbke, J.; Breure, A.M. (Hrsg.) (2005): Ecological soil quality - Classification and assessment. Ecotox. Environ. Safety, 62, S. 185 – 308
- Römbke, J.; Aira, M.; Backeljau, T.; Breugelmans, K.; Domínguez, J.; Funke, E.; Graf, N.; Hajibabaei, M.; Pérez-Losada, M.; Porto, P.G.; Schmelz, R.M.; Vierna, J.; Vizcaíno, A.; Pfenninger, M. (2016a): DNA barcoding of earthworms (*Eisenia fetida/andrei* complex) from 28 ecotoxicological test laboratories. Appl. Soil Ecol., 174, S. 3 – 11
- Römbke, J.; Gardi, C.; Creamer, R.; Miko, L. (2016b): Soil biodiversity data: actual and potential use in European and national legislation. Appl. Soil Ecol., 97, S. 125 – 133
- Römbke, J.; Jänsch, S.; Höfer, H.; Horak, F.; Roß-Nickoll, M.; Russell, D.; Toschki, A. (2013): State of knowledge of enchytraeid communities in German soils as a basis for biological soil quality assessment. Soil Organisms, 85 (2), S. 123 – 146
- Römbke, J.; Jänsch, S.; Roß-Nickoll, M.; Toschki, A.; Höfer, H.; Horak, F.; Russell, D.; Burkhardt, U.; Schmitt, H. (2012): Erfassung und Analyse des Bodenzustands im Hinblick auf die Umsetzung und Weiterentwicklung der Nationalen Biodiversitätsstrategie. UBA-Texte Nr. 33/2012, Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 386 S.
- Römbke, J.; Schmelz, R.M.; Pelosi, C. (2017): Effects of organic pesticides on enchytraeids (Oligochaeta) in agroecosystems: laboratory and higher-tier tests. Frontiers in Environmental Science, 5, Artikel 20
- Ruf A.; Beylich, A.; Blick, T.; Büchs, W.; Glante, F.; Höss, S.; Roß-Nickoll, M.; Rueß, L.; Russell, D.J.; Römbke, J.; Seitz, H.; Theißen, B.; Toschki, A.; Weimann, C.; Züghart, W. (2013): Soil organisms as an essential element of a monitoring plan to identify the effects of GMO cultivation. Requirements – Methodology – Standardisation. BioRisk, 8, S. 73 – 87
- Ruppert, K.M.; Kline, R.J.; Rahman, M.S. (2019): Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. Global Ecology and Conservation, 17, Artikel e00547
- Rutgers, M.; Mulder, C.; Schouten, A.J.; Bloem, J.; Bogte, J.J.; Breure, A.M.; Brussaard, L.; De Goede, R.G.M.; Faber, J.H.; Jagers op Akkerhuis, G.A.J.M.; Keidel, H.; Korthals, G.; Smeding, F.W.; Ter Berg, C.; Van Eekeren, N. (2008): Soil ecosystem profiling in the Netherlands with ten references for biological soil quality. Report 607604009, RIVM, Bilthoven, Niederlande
- Rutgers, M.; Van Leeuwen, J.P.; Vrebos, D.; Van Wijnen, H.J.; Schouten, T.; de Goede, R.G.M. (2019): Mapping Soil Biodiversity in Europe and the Netherlands. Soil Syst., 3, Artikel 39
- Saitoh, S.; Aoyama, H.; Fujii, S.; Sunagawa, H.; Nagahama, H.; Akutsu, M.; Shinzato, N.; Kaneko, N.; Nakamori, T. (2016): A quantitative protocol for DNA metabarcoding of springtails (Collembola). Genome, 59, S. 705 – 723
- Santi, I.; Kasapidis, P.; Karakassis, I.; Pitta, P. (2021): A comparison of DNA metabarcoding and microscopy methodologies for the study of aquatic microbial eukaryotes. Diversity, 13, Artikel 180
- Schaefer, M.; Tischler, W. (1983): Wörterbücher der Biologie: Ökologie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 354 S.
- Schenk, J.; Höss, S.; Brinke, M.; Kleinbölting, N.; Brüchner-Hüttemann, H.; Traunspurger, W. (2020): Nematodes as bioindicators of polluted sediments using metabarcoding and microscopic taxonomy. Environment International, 143, Artikel 105922
- Schmelz, R.M.; Collado, R. (2010): A guide to European terrestrial and freshwater species of Enchytraeidae (Oligochaeta). Soil Organisms, 82, S. 1 – 176
- Seymour, M.; Edwards, F.K.; Cosby, B.J.; Kelly, M.G.; de Bruyn, M.; Carvalho, G.R.; Creer, S. (2020): Executing multi-taxa eDNA ecological assessment via traditional metrics and interactive networks. Science of the Total Environment, 729, Artikel 138801

- Sievert, C. (2020): Interactive web-based data visualization with r, plotly, and shiny. Chapman; Hall/CRC.
- Sigsgaard, E.E.; Carl, H.; Møller, P.R.; Thomsen, P.F. (2015): Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation*, 183, S. 46 – 52
- Sims, R.W.; Gerard, B.M. (1999): Earthworms. In: Kermack, D.M.; Barnes, R.S.K. (Hrsg.): *Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31*. London: E. J. Brill / W. Backhuys, 171 S.
- Smart, A.S.; Weeks, A.R.; van Rooyen, A.R.; Moore, A.; McCarthy, M.A.; Tingley, R. (2016): Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling. *Methods in Ecology and Evolution*, 7, S. 1291 – 1298
- Sousa, J.P.; Bolger, T.; da Gama, M.M.; Lukkari, T.; Ponge, J-F.; Simón, C.; Traser, G.; Vanbergen, A.J.; Brennan, A.; Dubs, F.; Ivtis, E.; Keating, A.; Stofer, S.; Watt, A.D. (2006): Changes in Collembola richness and diversity along a gradient of land-use intensity: A pan European study. *Pedobiologia*, 50, S. 147 – 156
- Stone, D.; Blomkvist, P.; Bohse Hendriksen, N.; Bonkowski, M.; Bracht Jørgensen, H.; Carvalho, F.; Dunbar, M.B.; Gardi, C.; Geisen, S.; Griffiths, R.; Hug, A.S.; Jensen, J.; Laudon, H.; Mendes, S.; Morais, P.V.; Orgiazzi, A.; Plassart, P.; Römbke, J.; Rutgers, M.; Schmelz, R.M.; Sousa, J.P.; Suhadolc, M.; Winding, A.; Zupan, M.; Lemanceau, P.; Creamer, R.E. (2016): Establishing a transect for biodiversity and ecosystem function monitoring across Europe. *Applied Soil Ecology*, 97, S. 3 – 11
- Straube, D.; Juen, A. (2013): Storage and shipping of tissue samples for DNA analyses: a case study on earthworms. *Eur. J. Soil Biol.*, 57, S. 13 – 18
- Taberlet, P.; Bonin, A.; Zinger, L.; Coissac, E. (2018): *Environmental DNA – For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press, Oxford, Vereinigtes Königreich
- Taberlet, P.; Coissac, E.; Hajibabaei, M.; Rieseberg, L.H. (2012): Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, S. 1789 – 1793
- Taberlet, P.; Coissac, E.; Pompanon, F.; Brochmann, C.; Willerslev, E. (2012): Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21, S. 2045 – 2050
- Taberlet, P.; Prud'Homme, S.; Campione, E.; Roy, J.; Miquel, C.; Shezad, W.; Gielly, L.; Rioux, L.; Choler, P.; Clement, J-C.; Melodelima, C.; Pompanon, F.; Coissac, E. (2012): Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, 21, S. 1816 – 1820
- Takahara, T.; Minamoto, T.; Yamanaka, H.; Doi, H.; Kawabata, Z. (2012): Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS One*, 7, Artikel e35868
- Thibaud, J.-M.; Schulz, H.-J.; Assalino, M.M.G. (2004): *Synopses on Palaearctic Collembola: Hypogastruridae*. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz*, 4, S. 1 – 287
- Thomsen, P.F.; Kielgast, J.; Iversen, L.L.; Wiuf, C.; Rasmussen, M.; Gilbert, M.T.P.; Orlando, L.; Willerslev, E. (2012): Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, S. 2565 – 2573
- Thomsen, P.F.; Willerslev, E. (2015): Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.*, 183, S. 4 – 18
- Toschki, A.; Jänsch, S.; Roß-Nickoll, M.; Römbke, J.; Züghart, W. (2015): Possibilities of using the German Federal States' permanent soil monitoring program for the monitoring of potential effects of genetically modified organisms (GMO). *Environ. Sci. Eur.*, 27, S. 1 – 13
- Toschki, A.; Burkhardt, U.; Haase, H.; Höfer, H.; Jänsch, S.; Oellers, J.; Römbke, J.; Roß-Nickoll, M.; Salamon, J.; Schmelz, R.M.; Scholz-Starke, B.; Russell, D. (2021a): Die Edaphobase-Länderstudien – Synökologische Untersuchungen von Bodenorganismen in einem Biotop- und Standortgradienten in Deutschland 2014 – 2018. *Peckiana*, 14, S. 1 – 367

- Toschki, A.; Oellers, J.; Rumohr, Q.; Roß-Nickoll, M.; Daniels, B.; Schäffer, A.; Sybertz, A. (2021b): Integriertes Monitoring in der Agrarlandschaft – Erfassung der ökologischen Auswirkungen des chemischen Pflanzenschutzes. UBA-Texte Nr. 136/2021, Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 110 S.
- Turbé, A.; De Toni, A.; Benito, P.; Lavelle, P.; Ruiz, N.; Van der Putten, W.; Labouze, E.; Mudgal, S. (2010): Soil biodiversity: functions, threats, and tools for policy makers. BioIntelligence Service, IRD, and NIOO, Report for European Commission (DG Environment), Brüssel, Belgien, 250 S.
- Valentini, A.; Taberlet, P.; Miaud, C.; Civade, R.; Herder, J.; Thomsen, P.F.; Bellemain, E.; Besnard, A.; Coissac, E.; Boyer, F.; Gaboriaud, C.; Jean, P.; Poulet, N.; Roset, N.; Copp, G.H.; Geniez, P.; Pont, D.; Argillier, C.; Baudoin, J.-M.; Peroux, T.; Crivelli, A.J.; Olivier, A.; Acqueberge, M.; Le Brun, M.; Møller, P.R.; Willerslev, E.; Dejean, T. (2016): Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25, S. 929 – 942
- Van Gestel, C.A.M.; Mommer, L.; Montanarella, L.; Pieper, S.; Coulson, M.; Toschki, A.; Rutgers, M.; Focks, A.; Römbke, J. (2020): Soil Biodiversity: State-of-the art and possible application in chemical risk assessment. *Integ. Envir. Assess. Manag.*, 17(3), S. 541 – 551
- Van Groenigen, J.W.; Lubbers, I.M.; Vos, H.M.J.; Brown, G.G.; De Deyn, G.B.; Van Groenigen, K.J. (2016): Earthworms increase plant production: a meta-analysis. *Sci. Rep.*, 4, Artikel 6365
- Vasselon, V.; Rimet, F.; Tapolczai, K.; Bouchez, A. (2017): Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (mayotte island, france). *Ecological Indicators*, 82, S. 1 – 12
- Vierna, J.; Doña, J.; Vizcaíno, A.; Serrano, D.; Jovani, R. (2017): PCR cycles above routine numbers do not compromise high-throughput DNA barcoding results. *Genome*, 60, S. 868 – 873
- Vivien, R.; Apothéoz-Perret-Gentil, L.; Pawlowski, J.; Werner, I.; Lafont, M.; Ferrari, B.J.D. (2020): High-throughput DNA barcoding of oligochaetes for abundance-based indices to assess the biological quality of sediments in streams and lakes. *Scientific Reports*, 10, Artikel 2041
- Wagg, C.; Bender, F.; Widmer, F.; van der Heijden, M.G.A. (2014): Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *PNAS*, 111, S. 5266 – 5270
- Wangensteen, O.S.; Palacín, C.; Guardiola, M.; Turon, X. (2018): DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*, 6, Artikel e4705
- Weber, A.A.-T.; Pawlowski, J. (2014): Wide occurrence of SSU rDNA intragenomic polymorphism in foraminifera and its implications for molecular species identification. *Protist*, 165, S. 645 – 661
- Wickham, H. (2016): *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York
- Willerslev, E.; Cooper, A. (2005): Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272, S. 3 – 16
- Willerslev, E.; Davison, J.; Moora, M.; Zobel, M.; Coissac, E.; Edwards, M.E.; Lorenzen, E.D.; Vestergård, M.; Gussarova, G.; Haile, J.; Craine, J.; Gielly, L.; Boessenkool, S.; Epp, L.S.; Pearman, P.B.; Cheddadi, R.; Murray, D.; Bråthen, K.A.; Yoccoz, N.; Binney, H.; Cruaud, C.; Wincker, P.; Goslar, T.; Alsos, I.G.; Bellemain, E.; Brysting, A.K.; Elven, R.; Sønstebo, J.H.; Murton, J.; Sher, A.; Rasmussen, M.; Rønn, R.; Mourier, T.; Cooper, A.; Austin, J.; Möller, P.; Froese, D.; Zazula, G.; Pompanon, F.; Rioux, D.; Niderkorn, V.; Tikhonov, A.; Savvinov, G.; Roberts, R.G.; MacPhee, R.D.E.; Gilbert, M.T.P.; Kjær, K.H.; Orlando, L.; Brochmann, C.; Taberlet, P. (2014): Fifty thousand years of arctic vegetation and megafaunal diet. *Nature*, 506, S. 47 – 51
- Willerslev, E.; Hansen, A.J.; Binladen, J.; Brand, T.B.; Gilbert, M.T.P.; Shapiro, B.; Bunce, M.; Wiuf, C.; Gilichinsky, D.A.; Cooper, A. (2003): Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. *Science*, 300, S. 791 – 795

Woloszczyk, P.; Fiencke, C.; Grabellus, B.; Pfeiffer, E.-M.; Elsner, D.C. (2018): Bodenmikrobiologische Untersuchungen an 12 Boden-Dauerbeobachtungsflächen (BDF) in Schleswig-Holstein im Jahr 2017 (vorwiegend intensiv genutzte Grünland und ökologisch genutzte Ackerflächen). Universität Hamburg, Institut für Bodenkunde im Auftrag des Landesamtes für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein

Woloszczyk, P.; Fiencke, C.; Grabellus, B.; Pfeiffer, E.-M.; Elsner, D.C. (2019): Bodenmikrobiologische Untersuchungen an 12 Boden-Dauerbeobachtungsflächen (BDF) in Schleswig-Holstein im Jahr 2019 (Wald- und vorwiegend extensive Grünland- und Sonderstandorte). Universität Hamburg, Institut für Bodenkunde im Auftrag des Landesamtes für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein

Yang, J.; Zhang, X. (2020): eDNA metabarcoding in zooplankton improves the ecological status assessment of aquatic ecosystems. *Environment International*, 134, Artikel 105230

Yoccoz, N.G.; Bråthen, K.A.; Gielly, L.; Haile, J.; Edwards, M.E.; Goslar, T.; von Stedingk, H.; Brysting, A.; Coissac, E.; Pompanon, F.; Sørensen, J.H.; Miquel, C.; Valentini, A.; De Bello, F.; Chave, J.; Thuiller, W.; Wincker, P.; Cruaud, C.; Gavory, F.; Rasmussen, M.; Gilbert, M.T.P.; Orlando, L.; Brochmann, C.; Willerslev, E.; Taberlet, P. (2012): DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. *Molecular Ecology*, 21, S. 3647 – 3655

Yu, D.W.; Ji, Y.; Emerson, B.C.; Wang, X.; Ye, C.; Yang, C.; Ding, Z. (2012): Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, S. 613 – 623

Zhang, G.K.; Chain, F.J.; Abbott, C.L.; Cristescu, M.E. (2018): Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. *Evolutionary Applications*, 11, S. 1901 – 1914

Zinger, L.; Philippe, H. (2016): Coalescing molecular evolution and DNA barcoding. *Molecular Biology*, 25, S. 1908 – 1910

A Ergebnisse der drei Bestimmungsmethoden in der Hauptstudie

A.1 Morphologische Bestimmung

A.1.1 Regenwürmer

Tabelle 33: Abundanz der Regenwürmer [Ind./m²] an den beprobten Ackerstandorten

Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Aporrectodea</i> sp. sensu lato ¹	14,4	22,4	12,0	80,8	37,6	32,0	61,6	2,4
<i>Allolobophora chlorotica</i>	0,0	0,0	0,0	12,0	12,8	0,0	0,8	0,0
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	1,6	35,2	5,6	19,2	28,8	0,8	9,6	0,0
<i>Aporrectodea longa</i>	0,0	0,0	0,0	12,8	0,0	0,0	4,0	0,0
<i>Aporrectodea rosea</i>	0,0	3,2	0,0	11,2	0,0	0,0	16,0	0,8
<i>Lumbricus</i> spp.	0,0	1,6	0,0	0,0	1,6	4,0	15,2	2,4
<i>Lumbricus rubellus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0
<i>Lumbricus terrestris</i>	0,8	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	11,2	12,8
<i>Octolasion</i> spp.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Nicht bestimmbar	0,0	13,6	0,8	20,8	6,4	4,0	12,0	1,6
Tanylobe Arten	0,8	7,2	0,0	0,0	1,6	6,4	26,4	15,2
Epilobe Arten	16,0	60,8	17,6	136,0	79,2	32,8	94,4	3,2
Epigäische Adulte	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0
Endogäische Adulte	1,6	38,4	5,6	42,4	41,6	0,8	27,2	0,8
Anektische Adulte	0,8	5,6	0,0	12,8	0,0	0,0	15,2	12,8
Summe Adulte	2,4	44,0	5,6	55,2	41,6	3,2	42,4	13,6
Summe Juvenile	14,4	24,0	12,0	80,8	39,2	36,0	78,4	4,8
Gesamtabundanz	16,8	81,6	18,4	156,8	87,2	43,2	132,8	20,0
Artenzahl	2	3	1	4	3	2	6	2

¹ Nicht unterschieden zwischen Juvenilen der eng verwandten Genera *Aporrectodea* and *Allolobophora*

Tabelle 34: Biomasse der Regenwürmer [g/m²] an den beprobten Ackerstandorten

Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Aporrectodea</i> sp. sensu lato ¹	2,26	5,68	1,95	21,80	3,48	5,51	7,63	0,41
<i>Allolobophora chlorotica</i>	0,00	0,00	0,00	2,47	1,80	0,00	0,23	0,00
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	0,75	24,18	2,22	7,68	7,79	0,82	2,41	0,00
<i>Aporrectodea longa</i>	0,00	0,00	0,00	21,20	0,00	0,00	7,47	0,00
<i>Aporrectodea rosea</i>	0,00	0,66	0,00	1,53	0,00	0,00	2,53	0,08
<i>Lumbricus</i> spp.	0,00	1,02	0,00	0,00	0,20	0,94	8,28	2,44
<i>Lumbricus rubellus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
<i>Lumbricus terrestris</i>	1,75	11,11	0,00	0,00	0,00	0,00	42,07	26,83
<i>Octolasion</i> spp.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,98	0,00
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,68	0,00
Nicht bestimmbar	0,00	4,33	0,09	4,94	1,28	0,77	1,20	0,68
Tanylobe Arten	1,75	12,14	0,00	0,00	0,20	1,94	50,35	29,27
Epilobe Arten	3,02	30,53	4,18	54,68	13,07	6,34	21,93	0,49
Epigäische Adulte	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
Endogäische Adulte	0,75	24,85	2,22	11,68	9,59	0,82	5,85	0,08
Anektische Adulte	1,75	11,11	0,00	21,20	0,00	0,00	49,54	26,83
Summe Adulte	2,50	35,96	2,22	32,88	9,59	1,82	55,39	26,91
Summe Juvenile	2,26	6,70	1,95	21,80	3,68	6,45	16,89	2,85
Gesamtbiomasse	4,77	46,99	4,26	59,62	14,55	9,04	73,48	30,44

¹ Nicht unterschieden zwischen Juvenilen der eng verwandten Genera *Aporrectodea* and *Allolobophora*

Tabelle 35: Abundanz der Regenwürmer [Ind./m²] an den beprobten Grünlandstandorten

Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Aporrectodea</i> sp. sensu lato ¹	22,4	2,4	18,4	2,4	0,8	12,0	132,8	5,6
<i>Allolobophora chlorotica</i>	0,0	1,6	3,2	0,0	28,8	31,2	0,0	0,0
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	35,2	7,2	16,8	1,6	0,0	0,0	56,8	4,0
<i>Aporrectodea longa</i>	0,0	0,0	4,0	0,0	0,8	17,6	12,0	0,0
<i>Aporrectodea rosea</i>	3,2	0,0	24,8	1,6	0,0	21,6	4,0	0,0
<i>Lumbricus</i> spp.	1,6	0,0	7,2	0,8	0,8	4,0	37,6	22,4
<i>Lumbricus rubellus</i>	0,0	0,0	2,4	0,0	0,8	0,0	0,0	21,6
<i>Lumbricus terrestris</i>	5,6	0,0	0,8	3,2	0,0	8,0	9,6	0,0
<i>Octolasion cyaneum</i>	0,0	0,0	0,8	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	0,0	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Proctodrilus antipae</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
Nicht bestimmbar	13,6	1,6	14,4	0,0	0,8	12,8	43,2	4,0
Tanylobe Arten	7,2	0,0	10,4	4,0	1,6	12,0	47,2	44,0
Epilobe Arten	60,8	11,2	72,8	7,2	30,4	83,2	205,6	9,6
Epigäische Adulte	0,0	0,0	2,4	0,0	0,8	0,0	0,0	21,6
Endogäische Adulte	38,4	8,8	50,4	4,8	28,8	53,6	60,8	4,0
Anektische Adulte	5,6	0,0	4,8	3,2	0,8	25,6	21,6	0,0
Summe Adulte	44,0	8,8	57,6	8,0	30,4	79,2	82,4	25,6
Summe Juvenile	24,0	2,4	25,6	3,2	1,6	16,0	170,4	28,0
Gesamtabundanz	81,6	12,8	97,6	11,2	32,8	108,0	296,0	57,6
Artenzahl	3	2	8	4	3	5	4	2

¹ Nicht unterschieden zwischen Juvenilen der eng verwandten Genera *Aporrectodea* and *Allolobophora*

Tabelle 36: Biomasse der Regenwürmer [g/m²] an den beprobten Grünlandstandorten

Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Aporrectodea</i> sp. sensu lato ¹	5,68	0,28	2,04	0,28	0,07	2,42	33,83	1,98
<i>Allolobophora chlorotica</i>	0,00	0,35	0,78	0,00	7,98	9,74	0,00	0,00
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	24,18	3,98	6,81	0,54	0,00	0,00	21,93	4,01
<i>Aporrectodea longa</i>	0,00	0,00	6,79	0,00	1,06	26,22	20,89	0,00
<i>Aporrectodea rosea</i>	0,66	0,00	4,40	0,22	0,00	4,19	0,69	0,00
<i>Lumbricus</i> spp.	1,02	0,00	2,50	1,42	0,11	0,86	24,30	3,30
<i>Lumbricus rubellus</i>	0,00	0,00	2,16	0,00	0,71	0,00	0,00	10,41
<i>Lumbricus terrestris</i>	11,11	0,00	2,41	9,26	0,00	22,22	21,26	0,00
<i>Octolasion cyaneum</i>	0,00	0,00	1,17	1,88	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	0,00	0,00	5,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Proctodrilus antipae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00
Nicht bestimmbar	4,33	0,13	1,86	0,00	0,30	5,07	15,49	0,83
Tanylobe Arten	12,14	0,00	7,07	10,67	0,82	23,08	45,57	13,71
Epilobe Arten	30,53	4,61	27,86	2,93	9,10	42,64	77,34	5,99
Epigäische Adulte	0,00	0,00	2,16	0,00	0,71	0,00	0,00	10,41
Endogäische Adulte	24,85	4,33	19,03	2,65	7,98	14,00	22,62	4,01
Anektische Adulte	11,11	0,00	9,20	9,26	1,06	48,43	42,15	0,00
Summe Adulte	35,96	4,33	30,39	11,90	9,74	62,43	64,77	14,42
Summe Juvenile	6,70	0,28	4,54	1,70	0,18	3,29	58,14	5,28
Gesamtbiomasse	46,99	4,74	36,79	13,60	10,22	70,79	138,39	20,54

¹ Nicht unterschieden zwischen Juvenilen der eng verwandten Genera *Aporrectodea* and *Allolobophora*

Tabelle 37: Abundanz der Regenwürmer [Ind./m²] an den beprobten Waldstandorten

Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Aporrectodea</i> sp. sensu lato ¹	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,2	12,0	8,8	0,0
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	8,0	14,4	0,0
<i>Aporrectodea rosea</i>	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4	0,0
<i>Dendrobaena</i> spp.	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0
<i>Dendrobaena attemsi</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2
<i>Dendrobaena octaedra</i>	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lumbricus</i> spp.	0,0	0,0	2,4	2,4	0,0	1,6	8,8	3,2	0,0
<i>Lumbricus castaneus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0
<i>Lumbricus rubellus</i>	0,0	0,0	4,0	7,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lumbricus terrestris</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0
<i>Octolasion</i> spp.	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
<i>Octolasion cyaneum</i>	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Nicht bestimmbar	1,6	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,8	2,4	0,0
Tanylobe Arten	0,0	0,0	6,4	9,6	0,0	2,4	11,2	4,0	0,0
Epilobe Arten	14,4	1,6	0,0	4,0	0,0	12,8	20,0	31,2	23,2
Epigäische Adulte	0,0	1,6	4,0	10,4	0,0	0,0	2,4	0,0	3,2
Endogäische Adulte	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	8,0	21,6	0,0
Anektische Adulte	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0
Summe Adulte	8,0	1,6	4,0	10,4	0,0	2,4	10,4	22,4	3,2
Summe Juvenile	6,4	0,0	2,4	3,2	0,0	12,8	20,8	12,8	20,0
Gesamtabundanz	16,0	1,6	6,4	16,8	0,0	15,2	32,0	37,6	23,2
Artenzahl	3	1	1	2	0	2	2	4	1

¹ Nicht unterschieden zwischen Juvenilen der eng verwandten Genera *Aporrectodea* and *Allolobophora*

Tabelle 38: Biomasse der Regenwürmer [g/m²] an den beprobten Waldstandorten

Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Aporrectodea</i> sp. sensu lato ¹	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26	1,09	0,86	0,00
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	3,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	4,13	4,70	0,00
<i>Aporrectodea rosea</i>	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94	0,00
<i>Dendrobaena</i> spp.	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67
<i>Dendrobaena attemsi</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
<i>Dendrobaena octaedra</i>	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	0,00	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Lumbricus</i> spp.	0,00	0,00	0,53	0,50	0,00	0,77	3,10	0,42	0,00
<i>Lumbricus castaneus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,21	0,00	0,00
<i>Lumbricus rubellus</i>	0,00	0,00	1,67	7,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Lumbricus terrestris</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,47	0,00	1,70	0,00
<i>Octolasion</i> spp.	1,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00
<i>Octolasion cyaneum</i>	4,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33	0,00
Nicht bestimmbar	0,62	0,00	0,00	0,68	0,00	0,00	0,06	0,34	0,00
Tanylobe Arten	0,00	0,00	2,20	8,10	0,00	2,24	4,30	2,13	0,00
Epilobe Arten	10,82	0,44	0,00	0,45	0,00	1,73	5,22	8,14	0,80
Epigäische Adulte	0,00	0,44	1,67	8,00	0,00	0,00	1,21	0,00	0,13
Endogäische Adulte	8,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	4,13	6,97	0,00
Anektische Adulte	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,47	0,00	1,70	0,00
Summe Adulte	8,56	0,44	1,67	8,00	0,00	1,94	5,34	8,67	0,13
Summe Juvenile	2,26	0,00	0,53	0,54	0,00	2,03	4,18	1,59	0,67
Gesamtbiomasse	11,43	0,44	2,20	9,22	0,00	3,97	9,58	10,60	0,80

¹ Nicht unterschieden zwischen Juvenilen der eng verwandten Genera *Aporrectodea* and *Allolobophora*

A.1.2 Enchytraeiden

Arten mit Buchstabencodes [z. B. *Achaeta* sp. (HEAL)] sind neue Arten, morphologisch und z. T. auch genetisch charakterisiert, aber noch nicht gültig im Sinne zoologischer Nomenklatur beschrieben.

Tabelle 39: Abundanz der Enchytraeiden [Ind./m²] an den beprobten Ackerstandorten

Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Achaeta affinis</i>	0	0	407	0	0	0	0	0
<i>Achaeta camerani</i>	0	0	357	0	0	0	0	0
<i>Achaeta diddeni</i>	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Achaeta pannonica</i>	0	0	0	0	0	1070	0	0
<i>Achaeta</i> sp. (HEAL)	509	0	0	0	0	0	0	0
<i>Achaeta</i> sp. indet.	0	0	0	0	0	458	0	51
<i>Buchholzia appendiculata</i>	51	0	0	0	0	8098	0	0
<i>Buchholzia</i> sp. (PAPP)	0	0	0	815	0	0	0	0
<i>Cernosvitoviella</i> sp. indet.	0	51	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	764	764	2648	204	1935	1223	3209	2343
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	0	0	102	0	102	0	51	0
<i>Enchytraeus dichaeetus</i>	1986	0	6366	0	153	3158	0	0
<i>Enchytraeus lacteus</i>	0	0	0	0	0	0	306	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (BUCL)	0	0	0	102	0	0	0	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (GRAN)	0	815	1477	102	0	0	0	0
<i>Enchytronia christenseni</i>	204	102	1222	0	306	1070	102	0
<i>Enchytronia holochaeta</i>	153	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	357	0	306	0	0	5348	0	0
<i>Enchytronia pratensis</i>	0	0	0	0	0	8251	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i>	153	0	0	0	153	0	0	0
<i>Fridericia bulboides</i>	153	255	13344	0	560	1986	51	306
<i>Fridericia christeri</i>	0	866	458	458	560	611	407	51
<i>Fridericia connata</i>	0	0	0	0	204	0	0	0
<i>Fridericia cusanica</i>	0	0	1986	0	0	0	0	0
<i>Fridericia cylindrica</i>	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Fridericia deformis</i>	0	0	0	0	0	0	764	0
<i>Fridericia galba</i>	0	306	0	255	1120	0	1120	0
<i>Fridericia isseli</i>	0	51	0	255	0	0	611	0

Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Fridericia lenta</i>	306	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia nix</i>	0	0	0	0	51	0	0	0
<i>Fridericia paroniana</i>	51	0	0	0	0	0	255	0
<i>Fridericia ratzeli</i>	0	0	0	0	0	0	2037	0
<i>Fridericia schmelzi</i>	0	0	0	0	611	0	0	0
<i>Fridericia singula</i>	0	0	0	0	0	0	255	0
<i>Fridericia sylvatica</i>	0	0	0	0	611	5704	0	204
<i>Fridericia</i> sp. (2TRO)	0	0	0	0	0	0	2394	0
<i>Fridericia</i> sp. (GLIF)	0	0	0	764	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (LIS1)	0	0	0	51	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (LNIX)	0	0	0	306	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (NTRO)	0	0	0	0	0	0	509	0
<i>Fridericia</i> sp. indet.	560	357	1070	713	1732	102	9880	458
<i>Henlea perpusilla</i>	815	255	2190	0	1019	713	102	0
<i>Henlea ventriculosa</i>	51	0	2037	0	51	0	0	51
<i>Marionina argentea</i>	509	0	0	0	0	0	0	0
<i>Marionina communis</i>	560	0	0	0	0	407	51	0
<i>Marionina mendax</i>	0	306	0	968	0	0	815	0
Enchytraeidae sp. indet.	0	51	0	0	0	0	0	0
<i>Rhyacodrilus falciformis</i> *	0	0	0	102	0	0	0	0
Gesamtabundanz	7181	4176	34072	5093	9167	38197	22918	3463
Artenzahl	15	10	14	11	14	12	17	6

* Keine Enchytraeide; andere Mikroanneliden sind als faunistische Nachweise mit aufgeführt, wurden jedoch nicht in den Methodenvergleich einbezogen

Tabelle 40: Abundanz der Enchytraeiden [Ind./m²] an den beprobten Grünlandstandorten

Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Achaeta affinis</i>	0	0	0	1986	0	0	0	0
<i>Achaeta bohemica</i>	0	0	0	204	0	0	0	0
<i>Achaeta danica</i>	0	0	0	407	0	0	0	0
<i>Achaeta pannonica</i>	0	153	0	0	0	0	0	0
<i>Achaeta urbana</i>	0	1375	0	0	0	0	0	0
<i>Buchholzia appendiculata</i>	0	1884	560	2801	0	0	6468	102
<i>Buchholzia fallax</i>	0	0	0	0	0	153	0	0
<i>Cernosvitoviella</i> sp. indet.	0	0	0	51	0	0	0	0
<i>Cognettia chlorophila</i>	0	0	0	407	0	0	0	7079
<i>Cognettia varisetosa</i>	0	0	0	357	0	0	0	6315
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	23988	9065	153	815	1273	1120	9677	1171
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	0	18691	0	0	0	357	0	0
<i>Enchytraeus christenseni</i>	0	0	0	204	0	0	0	0
<i>Enchytraeus dichaeus</i>	51	0	0	0	968	0	1579	0
<i>Enchytraeus lacteus</i>	2343	0	306	153	0	51	255	0
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	0	0	0	153	0	0	0	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (NPAU)	0	0	0	0	2241	0	0	0
<i>Enchytronia christenseni</i>	0	866	102	255	0	1732	0	0
<i>Enchytronia holochaeta</i>	0	0	0	560	0	0	0	0
<i>Enchytronia minor</i>	0	0	0	509	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	0	0	0	4482	0	0	0	0
<i>Enchytronia</i> sp. (2GAL)	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia</i> sp. (OMNI)	0	0	0	51	0	0	0	0
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	0	0	0	1935	0	0	0	0
<i>Enchytronia</i> sp. (ZETA)	0	0	0	153	0	0	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i>	0	255	6977	153	0	0	509	0
<i>Fridericia bulboides</i>	1528	0	0	0	3616	102	306	458
<i>Fridericia christeri</i>	5653	102	1426	0	0	662	764	0
<i>Fridericia connata</i>	0	102	204	917	0	0	255	0
<i>Fridericia cylindrica</i>	0	0	0	0	0	0	0	764
<i>Fridericia deformis</i>	0	0	0	0	0	0	102	0
<i>Fridericia dura</i>	0	306	0	0	3005	0	0	509

Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Fridericia galba</i>	2699	0	204	255	0	0	1019	0
<i>Fridericia hegemon</i>	1935	1477	51	0	0	51	0	0
<i>Fridericia isseli</i>	0	0	51	0	0	713	0	0
<i>Fridericia lenta</i>	0	0	662	0	0	0	2139	0
<i>Fridericia maculata</i>	0	0	0	0	0	0	1426	0
<i>Fridericia maculatiformis</i>	0	10797	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia nix</i>	0	0	0	0	0	0	153	0
<i>Fridericia paroniana</i>	204	407	51	0	0	0	611	0
<i>Fridericia perrieri</i>	0	0	0	0	0	0	306	0
<i>Fridericia ratzeli</i>	51	1324	0	51	0	0	102	153
<i>Fridericia regularis</i>	0	9829	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia schmelzi</i>	0	0	0	0	0	0	611	0
<i>Fridericia sylvatica</i>	0	0	764	0	0	0	0	0
<i>Fridericia ulrikae</i>	0	0	0	764	0	0	0	0
<i>Fridericia waldenstroemi</i>	0	0	102	0	0	0	0	0
<i>Fridericia sp. (2TRO)</i>	0	0	357	0	0	0	0	0
<i>Fridericia sp. (BMIN)</i>	0	764	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia sp. (DOZZ)</i>	0	0	0	0	0	102	0	0
<i>Fridericia sp. (MACF)</i>	153	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia sp. (OBRU)</i>	0	51	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia sp. indet.</i>	8251	34072	2699	1019	0	1375	4991	102
<i>Hemifridericia parva</i>	0	0	0	0	0	0	255	0
<i>Henlea nasuta</i>	0	153	0	0	0	0	0	0
<i>Henlea perpusilla</i>	0	0	1681	306	7996	0	458	866
<i>Henlea ventriculosa</i>	1120	2801	0	0	22002	0	51	255
<i>Marionina argentea</i>	0	0	0	0	866	0	0	0
<i>Marionina brendae</i>	0	0	0	0	0	51	0	0
<i>Marionina communis</i>	0	0	255	0	0	0	1783	51
<i>Marionina deminuta</i>	0	0	0	407	0	0	560	0
<i>Marionina mendax</i>	0	0	51	306	0	0	153	0
<i>Marionina sp. (DEMI)</i>	0	0	0	0	0	306	0	0
<i>Oconnorella tubifera</i>	0	0	0	204	0	0	0	0
<i>Stercutus niveus</i>	0	0	51	1681	0	0	0	0

Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
Enchytraeidae gen. sp. (ALM1)	51	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hrabeiella periglandulata</i> *	0	0	0	662	0	0	0	0
Gesamtabundanz	48027	94474	16756	22205	41966	6774	34530	17825
Artenzahl	11	19	20	28	8	12	23	11

* Keine Enchytraeide; andere Mikroanneliden sind als faunistische Nachweise mit aufgeführt, wurden jedoch nicht in den Methodenvergleich einbezogen

Tabelle 41: Abundanz der Enchytraeiden [Ind./m²] an den beprobten Waldstandorten

Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Achaeta aberrans</i>	0	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Achaeta abulba</i>	0	662	0	0	0	0	0	0	7690
<i>Achaeta affinis</i>	8098	18080	10695	204	1884	49402	458	45429	0
<i>Achaeta camerani</i>	0	0	1884	815	1783	0	0	0	1120
<i>Achaeta danica</i>	0	0	102	0	0	0	0	0	0
<i>Achaeta</i> sp. (DZWI)	0	0	0	0	0	0	204	0	0
<i>Achaeta</i> sp. (PAFU)	0	0	0	4023	0	0	0	0	0
<i>Achaeta</i> sp. indet.	255	0	0	0	0	0	0	0	51
<i>Buchholzia appendiculata</i>	2445	4227	0	0	0	255	5144	2037	102
<i>Cernosvitoviella</i> cf. <i>minor</i>	51	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cognettia chlorophila</i>	2852	36771	7945	16807	8811	1935	0	0	3922
<i>Cognettia cognettii</i>	0	6366	51	0	0	0	0	0	357
<i>Cognettia sphagnetorum</i>	0	2903	0	3310	0	0	0	0	0
<i>Cognettia varisetosa</i>	0	1783	0	0	0	255	0	0	0
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	1120	7079	0	611	509	51	408	2190	0
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	1681	1375	0	0	407	662	0	0	51
<i>Enchytraeus</i> sp. (GRAN)	713	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia holochaeta</i>	51	0	0	0	0	0	51	0	0
<i>Enchytronia minor</i>	0	0	0	0	0	0	51	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	2343	6570	102	0	153	1783	713	1783	204
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	407	102	0	0	102	866	0	102	204
<i>Enchytronia</i> sp. (TRIN)	255	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia benti</i>	407	1477	0	1070	0	0	0	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i>	662	0	0	0	0	51	509	51	0
<i>Fridericia connata</i>	1070	0	0	0	0	662	0	662	0

Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Fridericia cylindrica</i>	0	0	0	0	0	0	0	255	0
<i>Fridericia dura</i>	0	0	0	0	0	51	1070	204	0
<i>Fridericia galba</i>	0	0	0	0	0	0	0	407	0
<i>Fridericia paroniana</i>	0	0	0	0	0	0	815	153	0
<i>Fridericia perrieri</i>	255	0	0	0	0	0	0	102	0
<i>Fridericia ratzeli</i>	0	0	0	0	0	0	0	51	0
<i>Fridericia striata</i>	306	662	0	611	0	51	0	0	204
<i>Fridericia sylvatica</i>	3310	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (BISY)	102	0	0	0	0	0	0	306	0
<i>Fridericia</i> sp. indet.	1579	0	0	0	51	102	51	509	0
<i>Henlea perpusilla</i>	0	0	0	0	0	0	0	51	0
<i>Marionina clavata</i>	0	51	1783	5449	713	51	0	0	0
<i>Marionina mendax</i>	51	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Marionina simillima</i>	255	51	0	0	0	0	0	51	0
<i>Mesenchytraeus armatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	204
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>	0	51	0	0	0	0	0	0	357
<i>Mesenchytraeus</i> sp. indet.	51	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oconnorella cambrensis</i>	51	10542	1935	5348	6926	6162	0	0	1935
<i>Oconnorella tubifera</i>	1833	0	0	0	0	1426	153	0	0
<i>Stercutus niveus</i>	51	51	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hrabeiella periglandulata</i> *	3973	815	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aelosoma</i> gen. sp. *	0	0	0	51	0	0	0	0	0
Gesamtabundanz	34225	99618	24497	38350	21339	63764	9626	54342	16399
Artenzahl	24	18	8	11	10	15	11	16	12

* Keine Enchytraeide; andere Mikroanneliden sind als faunistische Nachweise mit aufgeführt, wurden jedoch nicht in den Methodenvergleich einbezogen

A.1.3 Collembolen

Tabelle 42: Abundanz der Collembolen [Ind./m²] an den beprobten Ackerstandorten

Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Brachystomella parvula</i>	0	0	102	0	0	713	0	0
<i>Deuterostminthurus</i> juv.	0	0	0	0	51	0	560	0
<i>Entomobrya albocincta</i>	0	0	0	0	0	51	0	0
<i>Folsomia</i> c.f. <i>candida</i>	0	0	0	0	0	0	0	306
<i>Folsomia quadrioculata</i>	0	1324	0	0	0	0	1732	0
<i>Folsomia</i> c.f. <i>sensibilis</i>	102	0	0	0	0	0	0	0
<i>Folsomia inoculata</i>	0	0	0	51	0	0	51	0
<i>Friesea</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	153
<i>Friesea ladeiroi</i>	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Friesea truncata</i>	0	0	0	0	0	0	51	0
<i>Hemisotoma thermophila</i>	0	0	357	0	153	11765	0	0
<i>Heteromurus nitidus</i>	0	153	0	0	0	0	0	0
<i>Hypogastrura</i> c.f. <i>papillata</i>	0	0	0	0	0	5602	0	0
<i>Hypogastrura</i> sp.	0	0	0	0	0	509	0	0
<i>Isotoma anglicana</i>	0	0	0	0	0	153	0	0
<i>Isotoma</i> juv.	0	0	0	51	0	153	0	0
<i>Isotomiella minor</i>	0	102	0	0	0	0	560	51
<i>Isotomodes productus</i>	0	0	0	0	0	102	0	0
<i>Isotomodes</i> sp.	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Isotomurus</i> juv.	0	0	0	204	0	0	51	0
<i>Lepidocyrtus</i> c.f. <i>violaceus</i>	0	0	0	102	0	0	0	0
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	0	255	0	0	51	0	713	0
<i>Lepidocyrtus</i> juv.	0	0	0	255	0	0	0	204
<i>Megalothorax minimus</i>	0	102	0	0	0	0	0	0
<i>Mesaphorura</i> c.f. <i>critica</i>	0	0	0	0	0	458	0	0
<i>Mesaphorura krausbaueri</i>	0	2750	0	0	0	0	0	0
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	0	204	0	0	0	357	51	0
<i>Mesaphorura</i> sp.	51	509	255	51	153	3718	204	255
<i>Mesaphorura</i> c.f. <i>yosii</i>	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Paratullbergia callipygus</i>	0	51	0	0	0	0	0	0
<i>Paratullbergia</i> juv.	0	0	0	51	0	0	0	0
<i>Parisotoma notabilis</i>	51	306	51	458	204	0	1375	153

Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Proisotoma minuta</i>	0	51	0	0	0	0	0	0
<i>Proisotoma</i> sp.	0	0	153	0	51	0	0	0
<i>Protaphorura armata</i>	0	866	0	0	0	0	102	0
<i>Protaphorura</i> sp.	51	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudachorutes</i> sp.	0	0	0	0	0	204	0	0
<i>Pseudanurophorus quadrioculatus</i>	0	0	0	51	0	0	0	0
<i>Pseudosinella</i> 0+0 ocelli	0	0	0	153	0	0	51	0
<i>Pseudosinella</i> 4+4 ocelli	0	0	0	0	0	0	0	51
<i>Pseudosinella alba</i>	0	0	0	407	0	0	0	560
<i>Sminthurinus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	102	0
<i>Sphaeridia pumilis</i>	0	0	0	0	0	407	0	0
<i>Stenaphorura denisi</i>	102	51	0	0	0	0	255	0
<i>Stenaphorura quadrispina</i>	509	153	0	0	0	0	102	0
<i>Stenaphorura</i> sp.	0	0	0	0	0	0	255	0
<i>Willemia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	51
Gesamtabundanz	866	6875	1070	1833	662	24192	6213	1783
Artenzahl	6	13	7	10	6	10	14	9

Tabelle 43: Abundanz der Collembolen [Ind./m²] an den beprobten Grünlandstandorten

Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Arrhopalites caecus</i>	0	0	0	0	0	51	0	0
<i>Bourletiella</i> sp.	866	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ceratophysella gibbosa</i>	0	0	0	51	0	0	0	0
<i>Ceratophysella</i> sp.	0	0	0	51	0	0	0	0
<i>Cryptopygus bipunctatus</i>	0	4991	0	0	0	407	0	0
<i>Desoria</i> c.f. <i>hiemalis</i>	0	0	1070	0	0	0	0	0
<i>Desoria</i> c.f. <i>violacea</i>	0	0	407	0	0	0	0	0
<i>Desoria</i> sp. (<i>violacea/hiemalis</i>)	0	0	0	917	0	0	0	0
<i>Dicyrtomina</i> c.f. <i>ornata</i>	0	0	0	0	0	51	0	0
<i>Dicyrtomina fusca</i>	0	0	0	0	0	51	0	0
<i>Dicyrtomina minuta</i>	0	0	0	0	0	102	0	0
<i>Entomobrya</i> juv.	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Folsomia</i> c.f. <i>candida</i>	0	0	0	0	0	0	102	0
<i>Folsomia quadrioculata</i>	0	0	255	1477	0	0	0	0
<i>Folsomia inoculata</i>	0	0	0	0	0	0	153	0
<i>Friesea</i> sp.	0	0	0	0	0	0	51	0
<i>Friesea truncata</i>	0	0	0	611	0	0	306	0
<i>Hemisotoma thermophila</i>	3259	0	0	0	0	0	153	6570
<i>Hypogastrura</i> c.f. <i>papillata</i>	0	0	0	0	0	0	0	153
<i>Isotoma anglicana</i>	1630	0	2139	0	407	0	0	204
<i>Isotoma</i> juv.	3056	0	1324	0	0	0	713	1120
<i>Isotomiella minor</i>	0	0	0	1070	51	815	204	0
<i>Isotomodes productus</i>	51	968	0	0	0	0	0	0
<i>Lepidocyrtus</i> c.f. <i>violaceus</i>	0	0	0	0	0	0	102	0
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	255	0	0	204	0	0	204	357
<i>Lepidocyrtus</i> juv.	2801	51	2546	51	0	0	0	51
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>	0	0	0	764	0	0	0	0
<i>Megalothorax minimus</i>	0	0	0	102	0	0	0	0
<i>Mesaphorura critica</i>	0	0	0	153	0	0	0	0
<i>Mesaphorura isochaeta</i>	51	51	0	0	51	0	0	0
<i>Mesaphorura jirii/hylophila</i>	0	0	0	306	0	0	0	0
<i>Mesaphorura krausbaueri</i>	0	0	0	153	153	0	0	0
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	0	204	0	815	153	0	0	0

Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Mesaphorura tenuisensillata</i>	0	0	0	153	0	0	0	0
<i>Mesaphorura</i> sp.	51	2699	153	1171	3871	458	306	51
<i>Metaphorura affinis</i>	0	0	1528	1477	0	0	0	0
<i>Paratullbergia callipygus</i>	0	0	51	51	0	0	0	0
<i>Parisotoma notabilis</i>	12631	866	2648	1070	0	2088	102	51
<i>Proisotoma minuta</i>	0	0	0	51	0	0	0	0
<i>Protaphorura armata</i>	0	0	0	1324	0	0	0	0
<i>Protaphorura tricampata</i>	0	0	0	1273	0	0	0	0
<i>Protaphorura</i> sp.	0	51	407	102	407	0	0	0
<i>Pseudachorutes</i> sp.	0	0	0	0	51	0	0	102
<i>Pseudachorutella asigillata</i>	0	611	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudosinella</i> 0+0 ocelli	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Pseudosinella alba</i>	0	0	0	0	0	1681	0	0
<i>Pseudosinella octopunctata</i>	0	0	0	0	0	51	0	0
<i>Sminthurides signatus</i>	0	0	0	0	102	0	0	0
<i>Sminthurinus</i> sp.	0	0	102	0	0	102	0	0
<i>Sphaeridia pumilis</i>	1783	255	0	0	0	0	0	153
<i>Stenaphorura denisi</i>	0	0	0	153	0	0	0	0
<i>Stenaphorura quadrispina</i>	1120	0	0	51	0	0	102	0
<i>Stenaphorura</i> sp.	0	51	0	0	0	0	51	0
<i>Stenacidia violacea</i>	0	153	0	0	0	0	0	0
<i>Supraphorura furcifera</i>	0	0	0	102	0	0	0	0
<i>Willemia</i> sp.	0	0	0	0	0	102	0	0
Isotomidae sp.	0	0	0	51	0	0	0	0
Gesamtabundanz	27553	10950	12732	13751	5246	5959	2546	8811
Artenzahl	9	11	13	22	8	11	11	8

Tabelle 44: Abundanz der Collembolen [Ind./m²] an den beprobten Waldstandorten

Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Arrhopalites caecus</i>	0	0	0	153	51	51	0	0	51
<i>Arrhopalites pygmaeus</i>	0	0	0	357	204	0	0	0	306
<i>Arrhopalites</i> sp.	51	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ceratophysella denticulata</i>	102	7996	0	611	713	153	0	0	0
<i>Ceratophysella</i> juv.	662	509	0	407	0	0	0	0	0
<i>Ceratophysella armata</i>	0	1019	0	0	0	0	0	0	0
<i>Desoria</i> juv.	0	0	51	0	0	0	0	0	0
<i>Deuteraphorura silvaria</i>	0	0	0	0	0	357	0	0	0
<i>Dicyrtomina</i> c.f. <i>ornata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	51
<i>Dicyrtomina</i> juv.	0	0	0	0	0	0	0	0	153
<i>Dicyrtomina</i> sp.	0	0	0	0	0	51	0	0	0
<i>Entomobrya</i> juv.	0	0	102	0	0	0	153	0	0
<i>Folsomia quadrioculata</i>	6977	968	16247	3361	8251	357	5602	1935	4074
<i>Folsomia inoculata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	11255
<i>Friesea</i> sp.	0	0	153	0	255	0	0	0	0
<i>Friesea truncata</i>	0	0	0	102	153	0	0	0	1783
<i>Hemisotoma thermophila</i>	0	51	0	0	0	0	0	0	0
<i>Isotoma anglicana</i>	0	0	306	0	1630	0	0	0	0
<i>Isotoma</i> juv.	0	0	713	0	0	0	0	0	0
<i>Isotomiella minor</i>	306	3514	1070	18335	662	357	1222	0	2445
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	0	0	0	0	0	51	51	0	0
<i>Lepidocyrtus</i> c.f. <i>lignorum</i>	0	0	0	0	0	509	51	0	0
<i>Lepidocyrtus</i> juv.	662	0	968	0	1171	204	0	357	1120
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>	0	0	0	0	0	2343	0	0	0
<i>Lipothrix lubbocki</i>	204	0	51	0	0	0	51	0	0
<i>Mesaphorura</i> c.f. <i>critica</i>	0	51	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mesaphorura isochaeta</i>	0	102	0	713	0	0	0	0	0
<i>Mesaphorura italica</i>	0	0	0	0	0	51	0	0	0
<i>Mesaphorura jirii/hylophila</i>	0	0	0	0	0	357	0	0	0
<i>Mesaphorura krausbaueri</i>	0	0	0	0	0	153	0	0	0
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	306	255	0	0	1120	713	0	0	153
<i>Mesaphorura</i> sp.	0	2496	2343	3107	1477	968	1375	1019	2597
<i>Mesaphorura tenuisensillata</i>	0	51	204	0	0	357	0	0	0

Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Metaphorura affinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	102	0
<i>Neanura c.f. muscorum</i>	0	0	51	51	102	0	0	0	0
<i>Odontella sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	713
<i>Paratullbergia callipygus</i>	0	0	0	0	0	509	0	306	0
<i>Paratullbergia juv.</i>	0	0	204	0	0	0	102	153	0
<i>Parisotoma notabilis</i>	1528	6774	1222	1986	815	204	306	1222	1630
<i>Proisotoma minima</i>	0	306	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protaphorura armata</i>	0	2597	0	51	306	407	0	0	357
<i>Protaphorura sp.</i>	0	968	357	1783	0	0	0	204	3973
<i>Protaphorura subarmata</i>	0	102	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protaphorura tricampata</i>	0	0	0	0	102	0	0	0	0
<i>Pseudachorutes sp.</i>	0	0	0	51	0	0	0	0	0
<i>Pseudanurophorus binocularis</i>	0	0	0	0	51	0	0	0	0
<i>Pseudosinella 0+0 ocelli</i>	0	0	0	458	0	0	0	153	0
<i>Pseudosinella alba</i>	51	509	662	458	0	458	509	3973	153
<i>Pseudosinella octopunctata</i>	0	0	255	0	0	0	0	0	0
<i>Schaeferia willemi</i>	0	0	0	0	0	509	0	0	255
<i>Schoettella ununguilata</i>	0	0	407	0	0	0	0	0	0
<i>Sminthurinus aureus</i>	0	0	0	102	102	0	0	51	0
<i>Sminthurinus sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	153	0
<i>Sphaeridia pumilis</i>	0	0	0	611	0	0	0	0	0
<i>Stenaphorura quadrispina</i>	0	0	0	0	0	51	0	0	0
<i>Supraphorura furcifera</i>	0	153	2750	4278	0	1833	0	0	51
<i>Symphyleona juv.</i>	0	0	0	0	0	51	0	0	0
<i>Tomocerus minor</i>	0	0	0	102	0	0	0	0	51
<i>Willemia sp.</i>	0	509	1120	51	0	0	0	0	5959
<i>Xenyllodes armatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3412
Gesamtabundanz	10848	28928	29234	37128	17163	11052	9422	9626	40540
Artenzahl	9	16	18	18	15	22	10	10	18

A.2 Bestimmung mittels comDNA-Metabarcoding

A.2.1 Regenwürmer

Tabelle 45: Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Ackerstandorten

ASV/Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Allolobophora chlorotica</i>	0	0	0	676	9194	0	0	0
<i>Allolobophora chlorotica</i> L4	0	0	0	2301	0	0	97	0
<i>Allolobophora chlorotica</i> L5	0	0	0	0	0	0	33	0
<i>Aporrectodea</i> sp.	0	0	0	0	0	0	13893	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	27987	70244	42047	18777	28158	47112	1423	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i> L1	0	0	0	0	907	0	987	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i> L2	0	1165	0	2110	0	0	0	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i> L3	2679	0	0	445	14653	0	0	0
<i>Aporrectodea icterica</i>	0	0	0	7614	0	0	0	0
<i>Aporrectodea longa</i>	0	0	0	5830	0	0	6154	0
<i>Aporrectodea rosea</i>	0	0	0	0	0	0	259	185
<i>Aporrectodea rosea</i> L4	0	3038	0	10324	0	0	5484	22603
<i>Lumbricus castaneus</i>	0	0	0	0	0	0	309	0
<i>Lumbricus rubellus</i>	0	0	0	0	0	12167	0	0
<i>Lumbricus terrestris</i>	5456	12119	0	0	1441	0	5365	19146
<i>Octolasion cyaneum</i>	0	0	0	0	0	0	0	13281
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	0	0	0	0	0	0	375	0
Lumbricidae sp.	0	0	0	0	0	1762	0	0
Anzahl ASV/Taxa	3	4	1	8	5	3	11	4

Tabelle 46: Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Grünlandstandorten

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Allolobophora chlorotica</i>	1209	740	0	0	29938	8363	0	0
<i>Allolobophora chlorotica</i> L1	0	0	758	0	0	0	0	0
<i>Allolobophora chlorotica</i> L2	0	20390	0	0	0	2586	0	0
<i>Allolobophora chlorotica</i> L3	0	0	0	0	18204	0	0	0
<i>Aporrectodea</i> sp.	2708	201	12221	14126	0	584	3774	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	7684	43324	6457	32413	2965	6	25130	36982
<i>Aporrectodea caliginosa</i> L2	278	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i> L3	1362	0	3418	0	0	0	1400	0
<i>Aporrectodea longa</i>	5812	17	4399	0	0	14583	11714	0
<i>Aporrectodea rosea</i>	760	0	4183	6640	0	11419	0	0
<i>Aporrectodea rosea</i> L4	6287	0	6437	5237	0	1903	2761	0
<i>Dendrobaena attemsi</i>	0	0	0	0	0	4	0	0
<i>Lumbricus castaneus</i>	0	0	27	0	0	0	0	0
<i>Lumbricus rubellus</i>	304	0	2459	0	0	0	462	19247
<i>Lumbricus rubellus</i> L2	0	0	0	0	2554	0	0	0
<i>Lumbricus terrestris</i>	3684	0	2984	13341	0	14401	8846	0
<i>Octolasion</i> sp.	0	0	376	0	0	0	0	0
<i>Octolasion cyaneum</i>	1203	0	638	17841	0	0	0	0
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	0	0	51	0	0	0	63	0
<i>Proctodrilus tuberculatus</i>	0	0	0	0	0	18	0	0
Anzahl ASV/Taxa	11	5	13	6	4	10	8	2

Tabelle 47: Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Waldstandorten

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Allolobophora chlorotica</i>	0	0	0	0	0	0	3030	0	0
<i>Aporrectodea</i> sp.	11685	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	12558	0	0	0	0	43727	14581	27299	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i> L2	0	0	0	0	0	0	6703	0	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i> L3	6988	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aporrectodea rosea</i>	0	0	0	0	0	2214	0	0	0
<i>Aporrectodea rosea</i> L4	8878	0	0	0	0	0	0	11848	0
<i>Dendrobaena attemsi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	63404
<i>Dendrobaena octaedra</i>	0	0	0	7278	0	0	0	0	0
<i>Dendrodrilus</i> sp.	0	906	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	0	50737	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lumbricus castaneus</i>	0	0	0	0	0	0	7876	0	0
<i>Lumbricus rubellus</i>	0	0	0	29854	0	0	3501	1611	0
<i>Lumbricus rubellus</i> L1	0	0	74145	0	0	0	0	0	0
<i>Lumbricus terrestris</i>	0	0	0	0	0	33447	6190	2107	0
<i>Octolasion cyaneum</i>	7794	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	0	0	0	0	0	0	0	590	0
Lumbricidae sp.	0	212	0	0	0	0	0	1244	0
Anzahl ASV/Taxa	5	3	1	2	0	3	6	6	1

A.2.2 Enchytraeiden

Tabelle 48: Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Ackerstandorten

ASV/Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Achaeta affinis</i>	0	0	442	0	0	0	0	16
<i>Achaeta camerani</i>	0	0	327	0	0	0	0	0
<i>Achaeta iberica</i>	0	0	0	0	0	468	0	51
<i>Achaeta</i> sp. (HEAL)	1794	0	0	0	0	0	0	0
<i>Buchholzia appendiculata</i>	0	0	0	0	0	3271	0	0
<i>Buchholzia</i> sp. (PAPP)	0	0	0	16609	0	0	0	0
<i>Buchholzia</i> sp. (BNBN)	985	0	0	0	0	22217	0	0
<i>Cognettia chlorophila</i>	0	0	9	0	0	0	0	0
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	1140	2596	371	663	3135	366	777	11407
<i>Enchytraeus buchholzi</i> L1	0	0	39	0	0	353	0	0
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	0	208	0	0	2557	0	308	6777
<i>Enchytraeus dichaeetus</i>	3570	0	2794	0	252	3539	0	0
<i>Enchytraeus lacteus</i>	0	0	903	0	0	0	2112	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (NICO)	0	0	0	2718	0	0	0	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (NPAU)	0	0	0	0	0	0	579	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (SPEF)	0	0	0	0	0	0	42	0
<i>Enchytronia christenseni</i>	413	9	459	0	1215	848	149	0
<i>Enchytronia holochaeta</i>	451	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	0	0	52	0	0	1882	0	0
<i>Enchytronia parva</i> L1	0	149	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i> L3	492	0	0	0	0	274	0	0
<i>Enchytronia pratensis</i>	0	0	0	0	0	10941	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i>	0	0	21	0	3127	0	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i> L1	11885	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia bulboides</i>	2867	3446	13620	0	5135	9777	53	14207
<i>Fridericia christeri</i>	0	1389	805	0	638	1111	0	3534
<i>Fridericia christeri</i> L1	255	5496	5	467	951	2480	0	494
<i>Fridericia christeri</i> L2	0	1119	0	3578	755	0	985	6775
<i>Fridericia connata</i>	0	0	0	0	42	0	0	0
<i>Fridericia connata</i> L2	0	0	0	0	2948	0	0	0

ASV/Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Fridericia cusanica</i>	0	0	7341	0	0	0	0	0
<i>Fridericia cylindrica</i>	0	0	247	0	0	0	0	0
<i>Fridericia deformis</i>	0	0	0	0	0	0	5538	0
<i>Fridericia galba</i>	0	0	0	0	2223	0	708	0
<i>Fridericia galba</i> L1	0	4403	0	11020	0	0	11446	0
<i>Fridericia granosa</i>	2591	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia isseli</i>	0	214	0	2943	0	0	1044	0
<i>Fridericia lenta</i>	28644	0	5	0	0	0	0	0
<i>Fridericia nix</i>	0	0	0	0	917	0	0	0
<i>Fridericia paroniana</i>	3010	0	0	0	0	0	2565	0
<i>Fridericia ratzeli</i>	0	0	0	0	0	0	22	0
<i>Fridericia schmelzi</i>	257	0	0	0	4735	0	0	0
<i>Fridericia semisetosa</i>	0	0	0	0	0	0	254	0
<i>Fridericia striata</i>	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Fridericia sylvatica</i>	0	0	0	0	909	9049	0	1598
<i>Fridericia</i> sp. (2KDF)	0	0	0	0	0	0	347	0
<i>Fridericia</i> sp. (2TRO)	0	0	0	0	0	0	7796	0
<i>Fridericia</i> sp. (GLIF)	0	0	0	7892	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (NTRO)	0	0	0	0	0	0	1400	0
<i>Fridericia</i> sp.	0	47	0	0	315	0	19230	0
<i>Henlea perpusilla</i>	10966	3338	2475	0	2988	2127	357	0
<i>Henlea ventriculosa</i>	0	0	2345	0	0	0	0	0
<i>Henlea ventriculosa</i> L2	464	0	1035	0	1315	0	0	1391
<i>Marionina argentea</i>	34	0	0	0	0	0	0	0
<i>Marionina communis</i>	1588	0	0	0	0	252	15	0
<i>Marionina mendax</i>	0	96	0	0	0	0	0	0
<i>Oconnorella cambrensis</i>	622	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp.	0	304	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. BG	0	425	0	0	180	0	211	1642
Anzahl ASV/Taxa	19	15	20	8	19	16	22	11

Tabelle 49: Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Grünlandstandorten

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Achaeta affinis</i>	0	0	0	3326	0	0	0	0
<i>Achaeta bohemica</i>	0	0	0	6282	0	0	0	0
<i>Achaeta danica</i>	0	0	0	177	0	0	0	0
<i>Achaeta iberica</i>	0	7	0	0	0	0	0	0
<i>Achaeta unibulba</i>	0	0	0	4118	0	0	0	0
<i>Achaeta urbana</i>	0	577	0	0	0	0	0	0
<i>Achaeta</i> sp. F (AA)	0	0	0	538	0	0	0	0
<i>Buchholzia appendiculata</i>	0	672	298	29055	0	0	4999	217
<i>Buchholzia fallax</i>	0	0	0	0	0	956	0	0
<i>Buchholzia</i> sp. (BNBN)	0	571	0	0	0	0	315	0
<i>Cernosvitoviella</i> sp.	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Cognettia chlorophila</i>	0	0	0	20537	0	0	0	12328
<i>Cognettia varisetosa</i>	0	0	0	1530	0	0	0	10346
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	3114	3184	0	2342	117	1746	0	967
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	0	2273	0	0	0	1032	458	0
<i>Enchytraeus christenseni</i>	0	85	0	907	0	0	0	0
<i>Enchytraeus dictyosphaerula</i>	38	0	0	0	26	0	489	0
<i>Enchytraeus lacteus</i>	2796	0	145	34915	0	6539	0	0
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	0	0	0	798	0	0	0	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (NPAU)	0	0	0	0	1738	0	0	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (PALE)	384	0	0	0	0	0	333	0
<i>Enchytronia baloghi</i>	0	0	0	803	0	0	0	0
<i>Enchytronia christenseni</i>	0	122	0	0	0	5267	0	0
<i>Enchytronia holochaeta</i>	0	0	0	6297	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	0	0	0	7951	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i> L3	0	0	0	132	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i> L5	0	0	0	660	0	0	0	0
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	0	0	0	1545	0	0	0	0
<i>Enchytronia</i> sp. D (RAMM)	0	0	0	10005	0	0	0	0
<i>Enchytronia</i> sp.	0	0	0	363	0	0	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i>	0	0	4786	0	0	0	0	0

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Fridericia bisetosa</i> B	0	0	318	18660	0	0	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i> L1	0	515	4967	0	0	0	1428	0
<i>Fridericia bisetosa</i> L2	0	0	12859	1153	0	0	0	0
<i>Fridericia bulboides</i>	1837	0	0	0	6962	0	947	1894
<i>Fridericia christeri</i>	448	0	1586	0	0	0	9	0
<i>Fridericia christeri</i> L1	4059	136	222	0	0	2384	173	0
<i>Fridericia christeri</i> L2	1715	64	1314	0	0	3526	0	0
<i>Fridericia connata</i>	0	0	0	66986	0	0	22	0
<i>Fridericia connata</i> L1	0	0	0	18702	0	0	0	0
<i>Fridericia connata</i> L2	0	0	1180	30952	0	0	1250	0
<i>Fridericia cylindrica</i>	0	0	0	0	0	0	0	3976
<i>Fridericia deformis</i>	0	0	0	344	0	0	0	0
<i>Fridericia dura</i>	0	1547	0	28390	2921	0	0	9317
<i>Fridericia galba</i>	0	0	232	39758	0	0	0	0
<i>Fridericia galba</i> C	0	0	546	2247	0	0	0	0
<i>Fridericia galba</i> L1	11707	0	2206	0	0	0	0	0
<i>Fridericia granosa</i>	0	0	0	0	0	0	73	0
<i>Fridericia isseli</i>	0	0	60	0	0	6697	0	0
<i>Fridericia lenta</i>	0	0	5301	0	0	0	10692	0
<i>Fridericia maculata</i>	0	0	0	0	0	0	2061	0
<i>Fridericia paroniana</i>	136	860	78	0	0	0	2630	0
<i>Fridericia paroniana</i> L1	0	178	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia paroniana</i> L2	434	58	0	0	0	0	146	0
<i>Fridericia perrieri</i>	0	0	0	0	0	0	1536	0
<i>Fridericia ratzeli</i>	462	3353	0	6098	0	0	288	5730
<i>Fridericia regularis</i>	0	5963	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia schmelzi</i>	0	0	0	0	0	0	481	0
<i>Fridericia sphaericoides</i>	0	7870	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia sylvatica</i>	0	0	479	0	0	0	0	0
<i>Fridericia ulrikae</i>	0	0	0	35414	0	0	0	0
<i>Fridericia waldenstroemi</i>	0	0	353	3519	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (BMIN)	0	448	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (TRID)	0	0	0	0	0	1168	0	0

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Fridericia</i> sp.	86	4772	641	1038	0	0	9	122
<i>Hemifridericia parva</i>	0	0	0	0	0	0	47	55
<i>Henlea montana</i>	0	0	0	0	385	0	0	0
<i>Henlea perpusilla</i>	0	0	2280	3102	5831	0	538	3585
<i>Henlea ventriculosa</i>	0	496	0	0	3737	0	0	1064
<i>Henlea ventriculosa</i> L2	901	1163	0	0	9274	0	67	0
<i>Henlea</i> sp.	0	0	0	0	18017	0	0	453
<i>Marionina argentea</i>	0	0	0	2925	0	0	0	0
<i>Marionina brendae</i>	0	0	0	0	0	123	0	0
<i>Marionina communis</i>	0	0	41	0	0	0	443	41
<i>Marionina deminuta</i>	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Marionina mendax</i>	0	0	3	343	0	0	0	0
<i>Oconnorella tubifera</i>	0	0	0	18376	0	0	0	0
<i>Stercutus niveus</i>	0	0	18	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp.	100	0	0	0	0	913	0	27
Enchytraeidae sp. 1 RV-2016	0	0	0	0	0	0	2625	0
Enchytraeidae sp. BG	4122	150	0	0	0	0	0	0
Anzahl ASV/Taxa	16	23	23	38	10	11	26	15

Tabelle 50: Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Waldstandorten

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Achaeta aberrans</i>	0	0	0	17	0	0	0	0	0
<i>Achaeta abulba</i>	0	56	0	0	0	0	0	0	2699
<i>Achaeta affinis</i>	5639	5279	5444	0	236	258353	672	22184	43
<i>Achaeta bibulba</i>	0	0	0	0	0	140	0	0	0
<i>Achaeta camerani</i>	0	0	5714	1146	4889	0	0	0	2626
<i>Achaeta danica</i>	21	190	2904	145	1007	103	27	32	0
<i>Achaeta cf. danica</i> TF-2017	32	15	0	0	0	0	0	0	0
<i>Achaeta</i> sp. (PAFU)	0	0	0	5646	0	0	0	0	0
<i>Achaeta</i> sp. (PDZW)	81	0	0	0	0	0	0	12	0
<i>Buchholzia appendiculata</i>	5677	3572	0	0	0	2831	11038	6710	1058
<i>Cognettia chlorophila</i>	6300	18162	24249	15814	19876	41498	0	0	17535
<i>Cognettia cognettii</i>	0	3188	0	0	0	0	0	0	3013
<i>Cognettia pseudosphagnetorum</i>	0	0	0	133	0	0	0	0	0
<i>Cognettia sphagnetorum</i>	0	1737	0	4093	0	0	0	0	0
<i>Cognettia varisetosa</i>	0	887	0	0	0	2130	0	0	0
<i>Enchytraeus bigeminus</i>	0	0	0	0	0	270	0	0	0
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	841	1307	0	0	144	398	67	2236	901
<i>Enchytraeus dichaeus</i>	0	21	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytraeus japonensis</i>	0	0	0	0	0	25	0	0	0
<i>Enchytraeus lacteus</i>	0	0	0	0	0	0	341	0	0
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	1055	162	0	0	317	5404	0	0	0
<i>Enchytronia holochaeta</i>	47	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	208	130	0	0	81	1193	107	113	0
<i>Enchytronia parva</i> L2	0	264	0	0	0	0	0	536	98
<i>Enchytronia parva</i> L3	0	0	0	0	0	0	0	340	0
<i>Enchytronia parva</i> L5	95	0	0	0	36	561	0	63	36
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	0	43	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia</i> sp. (TRIN)	11	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia benti</i>	3425	2534	0	2577	0	774	0	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i>	1453	0	0	0	0	4037	8104	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i> L2	0	0	0	0	197	0	0	0	0

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Fridericia bulboides</i>	0	97	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia christeri</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia connata</i>	79	0	0	0	0	90	0	0	0
<i>Fridericia connata</i> L2	6313	0	0	0	0	20276	0	4308	0
<i>Fridericia cusanica</i>	0	45	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia cylindrica</i>	0	0	0	0	0	0	0	3067	0
<i>Fridericia dura</i>	627	0	0	0	0	10082	23087	2429	0
<i>Fridericia galba</i> C	0	0	0	0	0	0	0	2049	0
<i>Fridericia galba</i> L1	58	0	0	0	0	0	0	1637	0
<i>Fridericia paroniana</i> L2	356	0	0	0	0	0	10559	1015	0
<i>Fridericia perrieri</i>	3709	0	0	0	0	0	0	709	0
<i>Fridericia ratzeli</i>	0	0	0	0	0	0	2261	1123	0
<i>Fridericia striata</i>	3008	5572	0	677	0	0	0	0	3047
<i>Fridericia striata</i> L2	0	0	0	6179	0	0	0	0	4398
<i>Fridericia sylvatica</i>	1720	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (BISY)	1052	0	0	0	0	0	0	3489	0
<i>Henlea perpusilla</i>	0	16	0	0	0	0	0	295	0
<i>Henlea ventriculosa</i>	0	17	0	0	0	0	0	0	0
<i>Henlea ventriculosa</i> L2	0	10	0	0	0	0	0	0	0
<i>Marionina clavata</i>	0	0	2235	5374	737	0	0	0	195
<i>Marionina simillima</i>	41	9	0	0	0	0	0	182	0
<i>Mesenchytraeus armatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	5609
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	9805
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>	99	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oconnorella cambrensis</i>	164	8173	7922	11039	20648	49227	0	0	9290
<i>Oconnorella tubifera</i>	7501	0	0	0	0	77176	383	0	0
<i>Stercutus niveus</i>	47	75	0	0	0	4257	0	0	0
Enchytraeidae sp.	13	24	0	0	0	428	2	70	0
Anzahl ASV/Taxa	29	27	6	12	11	21	12	21	15

A.2.3 Collembolen

Tabelle 51: Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolenarten an den beprobten Ackerstandorten

ASV/Taxon	BIM	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Brachystomella parvula</i>	0	27	0	0	770	0	0
<i>Ceratophysella denticulata</i>	16	0	0	0	0	0	0
<i>Folsomia candida</i>	11	100	0	0	459	0	0
<i>Heteromurus major</i>	0	0	293	0	0	0	0
<i>Hypogastrura vernalis</i>	0	0	0	0	460	0	0
<i>Isotoma riparia</i>	5	0	0	0	0	0	0
<i>Isotoma viridis</i>	77	0	50	0	6820	0	0
<i>Isotomurus palustris</i>	0	0	227	0	0	0	0
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	0	0	0	0	0	0	5391
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>	473	0	0	0	0	0	0
<i>Megalothorax willemi</i>	98	0	0	100	0	0	0
<i>Parisetoma notabilis</i>	334	0	192	171	89	372	175
<i>Protaphorura cancellata</i>	1283	0	0	0	0	0	0
<i>Protaphorura fimata</i>	15	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudisotoma sensibilibis</i>	11	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudosinella alba</i>	19	0	0	0	0	0	2198
<i>Sminthurinus aureus</i>	151	0	0	0	0	0	0
<i>Sminthurinus elegans</i>	0	0	0	66	0	0	0
<i>Stenacidia violacea</i>	0	0	0	0	30	0	0
<i>Stenaphorura denisi</i>	0	0	0	0	0	1702	0
<i>Willowsia nigromaculata</i>	0	0	0	0	0	0	2434
Anzahl ASV/Taxa	12	2	4	3	6	2	4

Tabelle 52: Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolenarten an den beprobten Grünlandstandorten

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Antarctophorus subpolaris</i>	0	0	17	0	0	0	0
<i>Brachystomella parvula</i>	0	97	0	0	0	0	0
<i>Ceratophysella denticulata</i>	0	0	0	91	0	0	0
<i>Cryptopygus caecus</i>	0	5	14	0	0	0	0
<i>Desoria violacea</i>	0	0	1813	0	0	0	0
<i>Friesea claviseta</i>	158	0	0	0	0	19	0
<i>Isotoma viridis</i>	2059	0	2491	620	0	316	2723
<i>Isotomiella minor</i>	0	8	0	0	0	0	0
<i>Lepidocyrtus arrabonicus</i>	0	0	0	0	0	176	0
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	3356	31	0	0	0	0	3067
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>	0	0	449	0	18	14	0
<i>Lepidocyrtus paradoxus</i>	0	0	0	0	0	186	0
<i>Megalothorax svalbardensis</i>	0	6	0	0	0	0	0
<i>Metaphorura affinis</i>	0	0	169	0	0	0	0
<i>Parisotoma notabilis</i>	9884	39	593	0	30	1118	17
<i>Protaphorura armata</i>	0	68	64	0	0	0	0
<i>Protaphorura pseudovanderdrifti</i>	0	0	0	46	0	0	0
<i>Pseudosinella alba</i>	0	0	0	0	580	0	0
<i>Sminthurinus aureus</i>	0	0	28	0	0	0	0
<i>Sminthurinus elegans</i>	390	0	0	0	0	0	0
<i>Sphaeridia pumilis</i>	273	0	0	0	0	0	0
<i>Tomocerus sibiricus</i>	0	13	0	0	6	0	0
Anzahl ASV/Taxa	6	8	9	3	4	6	3

Tabelle 53: Anzahl der COI comDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolenarten an den beprobten Waldstandorten

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	SBU	SHW	WBU
<i>Antarctophorus subpolaris</i>	0	0	110	0	0	0	0	0
<i>Ceratophysella denticulata</i>	231	824	0	58	205	0	0	0
<i>Ceratophysella gibbosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>Ceratophysella sigillata</i>	0	0	0	0	0	10	0	0
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>	0	27	0	0	0	0	1479	0
<i>Deuteraphorura inermis</i>	60	0	0	0	0	0	0	0
<i>Deutonura monticola</i>	22	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dicyrtomina ornata</i>	0	0	0	0	0	0	0	15
<i>Entomobrya multifasciata</i>	0	0	20	0	0	0	0	0
<i>Folsomia penicula</i>	0	0	91	127	0	0	0	80
<i>Folsomia quadrioculata</i>	156	282	0	0	0	78	0	0
<i>Friesea claviseta</i>	0	0	17	0	8	0	0	12
<i>Isotoma riparia</i>	0	0	0	69	0	0	30	0
<i>Isotoma viridis</i>	0	0	268	0	0	0	0	0
<i>Isotomiella minor</i>	15	22	24	0	77	0	0	79
<i>Isotomurus stuxbergi</i>	0	0	0	0	0	64	0	0
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	16	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>	207	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>	22	0	0	0	0	0	19	0
<i>Megalothorax minimus</i>	0	10	0	15	0	0	0	0
<i>Neanura muscorum</i>	0	560	0	250	404	0	0	80
<i>Orchesella bifasciata</i>	0	0	8	0	0	0	0	0
<i>Parisotoma ekmani</i>	0	0	0	0	5	0	0	0
<i>Parisotoma notabilis</i>	398	1758	16	26	0	24	261	74
<i>Protaphorura armata</i>	0	0	0	1156	0	0	0	349
<i>Protaphorura pseudovanderdrifti</i>	0	409	0	0	436	0	0	0
<i>Pseudisotoma sensibilis</i>	0	0	529	0	0	0	0	0
<i>Pseudosinella alba</i>	10	87	0	0	0	0	404	0
<i>Sminthurinus elegans</i>	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Supraphorura furcifera</i>	41	0	1223	0	0	0	0	202
<i>Tomocerus sibiricus</i>	38	0	156	0	0	0	0	0

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	SBU	SHW	WBU
<i>Willemia denisi</i>	0	0	13	12	0	0	0	0
<i>Xenylla grisea</i>	0	0	0	0	94	0	0	0
Anzahl ASV/Taxa	12	9	13	8	7	4	5	9

A.3 Bestimmung mittels eDNA-Metabarcoding

A.3.1 Regenwürmer

Tabelle 54: Anzahl der 16S eDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Ackerstandorten

ASV/Taxon	BIM	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Allolobophora chlorotica</i>	0	0	4247	3882	0	11	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	15057	32212	10507	14294	0	5465	0
<i>Aporrectodea icterica</i>	0	0	3541	0	0	0	0
<i>Aporrectodea longa</i>	0	0	45862	0	1640	31067	0
<i>Aporrectodea rosea</i>	0	0	2077	5749	0	15882	168
<i>Dendrobaena octaedra</i>	0	0	0	0	3090	0	0
<i>Lumbricus terrestris</i>	0	0	0	36372	0	9107	3636
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	0	0	0	0	0	8741	0
Anzahl ASV/Taxa	1	1	5	4	2	6	2

Tabelle 55: Anzahl der 16S eDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Grünlandstandorten

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Allolobophora chlorotica</i>	5081	731	0	44939	11819	0	0
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	41227	12953	1348	202	7	9311	0
<i>Aporrectodea longa</i>	10109	0	0	0	6833	36997	10933
<i>Aporrectodea rosea</i>	2565	0	2284	0	17323	138	0
<i>Dendrobaena octaedra</i>	0	0	0	0	0	0	438
<i>Lumbricus castaneus</i>	0	0	0	0	144	0	0
<i>Lumbricus rubellus</i>	3919	0	0	0	0	37	25208
<i>Lumbricus terrestris</i>	0	0	0	0	13423	7090	0
<i>Octolasion sp.</i>	0	0	23361	0	0	0	0
<i>Octolasion cyaneum</i>	3131	0	0	0	0	0	0
<i>Proctodrilus antipae</i>	0	0	0	0	1408	0	0
Anzahl ASV/Taxa	6	2	3	2	7	5	3

Tabelle 56: Anzahl der 16S eDNA-Metabarcoding-Reads der Regenwürmer an den beprobten Waldstandorten

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	SBU	SHW	WBU
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	1401	0	0	0	0	15729	13979	0
<i>Aporrectodea longa</i>	0	0	0	0	0	0	0	38
<i>Dendrobaena attemsi</i>	0	0	0	0	0	0	0	2310
<i>Dendrobaena octaedra</i>	0	0	43	5020	0	0	0	0
<i>Dendrobaena pygmaea</i>	0	0	0	1603	0	0	0	0
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	0	1719	0	0	0	5610	0	0
<i>Lumbricus castaneus</i>	0	0	0	0	0	0	189	0
<i>Lumbricus rubellus</i>	0	0	3021	439	1346	440	4886	0
<i>Lumbricus terrestris</i>	0	0	0	0	0	5950	0	0
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	0	0	0	0	0	0	163	0
Lumbricidae sp.	0	0	0	0	0	0	0	253
Anzahl ASV/Taxa	1	1	2	3	1	4	4	3

A.3.2 Enchytraeiden

Tabelle 57: Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Ackerstandorten

ASV/Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Achaeta affinis</i>	7	0	1036	0	28	0	0	0
<i>Achaeta bibulba</i>	0	0	1399	0	0	0	0	0
<i>Achaeta camerani</i>	6	0	841	0	0	0	0	0
<i>Achaeta iberica</i>	0	0	0	0	3	614	0	11
<i>Achaeta unibulba</i>	12	0	0	0	0	0	0	0
<i>Achaeta</i> sp. (DZWI)	0	0	0	0	0	11	0	0
<i>Achaeta</i> sp. (HEAL)	5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Buchholzia appendiculata</i>	5	0	0	0	8	640	0	0
<i>Buchholzia</i> sp. (PAPP)	0	0	0	858	0	0	0	0
<i>Buchholzia</i> sp. (BNBN)	0	0	0	0	0	11247	0	0
<i>Cognettia chlorophila</i>	10	0	0	0	17	4	0	0
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	0	20	106	5	81	152	377	0
<i>Enchytraeus buchholzi</i> L1	0	0	25	0	0	96	0	0
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	0	0	0	6	105	0	151	0
<i>Enchytraeus dichaeetus</i>	177	0	810	0	606	895	0	0
<i>Enchytraeus lacteus</i>	0	0	421	53	0	0	271	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (NICO)	0	0	0	17	0	0	0	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (NPAU)	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (PALE)	0	0	0	0	7	0	42	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (SPEF)	0	0	0	0	0	0	27	0
<i>Enchytronia christenseni</i>	4	0	484	0	192	902	64	0
<i>Enchytronia holochaeta</i>	19	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	11	0	298	0	0	1699	0	0
<i>Enchytronia parva</i> L1	0	90	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i> L3	6	0	0	0	0	248	0	0
<i>Enchytronia pratensis</i>	0	0	0	0	0	2455	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i>	0	0	0	0	113	0	8	0
<i>Fridericia bisetosa</i> L1	36	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia bulboides</i>	0	0	3550	0	156	674	12	25
<i>Fridericia christeri</i>	0	3	314	0	247	225	0	0

ASV/Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Fridericia christeri</i> L1	0	64	0	37	265	177	0	0
<i>Fridericia christeri</i> L2	0	14	0	87	37	0	528	0
<i>Fridericia connata</i>	0	0	0	0	47	0	0	0
<i>Fridericia connata</i> L2	0	0	0	0	239	0	0	0
<i>Fridericia cusanica</i>	0	0	1530	0	0	0	0	0
<i>Fridericia cylindrica</i>	0	0	38	0	0	0	0	0
<i>Fridericia deformis</i>	0	0	0	0	0	0	660	0
<i>Fridericia dura</i>	0	0	0	0	0	0	310	0
<i>Fridericia galba</i>	0	0	0	0	27	0	472	0
<i>Fridericia galba</i> C	0	0	0	0	44	0	0	0
<i>Fridericia galba</i> L1	0	0	0	385	5	0	1613	0
<i>Fridericia granosa</i>	3	0	0	0	86	0	0	0
<i>Fridericia isseli</i>	0	0	0	76	0	0	581	0
<i>Fridericia lenta</i>	59	0	3	0	0	0	0	0
<i>Fridericia nix</i>	0	0	0	0	54	0	0	0
<i>Fridericia paroniana</i>	1574	0	0	0	0	0	515	0
<i>Fridericia paroniana</i> L2	0	0	0	60	0	0	0	0
<i>Fridericia ratzeli</i>	0	0	0	0	12	0	0	0
<i>Fridericia schmelzi</i>	0	0	0	0	1073	0	0	0
<i>Fridericia semisetosa</i>	0	0	0	0	0	0	178	0
<i>Fridericia sylvatica</i>	0	5	0	0	128	524	39	13
<i>Fridericia</i> sp. (2TRO)	0	0	0	0	0	0	2971	0
<i>Fridericia</i> sp. (GLIF)	0	0	0	524	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (NLD1)	0	0	0	18	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (NTRO)	0	0	0	0	0	0	409	0
<i>Fridericia</i> sp. 2 KDF	0	0	0	0	0	0	970	0
<i>Fridericia</i> sp.	0	0	0	0	25	0	2089	0
<i>Hemifridericia parva</i>	10	0	0	0	0	0	0	0
<i>Henlea perpusilla</i>	8	2	1252	0	36	541	190	0
<i>Henlea ventriculosa</i>	0	0	416	0	0	0	0	0
<i>Henlea ventriculosa</i> L2	0	0	314	0	75	0	0	0
<i>Marionina argentea</i>	33	0	0	0	0	0	11	0
<i>Marionina communis</i>	33	0	0	0	0	445	24	0

ASV/Taxon	BIM	GHU	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Oconnorella cambrensis</i>	6	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. BG	0	0	0	0	13	0	79	0
Anzahl ASV/Taxa	20	7	17	12	28	18	25	3

Tabelle 58: Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Grünlandstandorten

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Achaeta affinis</i>	0	0	0	0	50	6	0	2
<i>Achaeta bohemica</i>	0	0	0	106	0	0	0	0
<i>Achaeta danica</i>	0	0	0	4	12	0	0	0
<i>Achaeta iberica</i>	0	292	0	0	0	0	0	0
<i>Achaeta pannonica</i>	0	0	0	0	0	0	149	0
<i>Achaeta unibulba</i>	0	0	0	280	0	0	0	0
<i>Achaeta urbana</i>	0	283	0	0	0	0	0	0
<i>Bryodrilus parvus</i>	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>Buchholzia appendiculata</i>	55	829	281	24	6	0	9776	75
<i>Buchholzia fallax</i>	0	0	0	0	0	156	0	0
<i>Buchholzia</i> sp. (BNBN)	0	480	18	0	0	168	1515	0
<i>Buchholzia</i> sp. (PAPP)	0	0	0	0	4	294	0	0
<i>Cognettia chlorophila</i>	0	0	0	4	19	0	0	4400
<i>Cognettia varisetosa</i>	0	0	0	3	0	0	0	3217
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	438	262	0	0	0	97	264	131
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	0	74	14	0	0	5	0	0
<i>Enchytraeus christenseni</i>	0	14	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytraeus dichaeus</i>	0	0	0	0	23	0	232	0
<i>Enchytraeus lacteus</i>	223	0	154	0	0	17	0	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (NPAU)	0	0	0	0	1006	0	0	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (PALE)	156	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytraeus</i> sp. (SPEF)	0	0	61	0	0	0	0	0
<i>Enchytronia christenseni</i>	0	230	14	5	0	213	0	0
<i>Enchytronia holochaeta</i>	0	31	0	14	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	0	75	0	12	0	0	0	0
<i>Enchytronia parva</i> L3	94	0	0	11	0	0	0	0

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Enchytronia</i> sp. D (RAMM)	0	0	0	39	0	0	0	0
<i>Fridericia benti</i>	0	0	0	5	0	0	36	0
<i>Fridericia bisetosa</i>	0	0	4778	29	0	0	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i> B	0	0	6	0	0	0	0	0
<i>Fridericia bisetosa</i> L1	0	2039	903	3	0	0	2460	0
<i>Fridericia bisetosa</i> L2	11	0	4194	0	0	0	55	0
<i>Fridericia bulboides</i>	320	0	0	0	2077	0	585	334
<i>Fridericia christeri</i>	260	0	889	0	0	95	117	0
<i>Fridericia christeri</i> L1	2725	88	251	0	0	170	408	0
<i>Fridericia christeri</i> L2	382	107	926	0	0	130	0	0
<i>Fridericia connata</i>	0	0	0	20	0	0	1463	0
<i>Fridericia connata</i> L1	0	25	0	100	0	0	0	0
<i>Fridericia connata</i> L2	0	2742	976	34	0	0	1138	0
<i>Fridericia cylindrica</i>	0	0	0	0	0	0	0	1151
<i>Fridericia deformis</i>	21	0	29	3	0	0	0	0
<i>Fridericia dura</i>	0	406	0	70	0	0	105	202
<i>Fridericia galba</i>	0	0	0	24	0	284	0	0
<i>Fridericia galba</i> A	0	0	28	0	0	211	0	0
<i>Fridericia galba</i> C	0	0	57	0	0	0	0	0
<i>Fridericia galba</i> L1	2900	0	126	0	0	0	0	0
<i>Fridericia galba</i> L2	0	0	0	0	0	101	0	0
<i>Fridericia granosa</i>	0	0	5	0	0	0	116	0
<i>Fridericia isseli</i>	0	0	312	0	0	432	0	0
<i>Fridericia lenta</i>	0	0	1422	0	0	0	8279	0
<i>Fridericia maculata</i>	0	0	0	0	0	0	1215	0
<i>Fridericia nix</i>	0	0	310	0	0	0	0	0
<i>Fridericia paroniana</i>	87	322	56	0	0	0	2020	0
<i>Fridericia paroniana</i> L1	0	61	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia paroniana</i> L2	35	172	0	0	0	0	161	50
<i>Fridericia perrieri</i>	16	0	0	0	269	0	787	0
<i>Fridericia ratzeli</i>	74	2263	0	7	69	44	493	501
<i>Fridericia regularis</i>	0	2025	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia schmelzi</i>	0	0	0	0	20	0	212	0

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	KUM	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Fridericia sphaericoides</i>	0	19205	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia striata</i>	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>Fridericia sylvatica</i>	0	0	374	0	0	0	0	0
<i>Fridericia ulrikae</i>	0	0	0	48	0	0	0	0
<i>Fridericia waldenstroemi</i>	0	0	123	0	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (BMIN)	0	193	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (TRID)	0	0	0	0	0	620	0	0
<i>Fridericia</i> sp.	98	1545	1721	0	0	0	196	11
<i>Hemifridericia parva</i>	0	0	0	0	0	0	41	0
<i>Henlea montana</i>	0	0	0	0	41	0	0	0
<i>Henlea nasuta</i>	0	48	0	0	0	0	0	0
<i>Henlea perpusilla</i>	0	0	369	0	562	0	128	594
<i>Henlea ventriculosa</i>	0	0	0	0	83	0	0	23
<i>Henlea ventriculosa</i> L2	110	28	0	0	1085	0	235	11
<i>Henlea</i> sp.	0	0	0	0	959	0	0	96
<i>Marionina argentea</i>	0	0	0	7	0	0	0	0
<i>Marionina brendae</i>	0	0	0	0	0	141	0	0
<i>Marionina communis</i>	10	29	35	0	0	0	884	15
<i>Marionina deminuta</i>	0	0	0	0	42	0	0	0
<i>Marionina mendax</i>	0	0	0	9	0	0	0	0
<i>Oconnorella tubifera</i>	0	0	0	16	0	0	0	0
<i>Stercutus niveus</i>	0	0	0	10	0	0	0	0
Enchytraeidae sp.	8	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. BG	407	17	0	0	0	0	0	0
Anzahl ASV/Taxa	20	29	28	26	17	19	27	17

Tabelle 59: Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Enchytraeiden an den beprobten Waldstandorten

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Achaeta aberrans</i>	0	46	0	8	15	0	0	0	12
<i>Achaeta abulba</i>	0	1020	0	0	0	0	0	0	390
<i>Achaeta affinis</i>	1250	12961	959	0	10	13507	1719	6708	8
<i>Achaeta bibulba</i>	0	0	0	0	237	11	0	0	0
<i>Achaeta bohemica</i>	0	0	0	0	0	10	0	0	0
<i>Achaeta camerani</i>	0	0	1362	4670	8355	1189	0	0	2010
<i>Achaeta danica</i>	9	544	1119	23	443	60	0	12	0
<i>Achaeta cf. danica</i> TF-2017	72	31	0	0	0	0	0	0	0
<i>Achaeta unibulba</i>	0	0	0	0	0	0	28	0	0
<i>Achaeta</i> sp. (PAFU)	0	0	0	6390	0	0	0	0	0
<i>Buchholzia appendiculata</i>	2422	2686	0	4	0	24	12605	316	72
<i>Cernosvitoviella</i> sp.	15	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cognettia chlorophila</i>	795	8876	1601	2432	2653	510	0	0	539
<i>Cognettia cognettii</i>	0	93	18	0	0	0	0	0	46
<i>Cognettia pseudosphagnetorum</i>	0	0	0	16	0	0	0	0	0
<i>Cognettia sphagnetorum</i>	0	439	0	356	0	0	0	0	0
<i>Cognettia varisetosa</i>	0	1258	0	45	0	14	0	0	0
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	100	157	0	0	0	5	25	20	7
<i>Enchytraeus christenseni</i>	117	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytraeus lacteus</i>	0	0	0	0	0	0	21	16	0
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	531	23	0	0	48	20	0	0	0
<i>Enchytronia hellenica</i>	0	0	0	0	0	0	15	0	0
<i>Enchytronia holochaeta</i>	16	0	0	0	0	0	160	0	0
<i>Enchytronia parva</i>	168	76	13	0	3	27	0	9	15
<i>Enchytronia parva</i> L2	0	90	0	0	0	0	0	33	0
<i>Enchytronia parva</i> L3	0	0	0	0	0	0	14	10	0
<i>Enchytronia parva</i> L5	111	0	0	0	18	7	0	38	17
<i>Enchytronia pratensis</i>	0	0	0	0	0	0	27	0	0
<i>Enchytronia pygmaea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	9
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	8	43	0	0	0	0	0	0	13
<i>Enchytronia</i> sp. (TRIN)	5	0	0	0	0	0	0	0	0

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	POS	SBU	SHW	WBU
<i>Fridericia benti</i>	678	1770	0	14	0	13	0	16	27
<i>Fridericia bisetosa</i>	475	0	0	0	0	81	1562	0	0
<i>Fridericia connata</i>	0	0	0	0	0	25	0	19	0
<i>Fridericia connata</i> L1	50	0	0	0	0	64	0	0	0
<i>Fridericia connata</i> L2	3217	0	0	0	0	181	0	76	0
<i>Fridericia cylindrica</i>	0	0	0	0	0	0	0	204	0
<i>Fridericia dura</i>	21	0	0	0	0	14	978	11	0
<i>Fridericia galba</i> C	0	0	0	0	0	0	0	23	0
<i>Fridericia galba</i> L1	0	0	0	0	0	0	0	42	0
<i>Fridericia paroniana</i> L2	131	0	0	0	0	0	699	64	0
<i>Fridericia perrieri</i>	74	0	0	0	0	0	0	17	0
<i>Fridericia ratzeli</i>	0	0	0	49	0	0	64	23	0
<i>Fridericia striata</i>	4	712	0	360	0	0	0	0	203
<i>Fridericia striata</i> L2	0	0	0	118	0	0	0	0	53
<i>Fridericia sylvatica</i>	68	0	0	0	0	0	188	0	0
<i>Fridericia waldenstroemi</i>	0	0	0	0	0	0	140	0	0
<i>Fridericia</i> sp. (BISY)	115	0	0	0	0	0	0	99	0
<i>Marionina clavata</i>	0	0	800	2400	469	0	0	0	29
<i>Marionina filiformis</i>	0	0	0	16	0	0	0	0	0
<i>Marionina simillima</i>	37	7	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mesenchytraeus armatus</i>	0	37	0	0	0	0	0	0	389
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>	0	9	0	44	57	0	0	0	370
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>	7	16	19	0	0	0	0	0	0
<i>Oconnorella cambrensis</i>	9	5098	251	2019	1638	457	0	0	232
<i>Oconnorella tubifera</i>	1438	0	0	0	0	6854	131	0	0
<i>Stercutus niveus</i>	21	91	0	0	0	182	0	113	27
Enchytraeidae sp.	0	5	0	0	0	5	0	0	0
Anzahl ASV/Taxa	29	24	9	17	12	22	16	21	20

A.3.3 Collembolen

Tabelle 60: Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolen an den beprobten Ackerstandorten

ASV/Taxon	BIM	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Anurophorus palearcticus</i>	0	0	27	0	6	0	0
<i>Bilobella aurantiaca</i>	36	0	0	14	0	0	0
<i>Brachystomella parvula</i>	0	0	0	0	11	0	0
<i>Calvatomina rossi</i>	7	0	0	0	0	0	0
<i>Ceratophysella denticulata</i>	0	0	0	0	9	0	0
<i>Ceratophysella sigillata</i>	0	0	0	0	0	3	0
<i>Crossodonthina laterisensillata</i>	6	2	0	0	0	0	0
<i>Cryptopygus caecus</i>	11	0	0	0	0	0	0
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>	72	0	0	96	0	0	13
<i>Desoria gracilliseta</i>	0	0	0	6	0	0	0
<i>Deuterostminthurus bicinctus</i>	4	0	0	0	0	22	0
<i>Deutonura caerulescens</i>	29	0	0	0	0	0	0
<i>Deutonura deficiens</i>	14	0	0	0	0	0	217
<i>Deutonura monticola</i>	0	0	103	16	13	0	205
<i>Dicyrtoma atra</i>	0	57	0	0	0	5	0
<i>Dicyrtomina minuta</i>	0	85	0	0	0	0	13
<i>Dicyrtomina saundersi</i>	0	0	0	0	0	0	20
<i>Entomobrya aino</i>	0	0	0	0	6	0	0
<i>Entomobrya atrocincta</i>	0	0	0	13	0	0	0
<i>Entomobrya gisini</i>	29	40	45	35	0	50	204
<i>Entomobrya marginata</i>	0	5	0	0	3	4	0
<i>Entomobrya multifasciata</i>	0	42	0	0	0	0	33
<i>Entomobrya nivalis</i>	25	0	0	0	6	0	33
<i>Folsomia manolachei</i>	0	0	0	0	18	0	0
<i>Folsomia quadrioculata</i>	6	0	19	0	0	0	0
<i>Folsomia similis</i>	6	0	0	17	2	0	0
<i>Friesea claviseta</i>	0	0	0	0	0	0	5
<i>Gressittacantha terranova</i>	0	15	0	0	0	0	0
<i>Heteromurus nitidus</i>	0	0	0	7	25	0	0
<i>Homidia laha</i>	24	0	0	0	0	0	5

ASV/Taxon	BIM	KLK	LIS	NEU	SLT	TRO	WOL
<i>Homidia phjongjangica</i>	0	0	26	7	0	12	0
<i>Homidia sinensis</i>	0	0	0	0	0	19	0
<i>Isotoma marionensis</i>	0	180	0	241	66	0	0
<i>Isotoma riparia</i>	49	0	0	0	92	0	12
<i>Isotoma viridis</i>	0	8	9	20	0	28	3
<i>Isotomiella minor</i>	0	0	0	0	0	0	20
<i>Isotomurus fucicolus</i>	0	0	0	5	0	26	0
<i>Isotomurus plumosus</i>	0	0	0	16	0	0	0
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	0	0	0	0	7	0	1498
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>	18	24	0	0	0	0	0
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>	12	53	0	0	15	0	0
<i>Megalothorax nigropunctatus</i>	0	0	0	21	0	0	35
<i>Megalothorax willemi</i>	0	0	0	23	0	0	0
<i>Neanura muscorum</i>	0	7	0	0	0	0	0
<i>Orchesella cincta</i>	0	48	0	0	0	0	0
<i>Orchesellides sinensis</i>	0	0	0	149	0	36	0
<i>Parisotoma ekmani</i>	13	0	0	0	16	0	0
<i>Parisotoma notabilis</i>	126	69	48	511	40	147	54
<i>Pogonognathellus flavescens</i>	72	0	0	0	0	0	48
<i>Pogonognathellus longicornis</i>	0	0	0	0	0	17	0
<i>Protaphorura aurantiaca</i>	0	13	0	0	0	0	0
<i>Pseudosinella alba</i>	0	0	0	0	0	0	12
<i>Pseudosinella immaculata</i>	0	0	0	0	0	0	35
<i>Seira nicoya</i>	0	5	0	0	0	0	0
<i>Sminthurides hyogramme</i>	12	0	0	0	0	0	0
<i>Sminthurinus aureus</i>	8	44	6	40	27	0	0
<i>Sminthurinus elegans</i>	0	16	0	0	0	0	5
<i>Sphyrotheca aleta</i>	0	11	0	0	3	41	0
<i>Stenacidia violacea</i>	0	0	0	0	2	0	0
<i>Tomocerina purpurithora</i>	8	0	0	8	0	0	0
<i>Willowsia nigromaculata</i>	0	0	5	0	0	0	13
<i>Xenylla mediterranea</i>	0	10	0	0	0	29	0
Anzahl ASV/Taxa	22	20	9	19	19	14	21

Tabelle 61: Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolen an den beprobten Grünlandstandorten

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Anurida tullbergi</i>	0	9	0	0	4	0	0
<i>Anurophorus palearcticus</i>	0	0	0	0	15	0	0
<i>Calvatomina rossi</i>	0	0	0	0	0	0	31
<i>Ceratophysella denticulata</i>	0	0	0	0	0	0	4
<i>Crossodonthina laterisensillata</i>	0	0	0	0	0	10	0
<i>Cryptopygus caecus</i>	0	21	0	0	0	0	0
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>	0	0	0	11	3	8	0
<i>Cryptopygus tricuspis</i>	0	0	0	0	27	0	0
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>	17	9	0	27	11	32	0
<i>Deutonura decolorata</i>	0	0	0	0	0	234	0
<i>Deutonura monticola</i>	0	0	0	144	0	0	0
<i>Dicranocentrus gaoligongensis</i>	2	0	0	0	0	0	0
<i>Dicyrtoma fusca</i>	0	0	0	0	27	0	0
<i>Dicyrtomina minuta</i>	0	0	0	0	0	0	13
<i>Entomobrya aino</i>	0	0	0	20	0	0	0
<i>Entomobrya assuta</i>	0	0	0	0	0	0	1453
<i>Entomobrya atrocincta</i>	0	27	0	0	0	13	0
<i>Entomobrya clitellaria</i>	95	0	0	0	0	40	18
<i>Entomobrya gisini</i>	10	0	0	7	32	0	0
<i>Entomobrya marginata</i>	0	8	0	11	0	17	0
<i>Entomobrya nivalis</i>	0	0	0	0	10	0	0
<i>Folsomia elongata</i>	4	0	0	0	0	0	0
<i>Folsomia manolachei</i>	0	0	0	6	0	0	0
<i>Folsomia quadrioculata</i>	10	21	0	0	16	0	8
<i>Heteromurus nitidus</i>	0	12	0	12	0	0	14
<i>Homidia laha</i>	0	6	0	0	0	0	0
<i>Homidia phjongjangica</i>	0	0	0	15	0	6	0

ASV/Taxon	ALM	BRU	GAL	PAU	SHG	ZEC	ZIN
<i>Hypogastrura burkilli</i>	0	0	0	0	3	0	0
<i>Isotoma marionensis</i>	36	0	0	0	0	0	0
<i>Isotoma riparia</i>	8	0	0	12	3	8	0
<i>Isotoma viridis</i>	0	0	0	9	37	0	4
<i>Kaylathalia klovstadi</i>	0	8	0	0	0	0	0
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	22	0	0	18	0	265	9
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>	0	0	0	9	0	0	0
<i>Lepidocyrtus paradoxus</i>	0	0	0	0	7	10	0
<i>Megalothorax minimus</i>	0	0	0	0	0	0	6
<i>Megalothorax svalbardensis</i>	35	0	0	0	0	0	0
<i>Neanura muscorum</i>	27	0	0	0	15	0	0
<i>Orchesellides sinensis</i>	0	0	0	266	34	0	0
<i>Parisotoma notabilis</i>	293	22	0	79	31	227	44
<i>Podura aquatica</i>	0	0	0	47	0	0	0
<i>Pogonognathellus flavescens</i>	0	0	0	13	0	0	0
<i>Pseudosinella alba</i>	0	0	0	14	13	0	0
<i>Sminthurinus aureus</i>	193	3	0	18	55	54	45
<i>Sminthurinus elegans</i>	11	0	0	0	0	0	0
<i>Sminthurus viridis</i>	0	0	0	0	0	7	0
<i>Sphaeridia pumilis</i>	18	0	0	21	0	0	0
<i>Sphyrotheca aleta</i>	7	0	0	45	0	0	0
<i>Tomocerus nigrus</i>	0	0	0	0	0	152	5
<i>Willowsia nigromaculata</i>	0	0	0	4	0	0	0
<i>Xenylla mediterranea</i>	0	0	0	0	0	0	40
Anzahl ASV/Taxa	16	11	0	22	18	15	14

Tabelle 62: Anzahl der COI eDNA-Metabarcoding-Reads der Collembolen an den beprobten Waldstandorten

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	SBU	SHW	WBU
<i>Antarcticinella monoculata</i>	0	0	0	0	0	0	9	0
<i>Antarctophorus subpolaris</i>	0	0	9	0	4	0	0	0
<i>Bilobella aurantiaca</i>	44	43	0	0	0	0	0	0
<i>Bilobella braunerae</i>	0	0	0	3	0	0	0	0
<i>Calvatomina rossi</i>	8	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ceratophysella denticulata</i>	5	57	0	0	0	0	0	0
<i>Ceratophysella gibbosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	9
<i>Ceratophysella granulata</i>	0	0	16	0	0	0	0	0
<i>Crossodonthina laterisensillata</i>	0	2	0	0	0	0	53	0
<i>Cryptopygus antarcticus</i>	0	23	0	0	139	0	10	84
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>	16	129	10	3	0	0	11	3
<i>Deuteraphorura inermis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>	12	0	0	0	0	0	20	0
<i>Deutonura decolorata</i>	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Deutonura deficiens</i>	0	0	0	0	0	0	4	90
<i>Deutonura monticola</i>	0	3	7	14	0	58	3	0
<i>Deutonura vallespirensis</i>	0	0	12	0	0	0	0	0
<i>Dicyrtomina minuta</i>	28	7	0	0	28	7	0	46
<i>Dicyrtomina ornata</i>	0	0	8	55	12	0	9	39
<i>Dicyrtomina saundersi</i>	0	47	0	0	0	0	0	0
<i>Entomobrya assuta</i>	0	750	0	16	105	0	0	0
<i>Entomobrya atrocincta</i>	0	0	0	5	0	0	0	5
<i>Entomobrya clitellaria</i>	29	26	0	0	0	31	0	326
<i>Entomobrya gisini</i>	0	3	3	59	40	33	61	0
<i>Entomobrya marginata</i>	6	0	0	0	0	0	0	0
<i>Entomobrya multifasciata</i>	0	0	31	0	0	0	23	0
<i>Entomobrya nivalis</i>	9	0	0	0	0	29	32	0

ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	SBU	SHW	WBU
<i>Folsomia candida</i>	0	0	5	0	0	0	0	0
<i>Folsomia penicula</i>	0	4	8	11	0	0	0	168
<i>Folsomia quadrioculata</i>	39	21	0	0	0	0	2	0
<i>Friesea claviseta</i>	0	0	0	5	7	0	0	6
<i>Friesea grisea</i>	21	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gisinianus flammeolus</i>	0	0	0	6	38	0	8	0
<i>Homidia laha</i>	12	0	0	0	0	13	21	0
<i>Homidia socia</i>	0	0	0	0	0	0	33	0
<i>Isotoma riparia</i>	7	5	241	172	28	10	46	0
<i>Isotomiella minor</i>	0	69	22	12	34	17	0	69
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	0	13	5	5	0	2480	0	0
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>	19	16	0	0	0	0	111	0
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>	6	0	0	0	0	0	21	0
<i>Megalothorax minimus</i>	3	16	47	77	0	0	59	1012
<i>Megalothorax svalbardensis</i>	0	3	11	2	11	0	0	0
<i>Micranurida pygmaea</i>	0	15	5	0	0	0	0	12
<i>Micraptorura absoloni</i>	0	15	0	0	0	0	0	0
<i>Neanura muscorum</i>	0	20	83	70	96	0	335	14
<i>Neelus murinus</i>	26	10	0	0	0	0	0	70
<i>Orchesella bifasciata</i>	9	0	17	0	0	0	7	0
<i>Orchesella cincta</i>	0	0	0	7	0	0	5	0
<i>Orchesella flavescens</i>	0	9	0	0	0	0	0	0
<i>Parisotoma notabilis</i>	150	234	96	99	117	23	266	227
<i>Paronellides praefectus</i>	0	0	0	0	0	0	23	0
<i>Podura aquatica</i>	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Pogonognathellus flavescens</i>	0	36	0	0	0	0	0	8
<i>Pogonognathellus longicornis</i>	0	60	0	79	0	0	0	0
<i>Protaphorura armata</i>	0	0	0	116	0	0	0	21

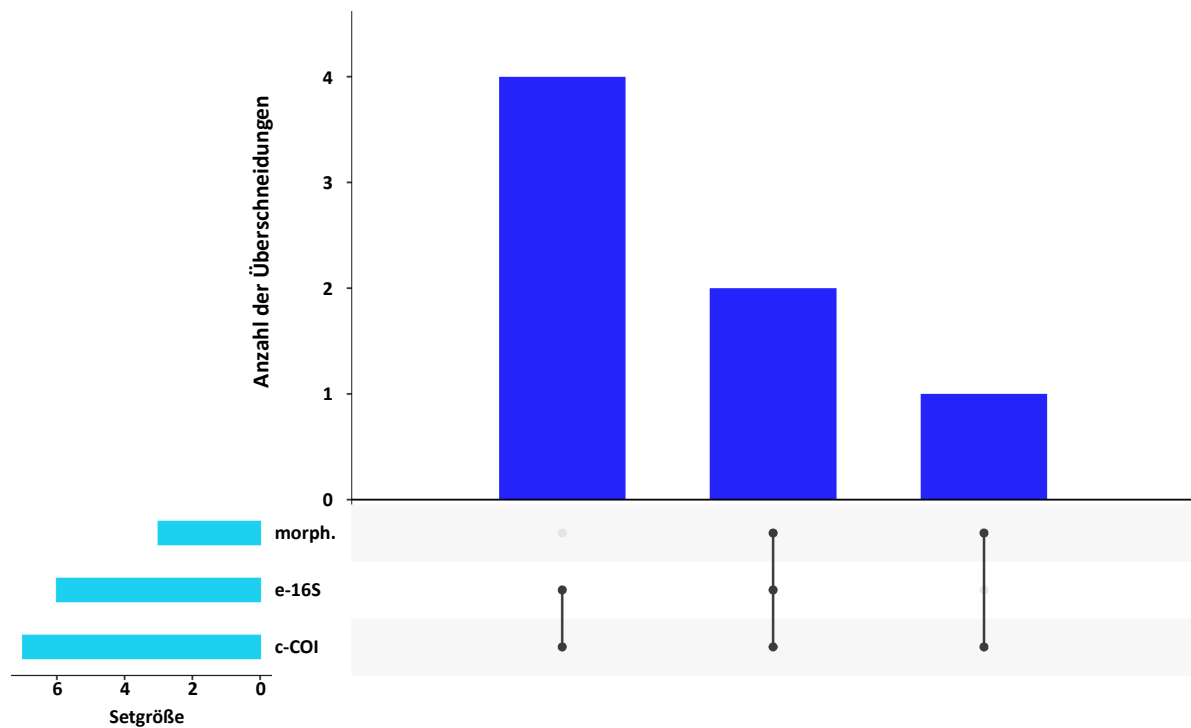
ASV/Taxon	BOV	EUT	FIS	KAN	MER	SBU	SHW	WBU
<i>Protaphorura pseudovanderdrifti</i>	0	139	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudisotoma sensibilis</i>	0	0	40	0	0	0	5	0
<i>Pseudosinella alba</i>	4	24	0	0	0	0	177	0
<i>Pseudosinella immaculata</i>	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Pseudosinella octopunctata</i>	0	0	0	0	0	0	8	0
<i>Sminthurides hyogramme</i>	0	14	0	0	0	0	0	0
<i>Sminthurinus aureus</i>	21	22	125	152	175	40	5	818
<i>Sminthurinus elegans</i>	0	0	24	0	0	10	84	0
<i>Sminthurinus similitortus</i>	10	0	0	0	0	25	0	0
<i>Sphyrotheca aleta</i>	60	0	0	0	4	14	0	0
<i>Supraphorura furcifera</i>	54	0	35	0	0	0	0	31
<i>Tomocerina purpurithora</i>	0	6	0	14	0	0	0	0
<i>Willemia anophthalma</i>	0	0	11	0	0	0	0	0
<i>Willemia denisi</i>	0	82	93	32	0	0	0	69
<i>Xenylla mediterranea</i>	0	0	7	11	0	0	0	0
Anzahl ASV/Taxa	25	33	28	24	15	14	30	21

B Vergleich der Artengemeinschaft pro Methode und Standort

B.1 Regenwürmer

B.1.1 ALM: Almesbach Stallkoppel (Weiden i.d. Oberpfalz), Bayern

Abbildung 55: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden



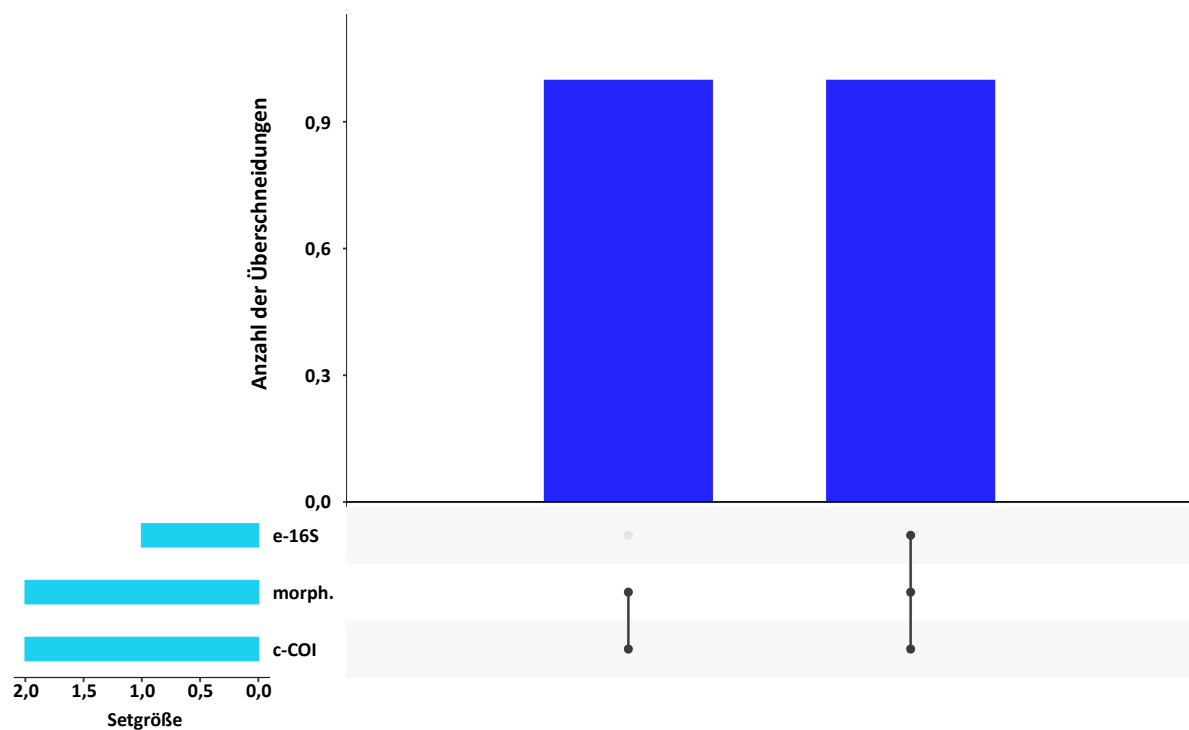
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 63: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Allolobophora chlorotica</i>		*	*
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea longa</i>		*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	*
<i>Lumbricus rubellus</i>		*	*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*	
<i>Octolasion cyaneum</i>		*	*
Summe	3	7	6

B.1.2 BIM: Bad Bramsted (Bimöhlen), Schleswig-Holstein

Abbildung 56: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden



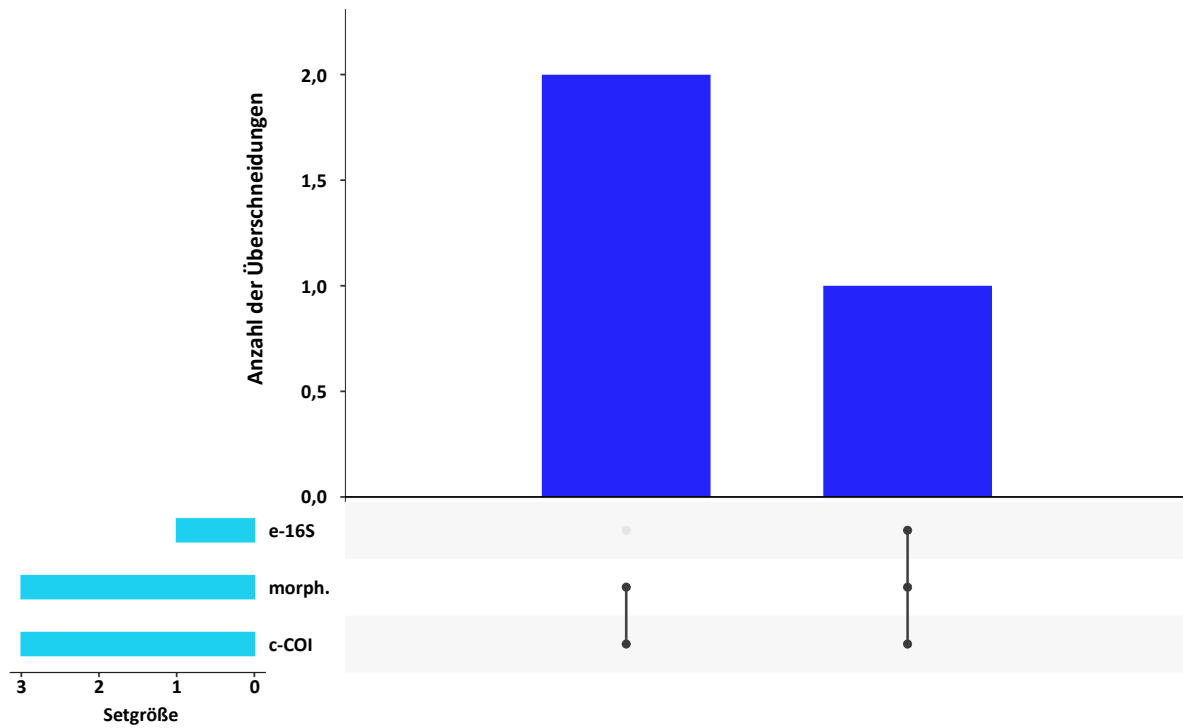
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 64: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*	
Summe	2	2	1

B.1.3 BOV: Bovenden, Niedersachsen

Abbildung 57: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden



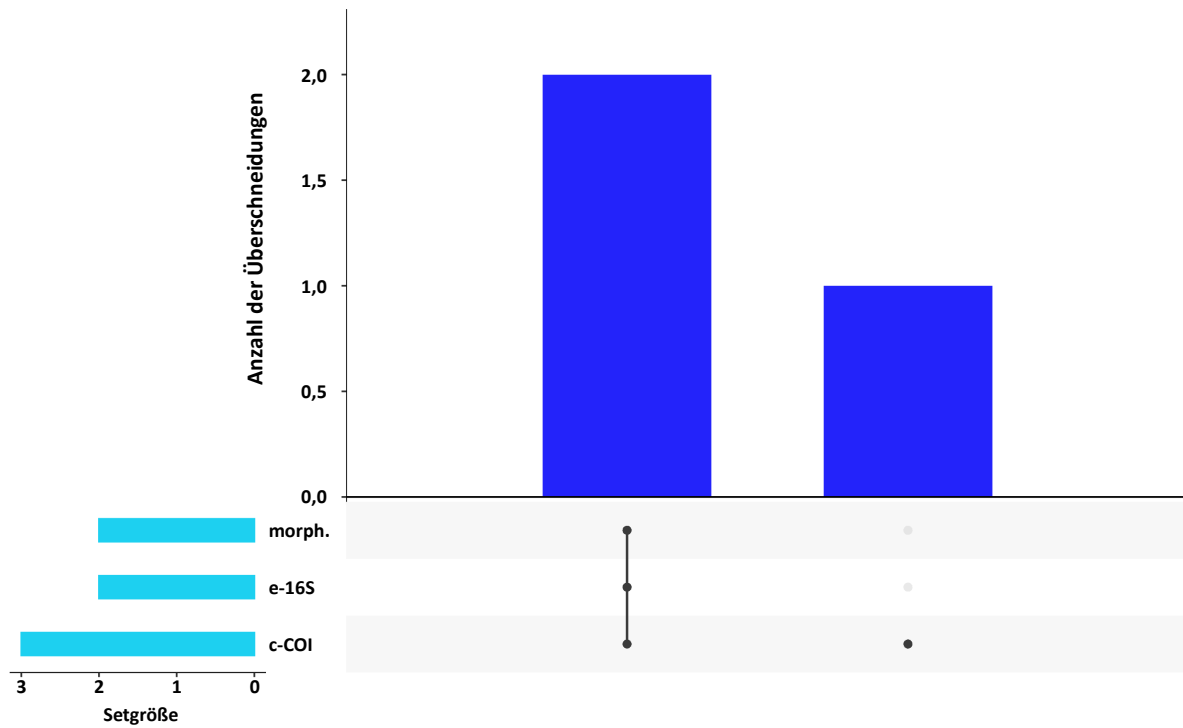
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 65: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	
<i>Octolasion cyaneum</i>	*	*	
Summe	3	3	1

B.1.4 BRU: Bruchsal (Forst), Baden-Württemberg

Abbildung 58: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden



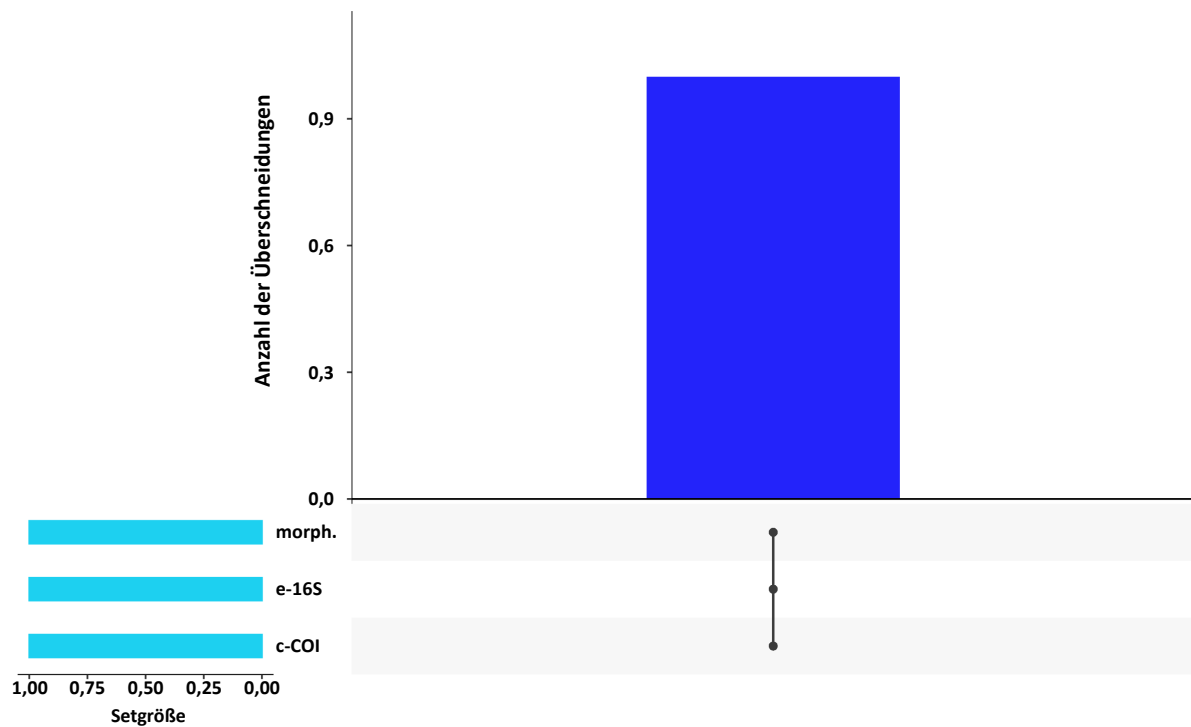
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 66: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Allolobophora chlorotica</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea longa</i>		*	
Summe	2	3	2

B.1.5 EUT: Wüstenfelde (Eutin), Schleswig-Holstein

Abbildung 59: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden



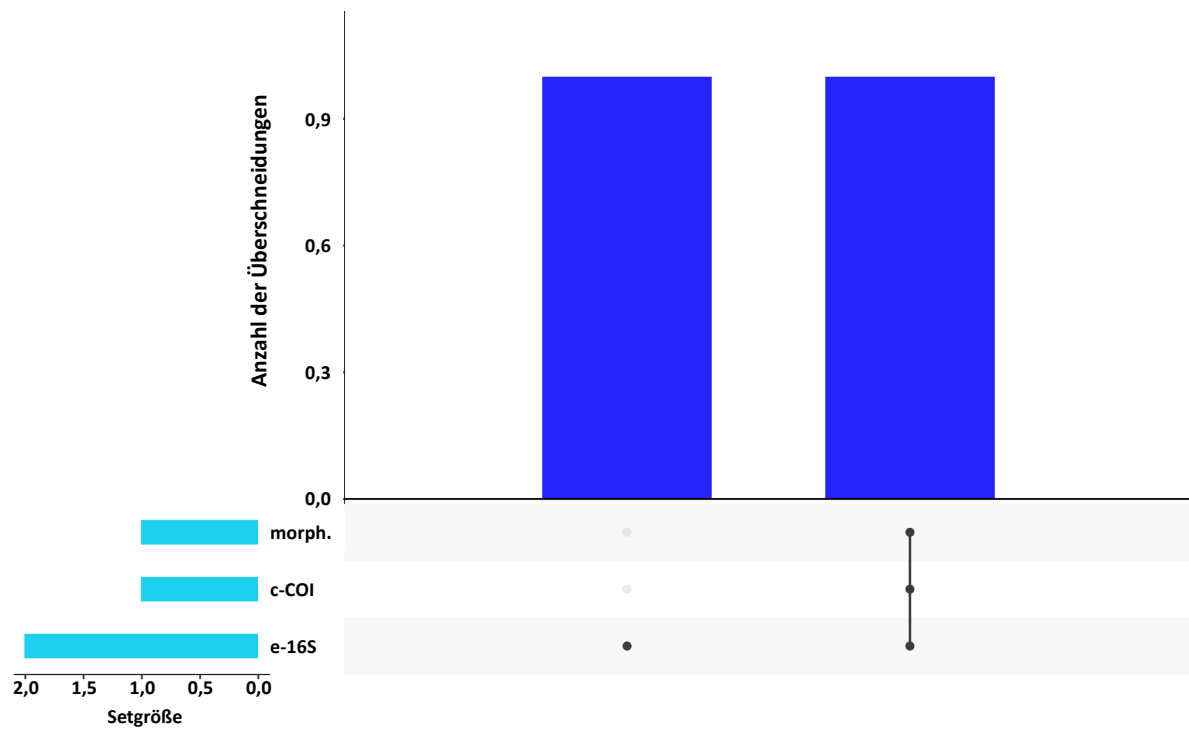
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 67: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	*	*	*
Summe	1	1	1

B.1.6 FIS: Fichte Süd (Monschau), Nordrhein-Westfalen

Abbildung 60: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden



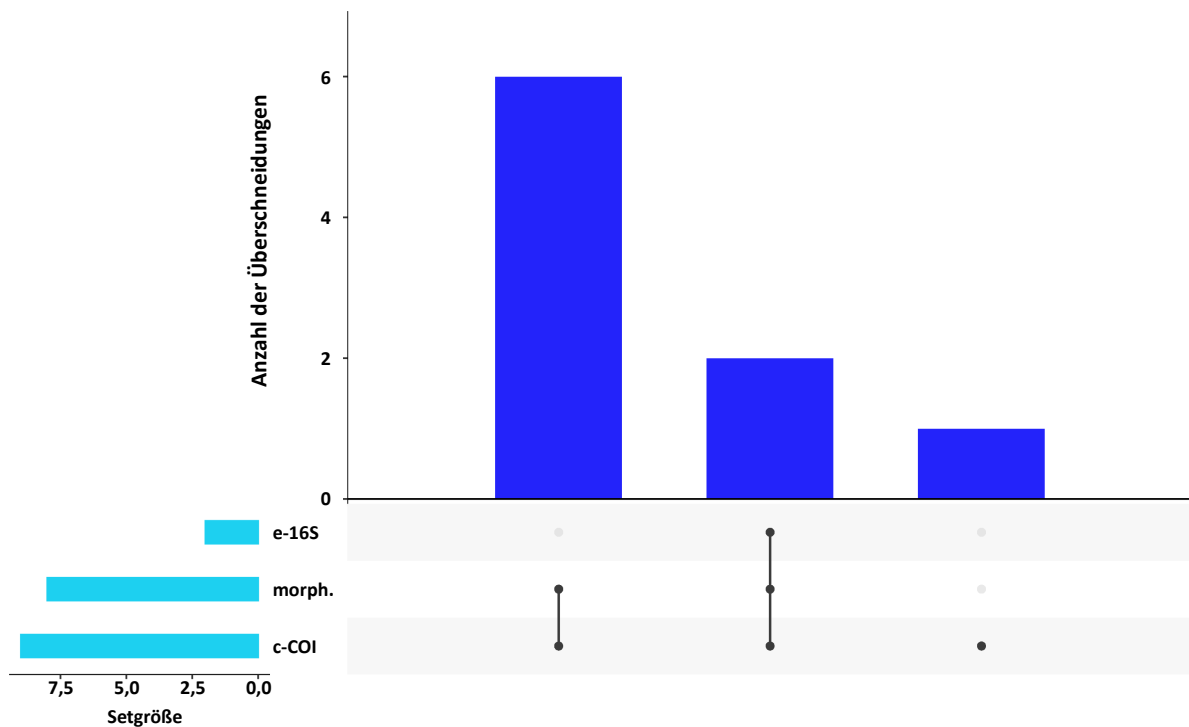
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 68: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Dendrobaena octaedra</i>			*
<i>Lumbricus rubellus</i>	*	*	*
Summe	1	1	2

B.1.7 GAL: Galgenberg (Elbingerode), Sachsen-Anhalt

Abbildung 61: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden



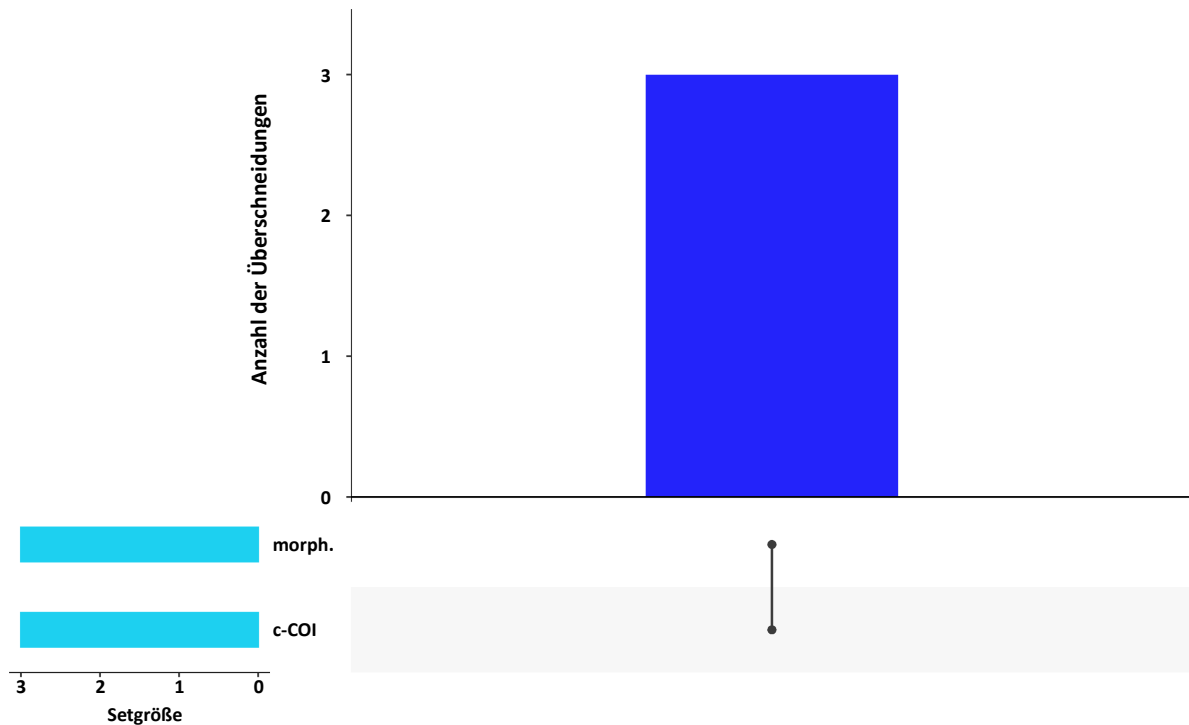
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 69: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Allolobophora chlorotica</i>	*	*	
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea longa</i>	*	*	
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	*
<i>Lumbricus castaneus</i>		*	
<i>Lumbricus rubellus</i>	*	*	
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*	
<i>Octolasion cyaneum</i>	*	*	
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	*	*	
Summe	8	9	2

B.1.8 GHU: Großenhül In der Huh (Thurnau), Bayern

Abbildung 62: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.) und durch COI comDNA-Metabarcoding in der GHU-Probenahmestelle identifiziert wurden



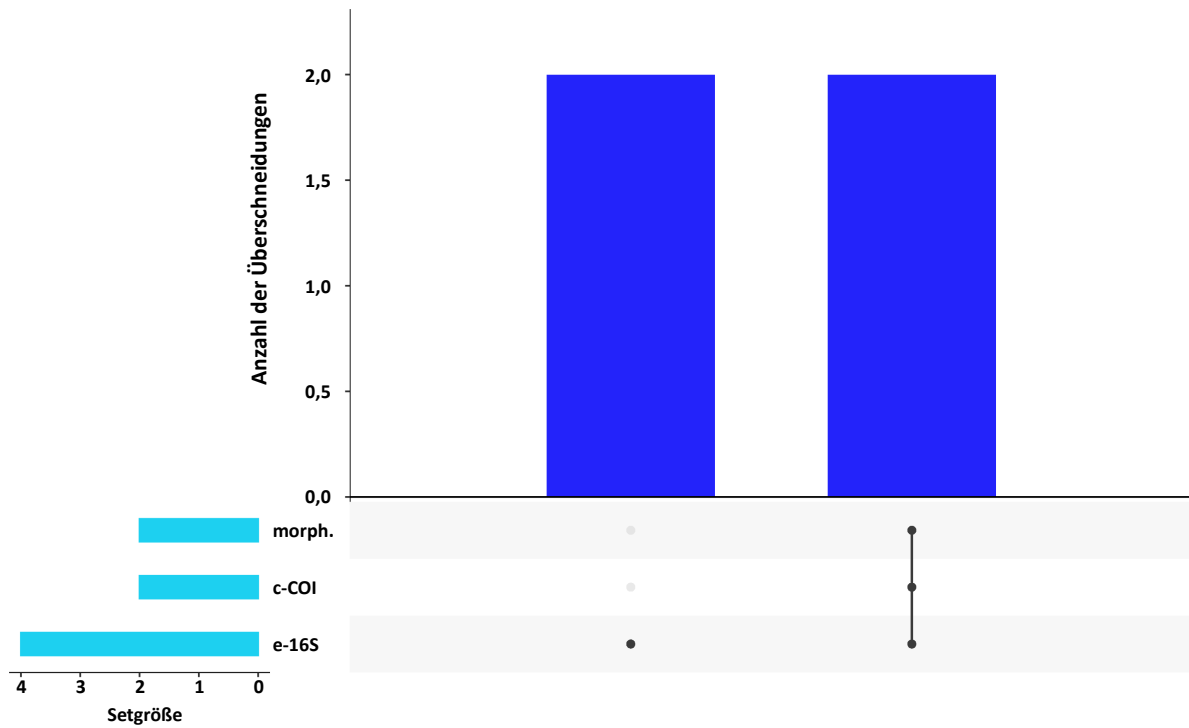
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 70: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung und durch comDNA-Metabarcoding in der GHU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*
Summe	3	3

B.1.9 KAN: Kandel/Schaidt, Rheinland-Pfalz

Abbildung 63: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden



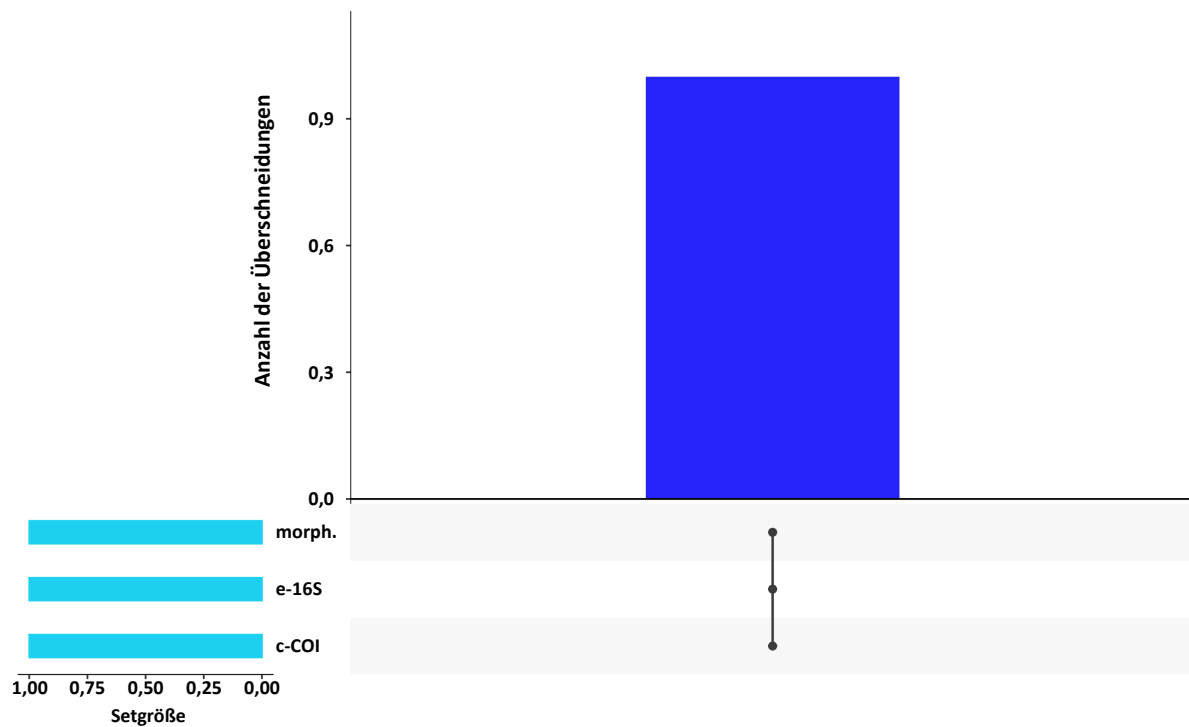
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 71: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Dendrobaena octaedra</i>	*	*	*
<i>Dendrobaena pygmaea</i>			*
<i>Dendrodrilus rubidus</i>			*
<i>Lumbricus rubellus</i>	*	*	*
Summe	2	2	4

B.1.10 KLK: Klein-Krauscha (Neißeau), Sachsen

Abbildung 64: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden



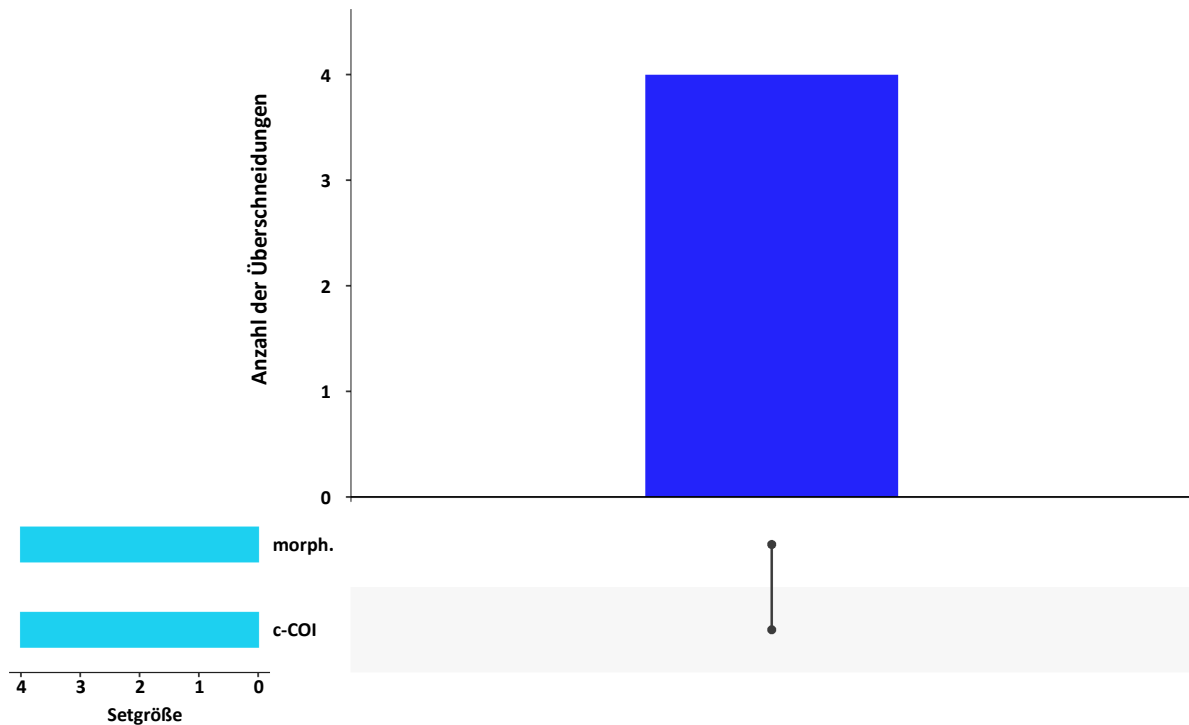
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 72: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
Summe	1	1	1

B.1.11 KUM: Kümmelwiese (Braunlage), Sachsen-Anhalt

Abbildung 65: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.) und durch COI comDNA-Metabarcoding in der KUM-Probenahmestelle identifiziert wurden



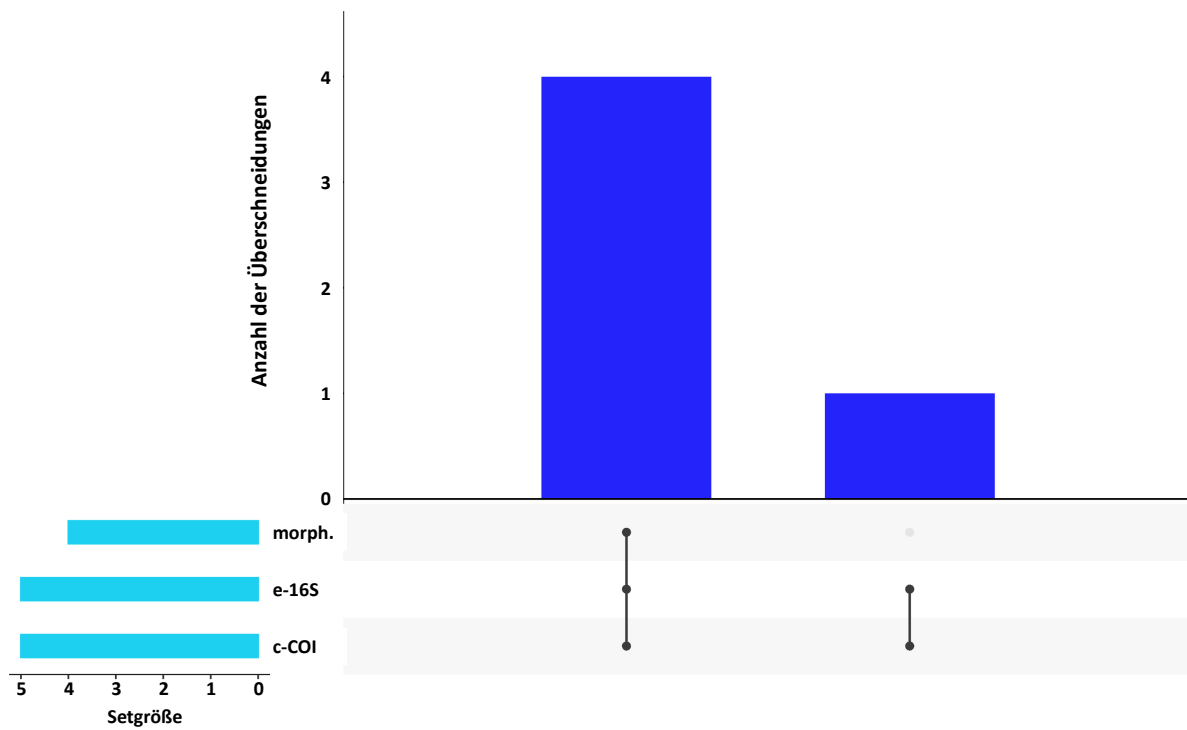
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 73: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung und durch comDNA-Metabarcoding in der KUM-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*
<i>Octolasion cyaneum</i>	*	*
Summe	4	4

B.1.12 LIS: Saarlouis-Lisdorf, Saarland

Abbildung 66: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 74: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Allolobophora chlorotica</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea icterica</i>		*	*
<i>Aporrectodea longa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	*
Summe	4	5	5

B.1.13 MER: Merzalben, Rheinland-Pfalz

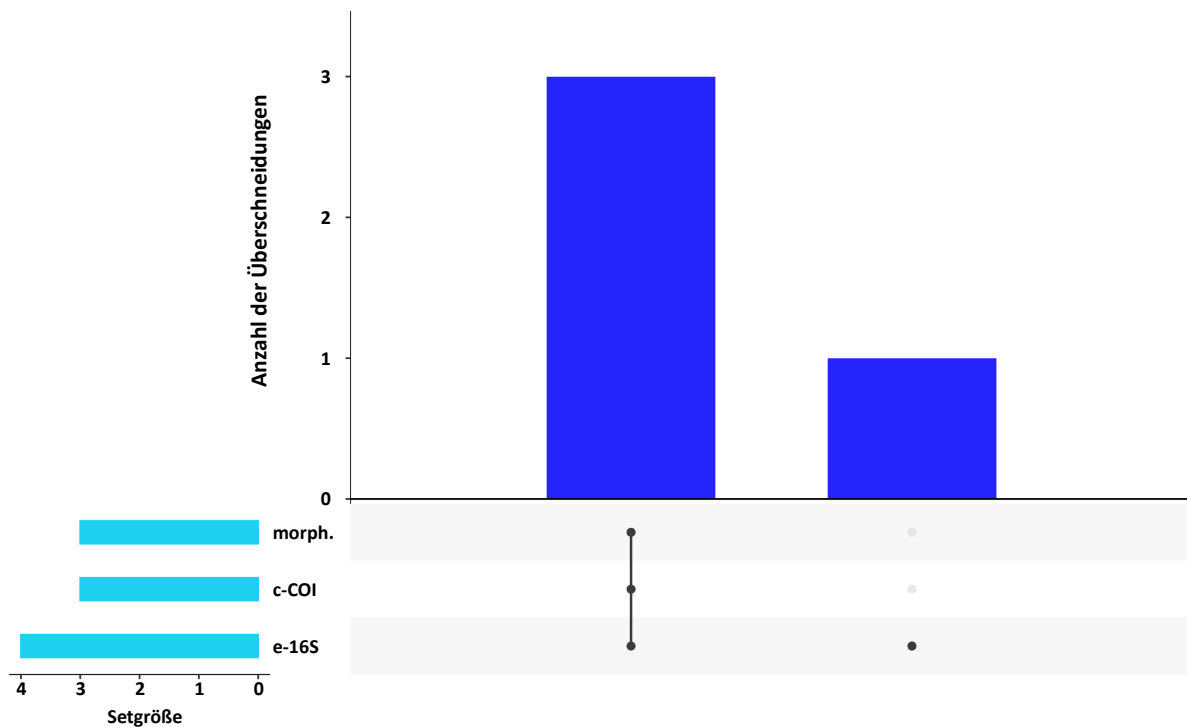
Da an diesem Standort keine Individuen gefangen wurden und damit keine Daten zur morphologischen Bestimmung und dem comDNA-Metabarcoding vorlagen, wurde auf die Erstellung eines UpSet-Diagramms verzichtet.

Tabelle 75: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Lumbricus rubellus</i>			*
Summe	0	0	1

B.1.14 NEU: Neuhäuserfelde (Neuhaus), Niedersachsen

Abbildung 67: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden



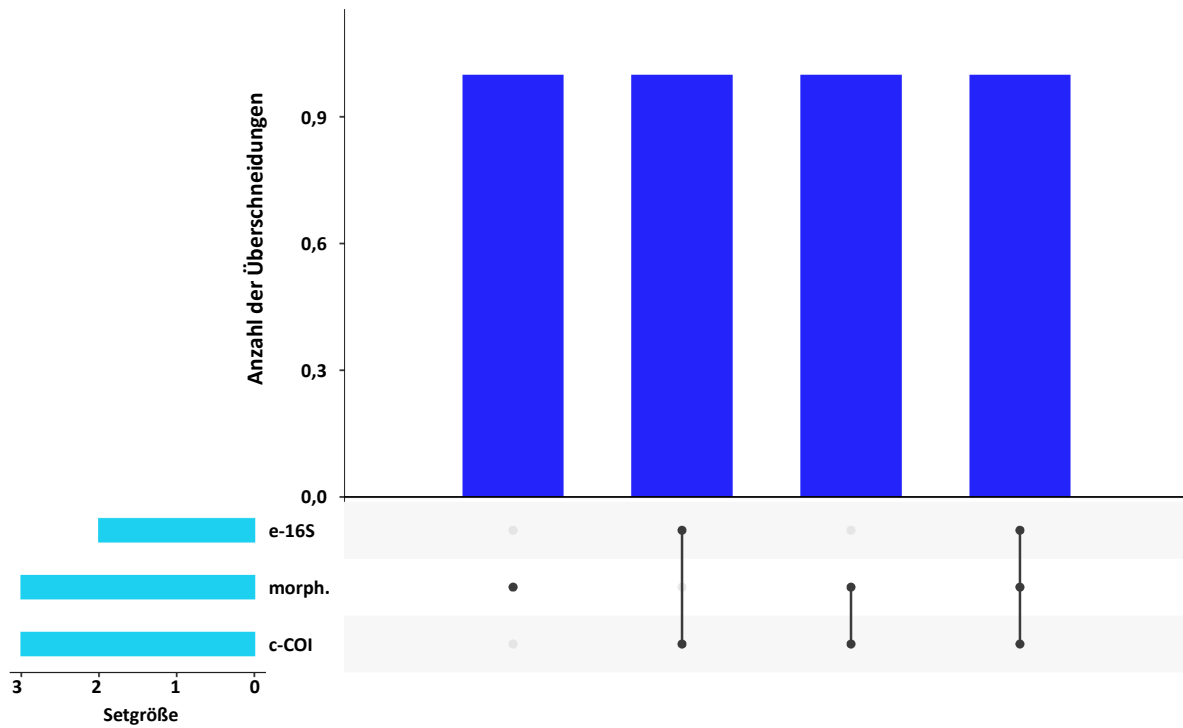
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 76: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Allolobophora chlorotica</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>			*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*	*
Summe	3	3	4

B.1.15 PAU: Paulinenaue, Brandenburg

Abbildung 68: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden



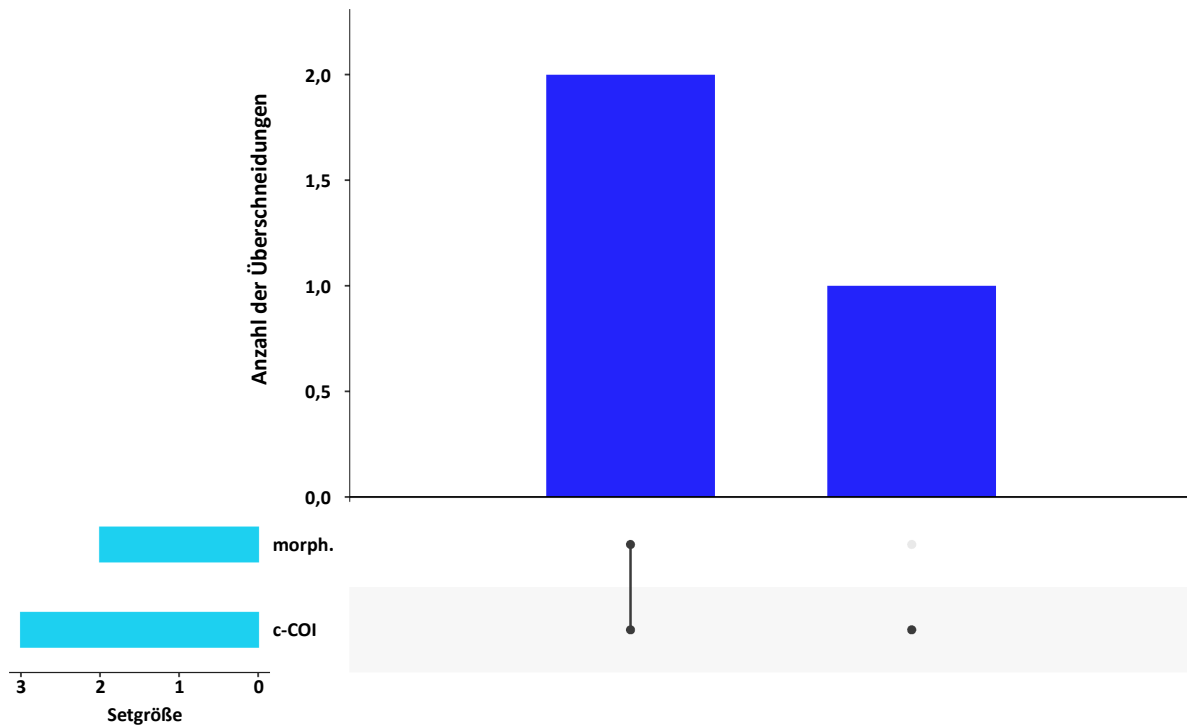
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 77: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Allolobophora chlorotica</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea caliginosa</i>		*	*
<i>Aporrectodea longa</i>	*		
<i>Lumbricus rubellus</i>	*	*	
Summe	3	3	2

B.1.16 POS: Possen (Sondershausen), Thüringen

Abbildung 69: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.) und durch COI comDNA-Metabarcoding in der POS-Probenahmestelle identifiziert wurden



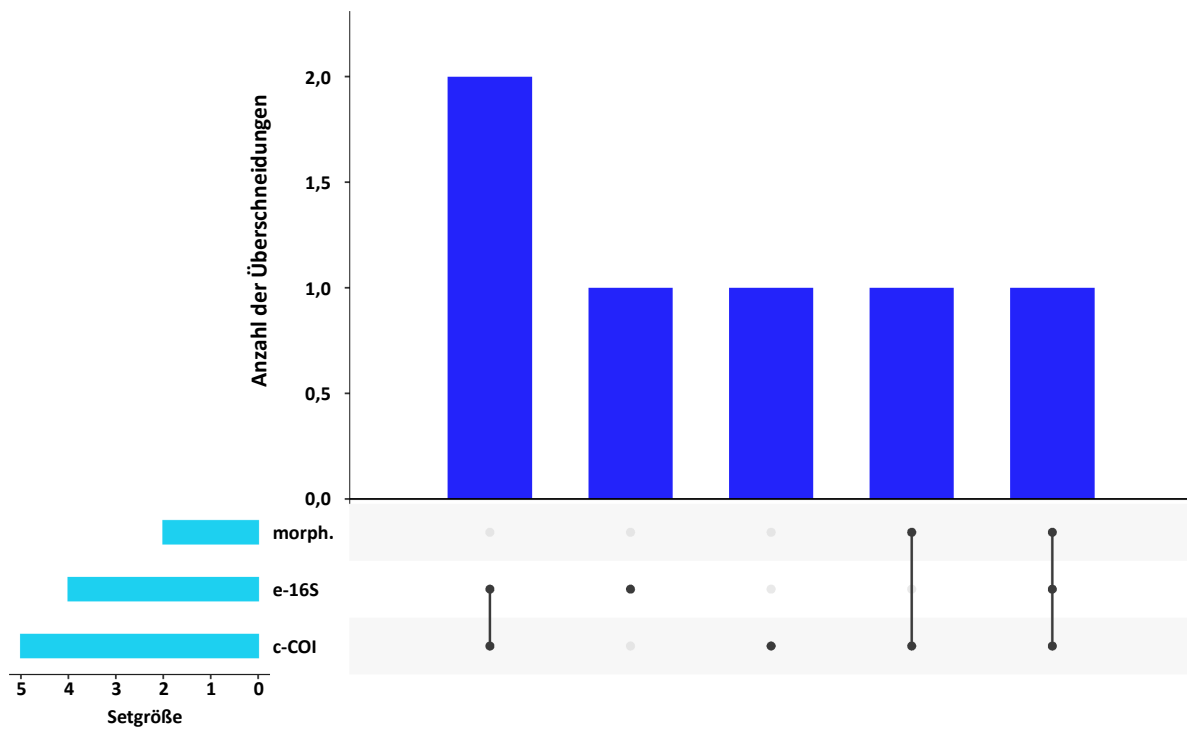
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 78: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung und durch comDNA-Metabarcoding in der POS-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>		*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*
Summe	2	3

B.1.17 SBU: Schlegeler Buchberg (Zittau-Schlegel), Sachsen

Abbildung 70: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden



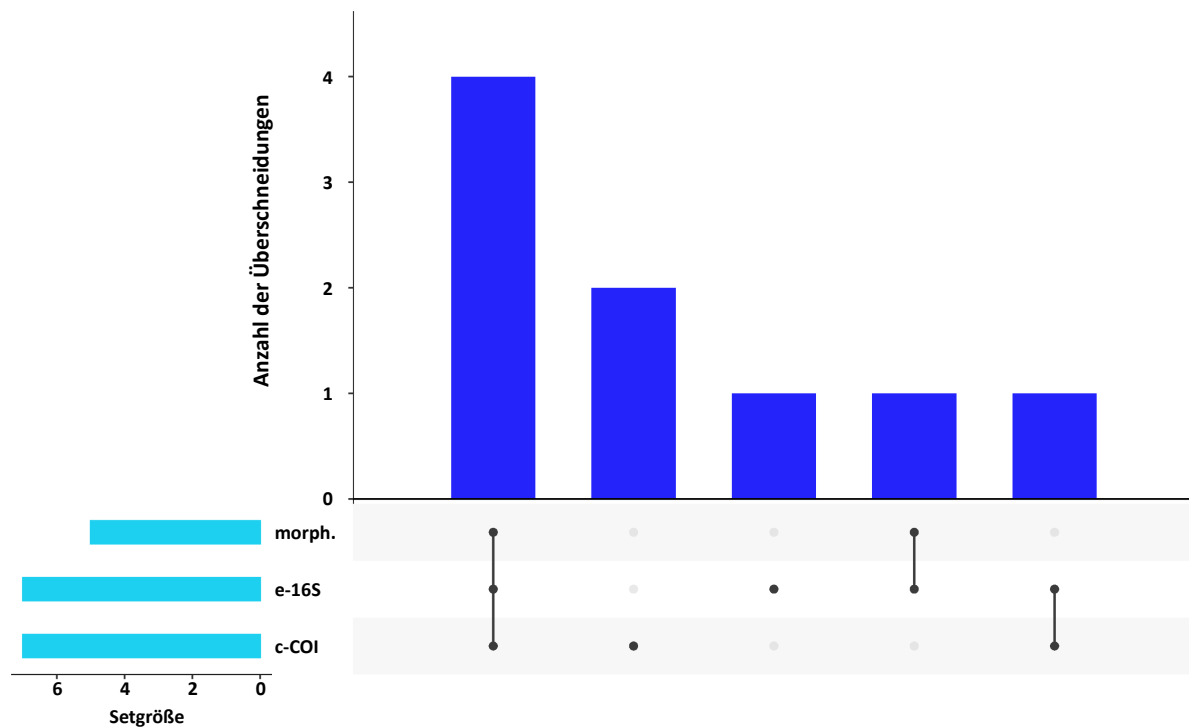
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 79: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Allolobophora chlorotica</i>		*	
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Dendrodrilus rubidus</i>			*
<i>Lumbricus castaneus</i>	*	*	
<i>Lumbricus rubellus</i>		*	*
<i>Lumbricus terrestris</i>		*	*
Summe	2	5	4

B.1.18 SHG: Schwanheim II (Kelsterbach), Hessen

Abbildung 71: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden



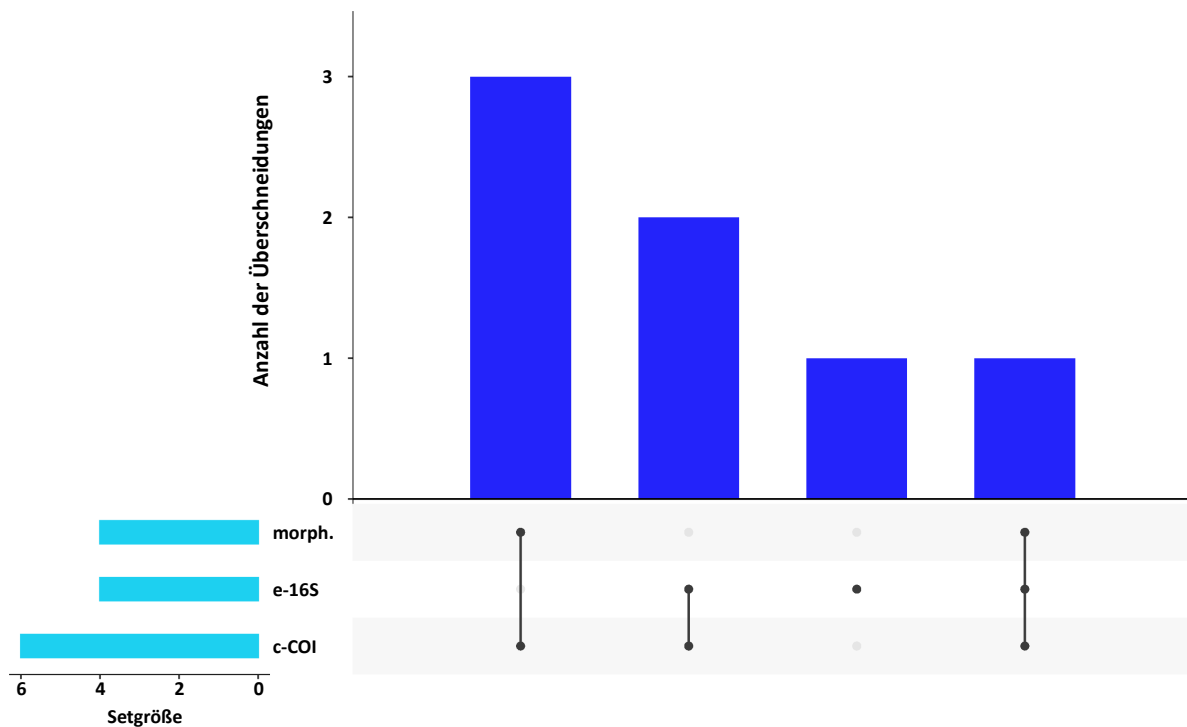
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 80: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Allolobophora chlorotica</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea caliginosa</i>		*	*
<i>Aporrectodea longa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	*
<i>Dendrobaena attemsi</i>		*	
<i>Lumbricus castaneus</i>			*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*	*
<i>Proctodrilus antipae</i>	*		*
<i>Proctodrilus tuberculatus</i>		*	
Summe	5	7	7

B.1.19 SHW: Schwanheim 1 (Kelsterbach), Hessen

Abbildung 72: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden



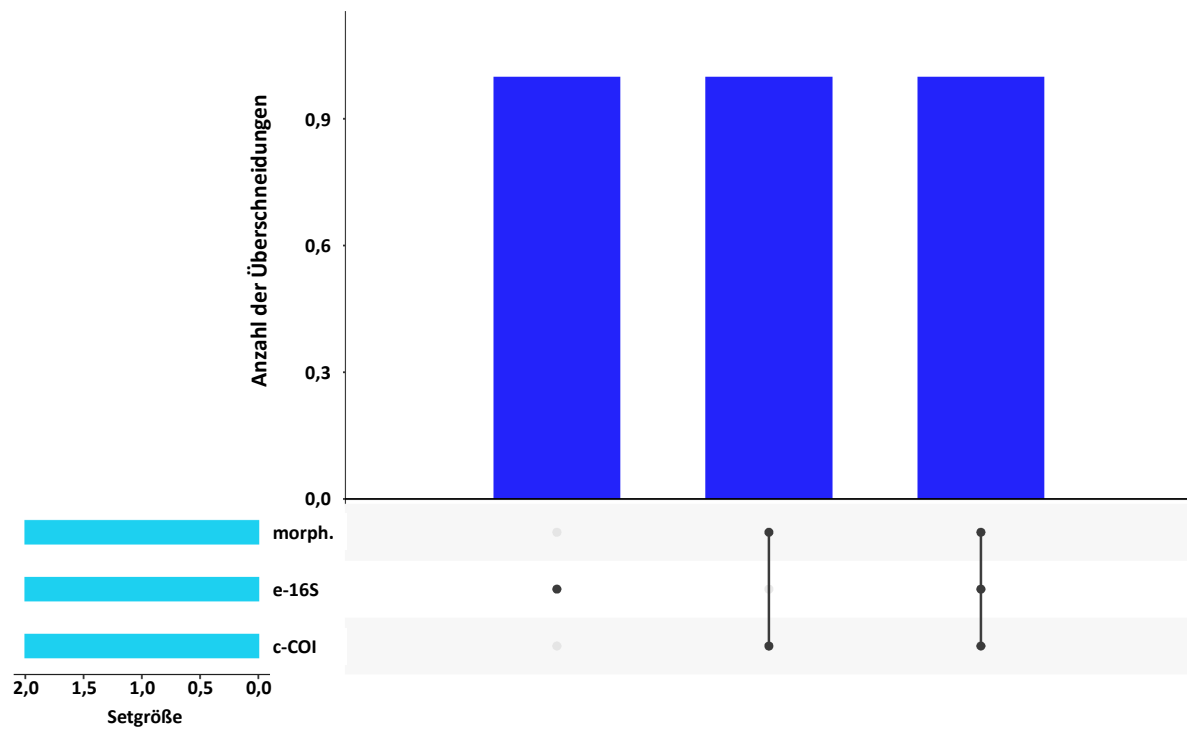
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 81: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	
<i>Lumbricus castaneus</i>			*
<i>Lumbricus rubellus</i>		*	*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*	
<i>Octolasion cyaneum</i>	*	*	
<i>Octolasion tyrtaeum</i>		*	*
Summe	4	6	4

B.1.20 SLT: Sülstorf, Mecklenburg-Vorpommern

Abbildung 73: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden



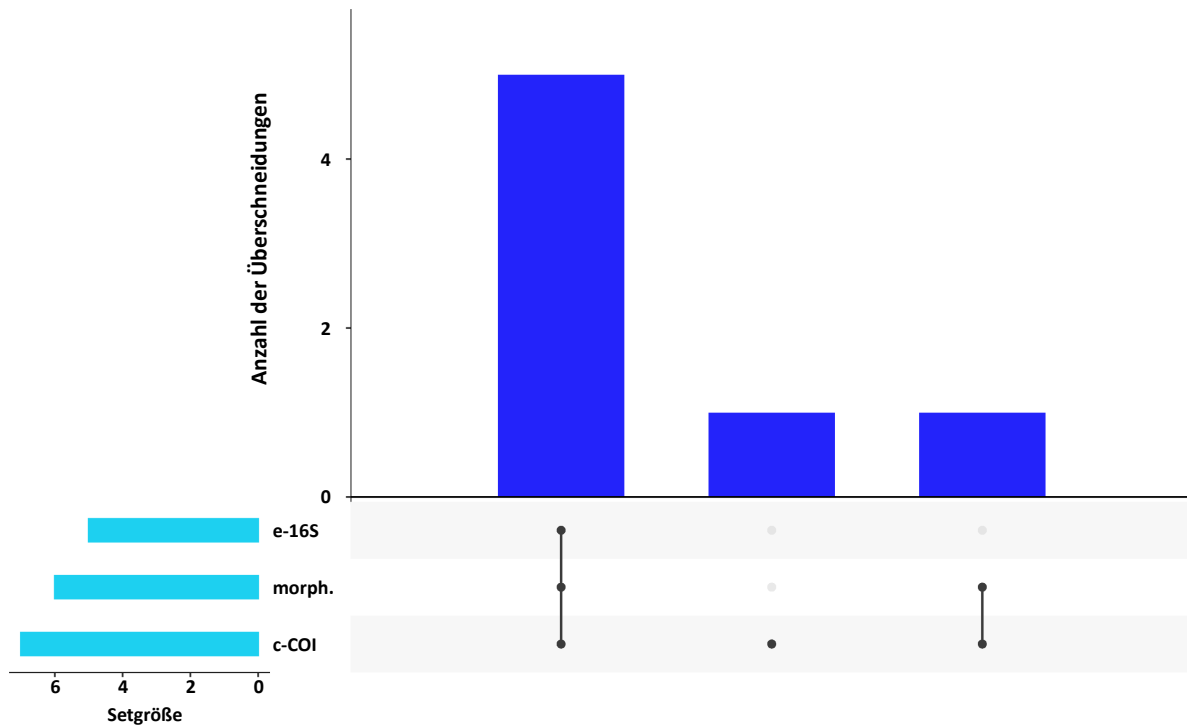
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 82: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Dendrobaena octaedra</i>			*
<i>Lumbricus rubellus</i>	*	*	
Summe	2	2	2

B.1.21 TRO: Trochtingen, Baden-Württemberg

Abbildung 74: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden



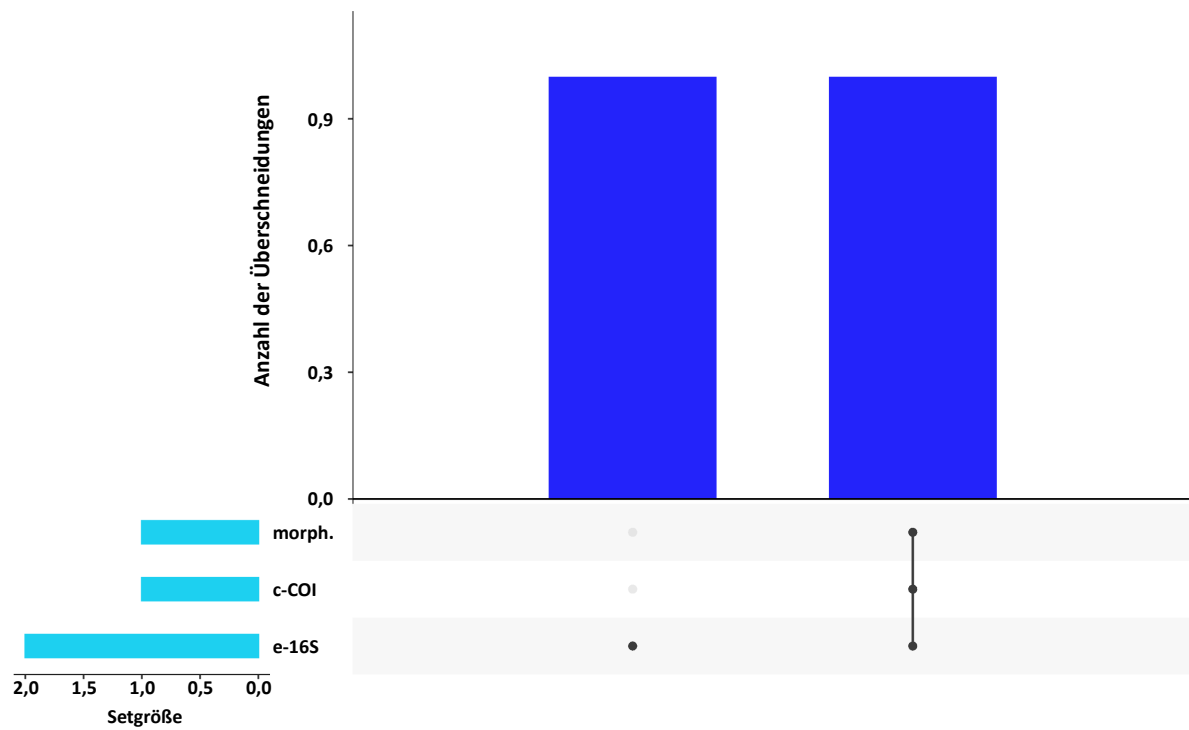
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 83: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Allolobophora chlorotica</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea longa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	*
<i>Lumbricus castaneus</i>		*	
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*	*
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	*	*	
Summe	6	7	5

B.1.22 WBU: Wächterbuche (Monschau), Nordrhein-Westfalen

Abbildung 75: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden



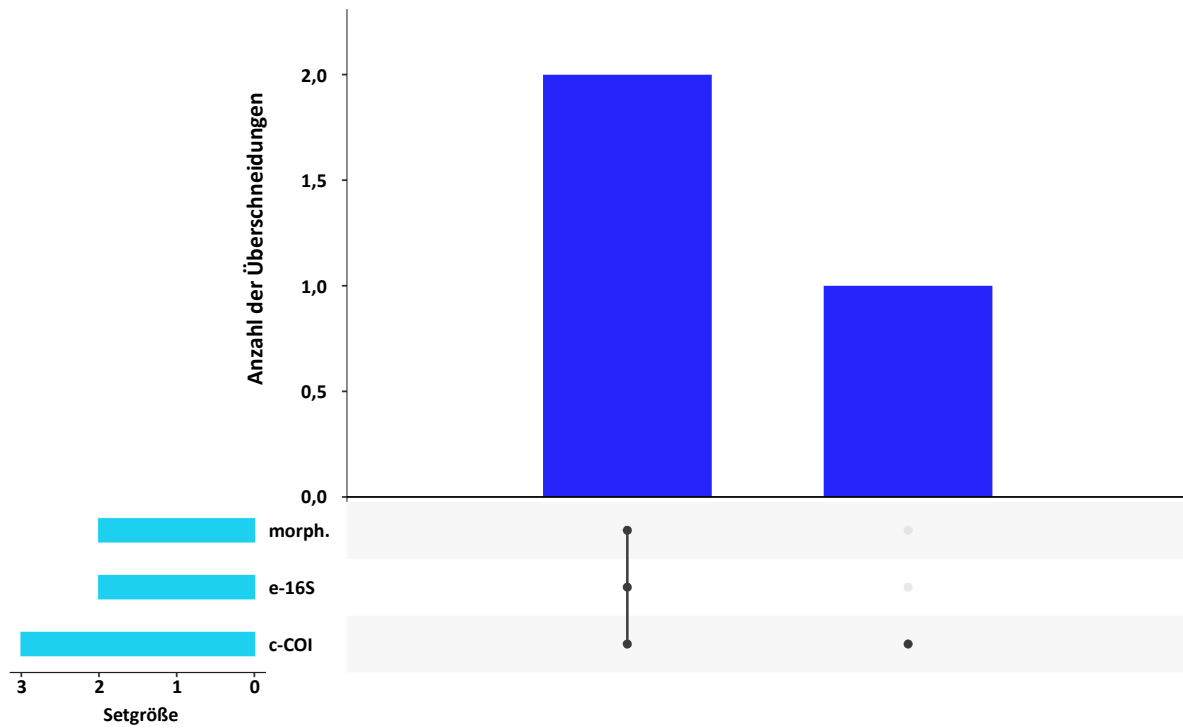
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 84: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Aporrectodea longa</i>			*
<i>Dendrobaena attemsi</i>	*	*	*
Summe	1	1	2

B.1.23 WOL: Wolferschwenda, Thüringen

Abbildung 76: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden



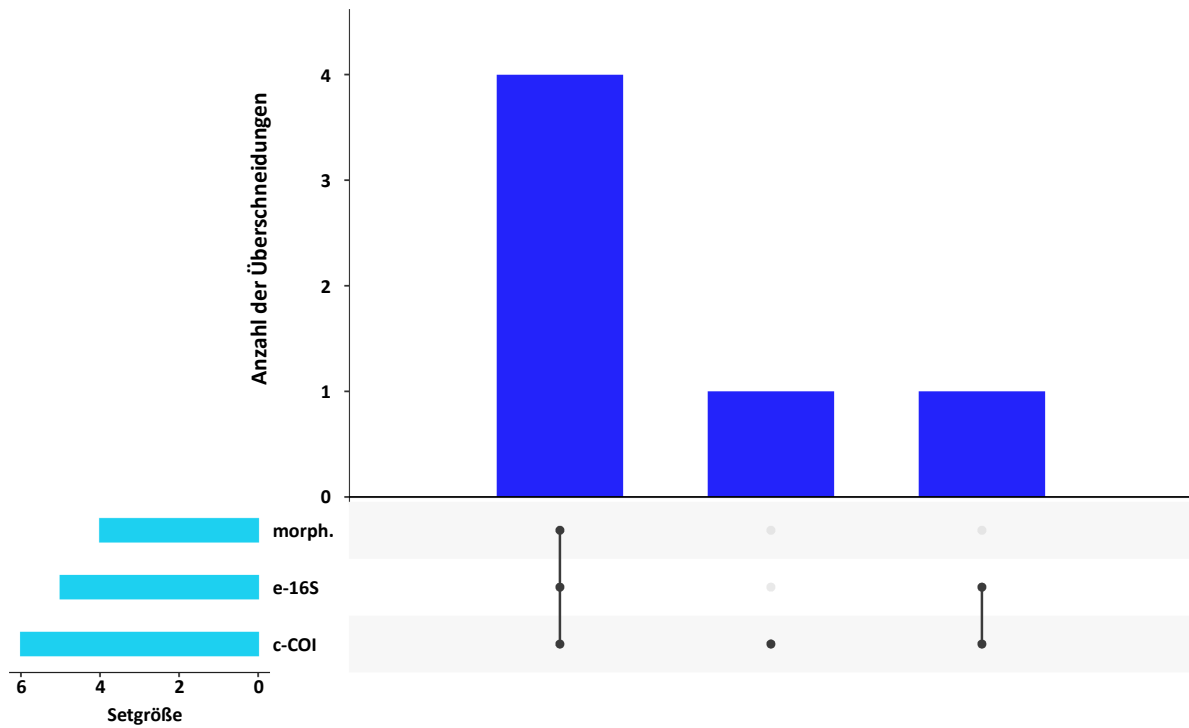
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 85: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*	*
<i>Octolasion cyaneum</i>		*	
Summe	2	3	2

B.1.24 ZEC: Zeckerin, Brandenburg

Abbildung 77: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden



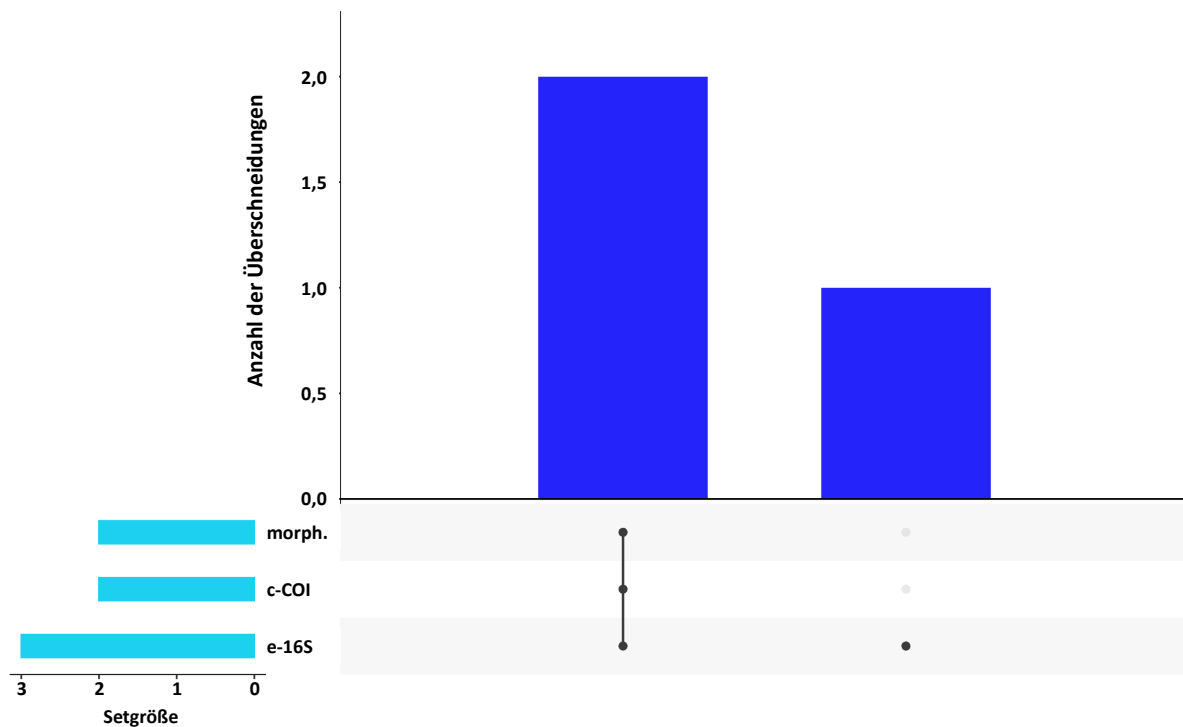
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 86: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea longa</i>	*	*	*
<i>Aporrectodea rosea</i>	*	*	*
<i>Lumbricus rubellus</i>		*	*
<i>Lumbricus terrestris</i>	*	*	*
<i>Octolasion tyrtaeum</i>		*	
Summe	4	6	5

B.1.25 ZIN: Zingst, Mecklenburg-Vorpommern

Abbildung 78: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Lumbricidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch 16S eDNA-Metabarcoding (e-16S) in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

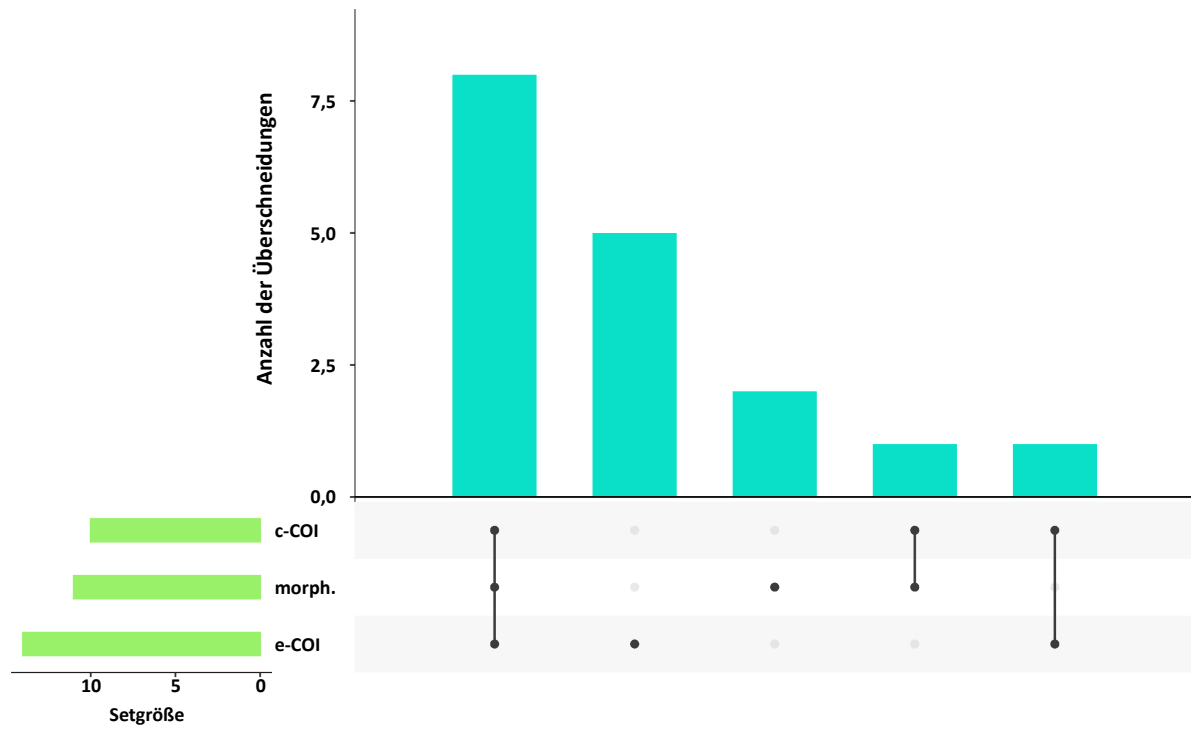
Tabelle 87: Lumbricidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	*	*	*
<i>Dendrobaena octaedra</i>			*
<i>Lumbricus rubellus</i>	*	*	*
Summe	2	2	3

B.2 Enchytraeiden

B.2.1 ALM: Almesbach Stallkoppel (Weiden i.d. Oberpfalz), Bayern

Abbildung 79: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden



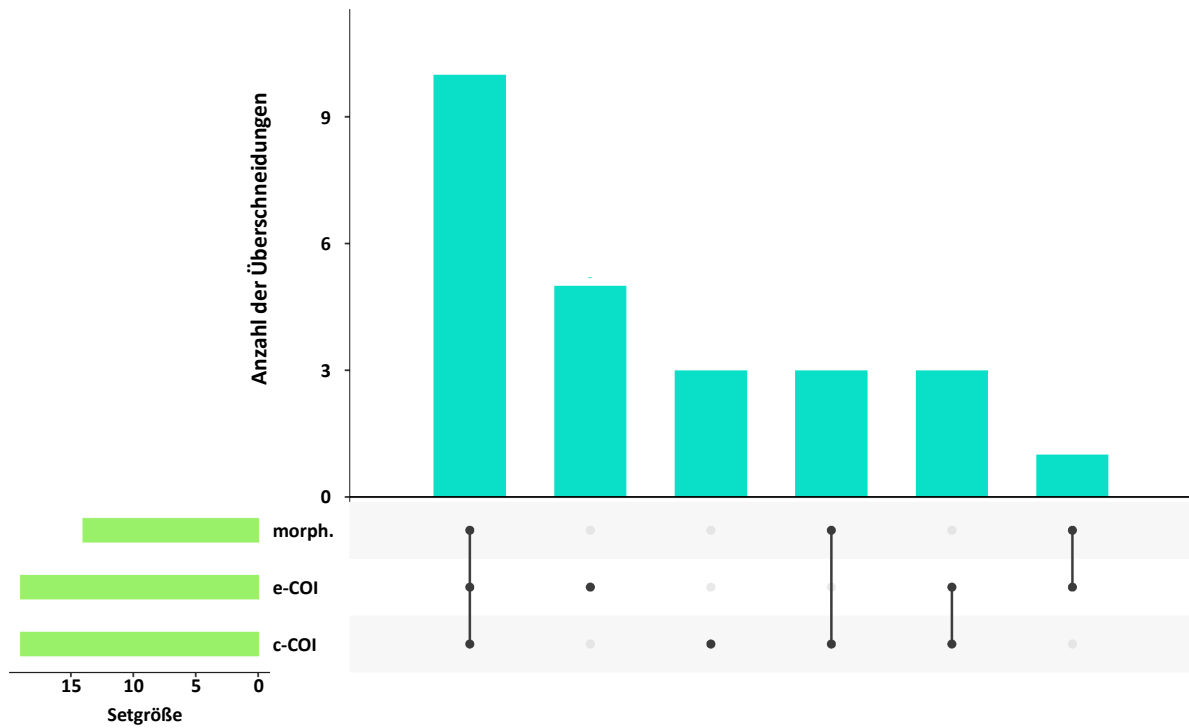
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 88: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Buchholzia appendiculata</i>			*
<i>Enchytraeidae</i> sp. BG		*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus dicaetus</i>	*	*	
<i>Enchytraeus lacteus</i>	*	*	*
<i>Fridericia bisetosa</i>			*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia deformis</i>			*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	*
<i>Fridericia hegemon</i>	*		
<i>Fridericia paroniana</i>	*	*	*
<i>Fridericia perrieri</i>			*
<i>Fridericia ratzeli</i>	*	*	*
<i>Fridericia</i> sp. (MACF)	*		
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	*
<i>Marionina communis</i>			*
Summe	11	10	14

B.2.2 BIM: Bad Bramsted (Bimöhlen), Schleswig-Holstein

Abbildung 80: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden



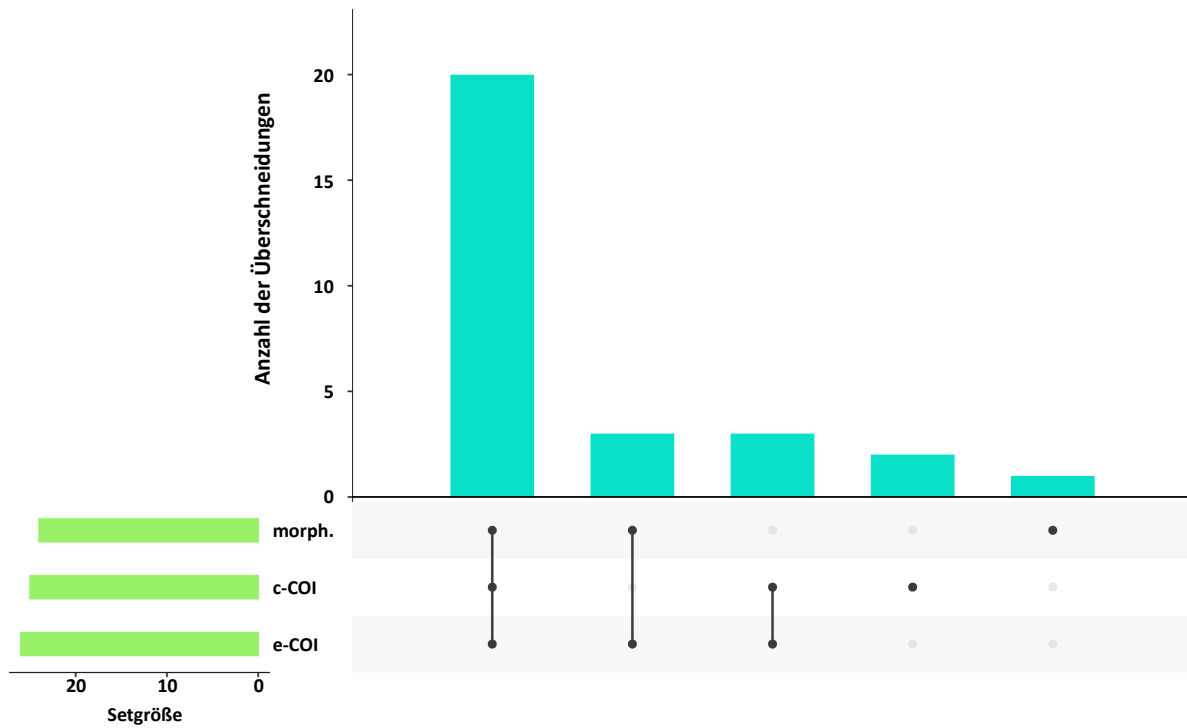
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 89: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>			*
<i>Achaeta camerani</i>			*
<i>Achaeta unibulba</i>			*
<i>Achaeta</i> sp. (HEAL)	*	*	*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*		*
<i>Buchholzia</i> sp. (BNBN)		*	
<i>Cognettia chlorophila</i>			*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	
<i>Enchytraeus dichaeus</i>	*	*	*
<i>Enchytronia christenseni</i>		*	*
<i>Enchytronia holochaeta</i>	*	*	*
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	
<i>Fridericia christeri</i>		*	
<i>Fridericia granosa</i>		*	*
<i>Fridericia lenta</i>	*	*	*
<i>Fridericia paroniana</i>	*	*	*
<i>Fridericia schmelzi</i>		*	
<i>Hemifridericia parva</i>			*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	
<i>Marionina argentea</i>	*	*	*
<i>Marionina communis</i>	*	*	*
<i>Oconnorella cambrensis</i>		*	*
Summe	14	19	19

B.2.3 BOV: Bovenden, Niedersachsen

Abbildung 81: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

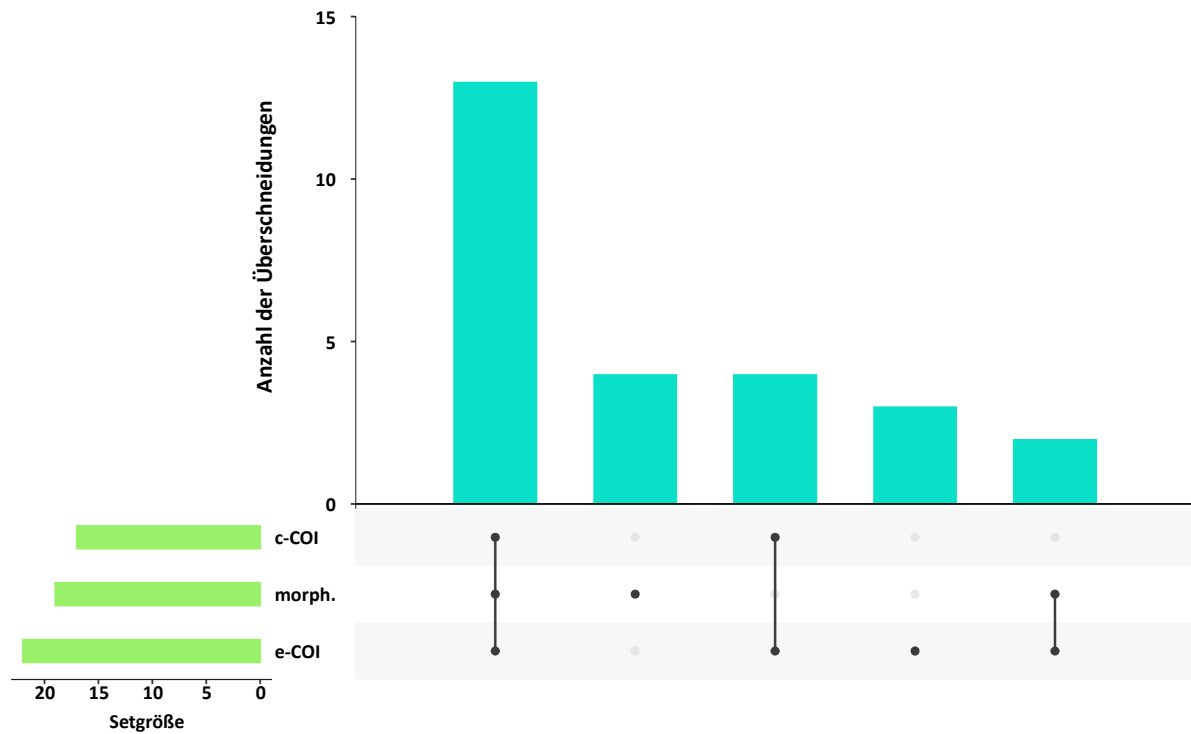
Tabelle 90: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	*
<i>Achaeta danica</i>		*	*
<i>Achaeta</i> sp. (PDZW)		*	
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Cernosvitoviella</i>	*		*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus christenseni</i>	*		*
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	*	*	*
<i>Enchytronia holochaeta</i>	*	*	*
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	*		*
<i>Enchytronia</i> sp. (TRIN)	*	*	*
<i>Fridericia benti</i>	*	*	*
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*
<i>Fridericia connata</i>	*	*	*
<i>Fridericia dura</i>		*	*
<i>Fridericia galba</i>		*	
<i>Fridericia paroniana</i>		*	*
<i>Fridericia perrieri</i>	*	*	*
<i>Fridericia</i> sp. (BISY)	*	*	*
<i>Fridericia striata</i>	*	*	*
<i>Fridericia sylvatica</i>	*	*	*
<i>Marionina mendax</i>	*		
<i>Marionina simillima</i>	*	*	*
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>	*	*	*
<i>Oconnorella cambrensis</i>	*	*	*
<i>Oconnorella tubifera</i>	*	*	*
<i>Stercutus niveus</i>	*	*	*
Summe	24	25	26

B.2.4 BRU: Bruchsal (Forst), Baden-Württemberg

Abbildung 82: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden



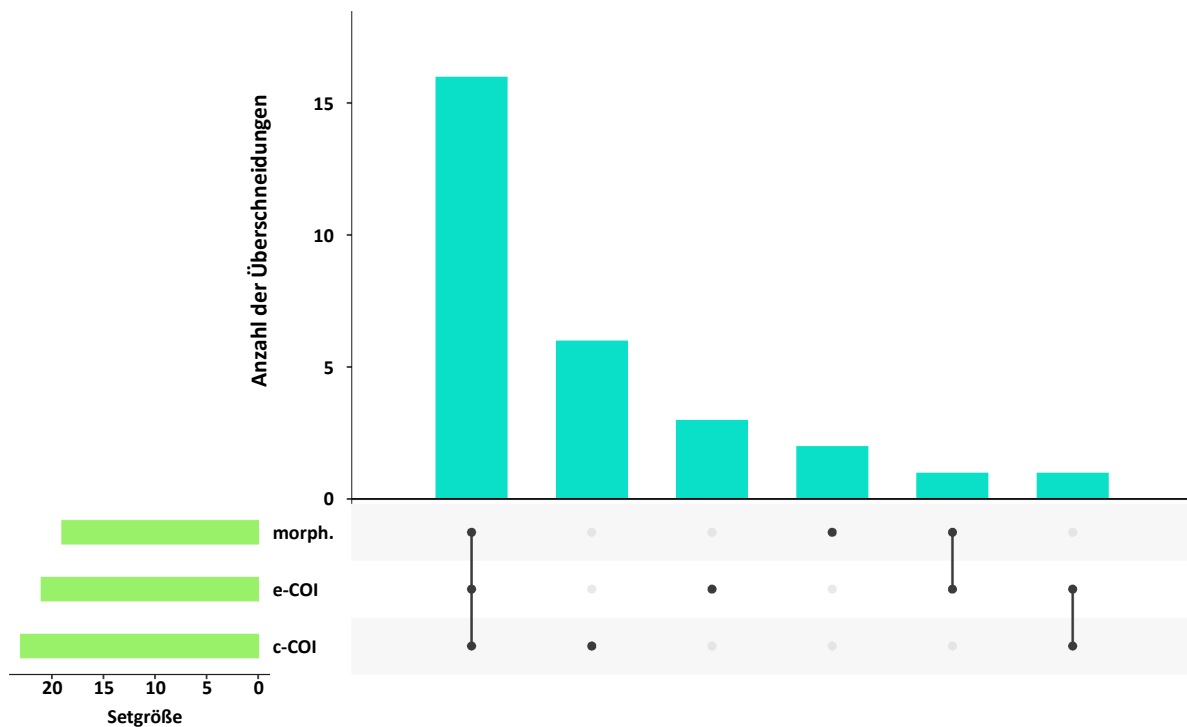
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 91: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta iberica</i>		*	*
<i>Achaeta pannonica</i>	*		
<i>Achaeta urbana</i>	*	*	*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Buchholzia</i> sp. (BNBN)		*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus christenseni</i>		*	*
<i>Enchytronia christenseni</i>	*	*	*
<i>Enchytronia holochaeta</i>			*
<i>Enchytronia parva</i>			*
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia connata</i>	*		*
<i>Fridericia dura</i>	*	*	*
<i>Fridericia hegemon</i>	*		
<i>Fridericia maculatiformis</i>	*		
<i>Fridericia paroniana</i>	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>	*	*	*
<i>Fridericia regularis</i>	*	*	*
<i>Fridericia</i> sp. (BMIN)	*	*	*
<i>Fridericia</i> sp. (OBRU)	*		
<i>Fridericia sphaericoides</i>		*	*
<i>Henlea nasuta</i>	*		*
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	*
<i>Marionina communis</i>			*
Summe	19	17	22

B.2.5 EUT: Wüstenfelde (Eutin), Schleswig-Holstein

Abbildung 83: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

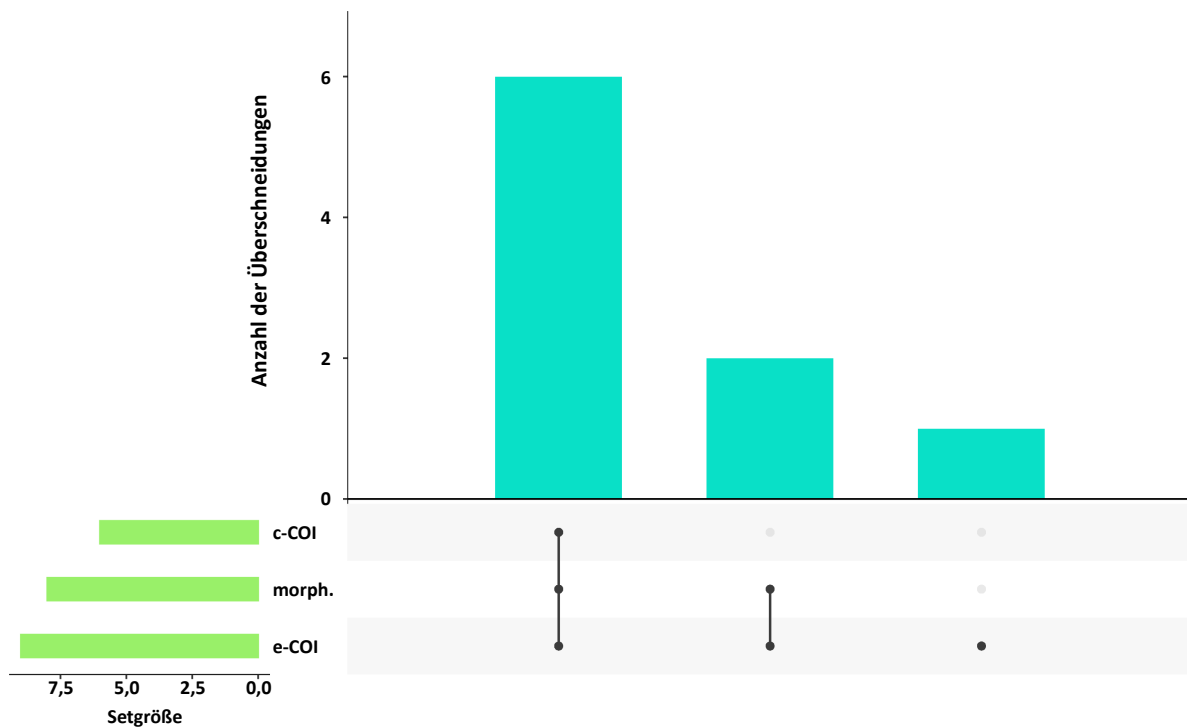
Tabelle 92: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta aberrans</i>			*
<i>Achaeta abulba</i>	*	*	*
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	*
<i>Achaeta danica</i>		*	*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Cognettia cognettii</i>	*	*	*
<i>Cognettia sphagnetorum</i>	*	*	*
<i>Cognettia varisetosa</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus</i> sp. (GRAN)	*		

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Enchytraeus dichaeus</i>		*	
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	*	*	*
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	*	*	*
<i>Fridericia benti</i>	*	*	*
<i>Fridericia bulboides</i>		*	
<i>Fridericia christeri</i>		*	
<i>Fridericia cusanica</i>		*	
<i>Fridericia striata</i>	*	*	*
<i>Henlea perpusilla</i>		*	
<i>Henlea ventriculosa</i>		*	
<i>Marionina clavata</i>	*		
<i>Marionina simillima</i>	*	*	*
<i>Mesenchytraeus armatus</i>			*
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>	*		*
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>			*
<i>Oconnorella cambrensis</i>	*	*	*
<i>Stercutus niveus</i>	*	*	*
Summe	19	23	21

B.2.6 FIS: Fichte Süd (Monschau), Nordrhein-Westfalen

Abbildung 84: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden



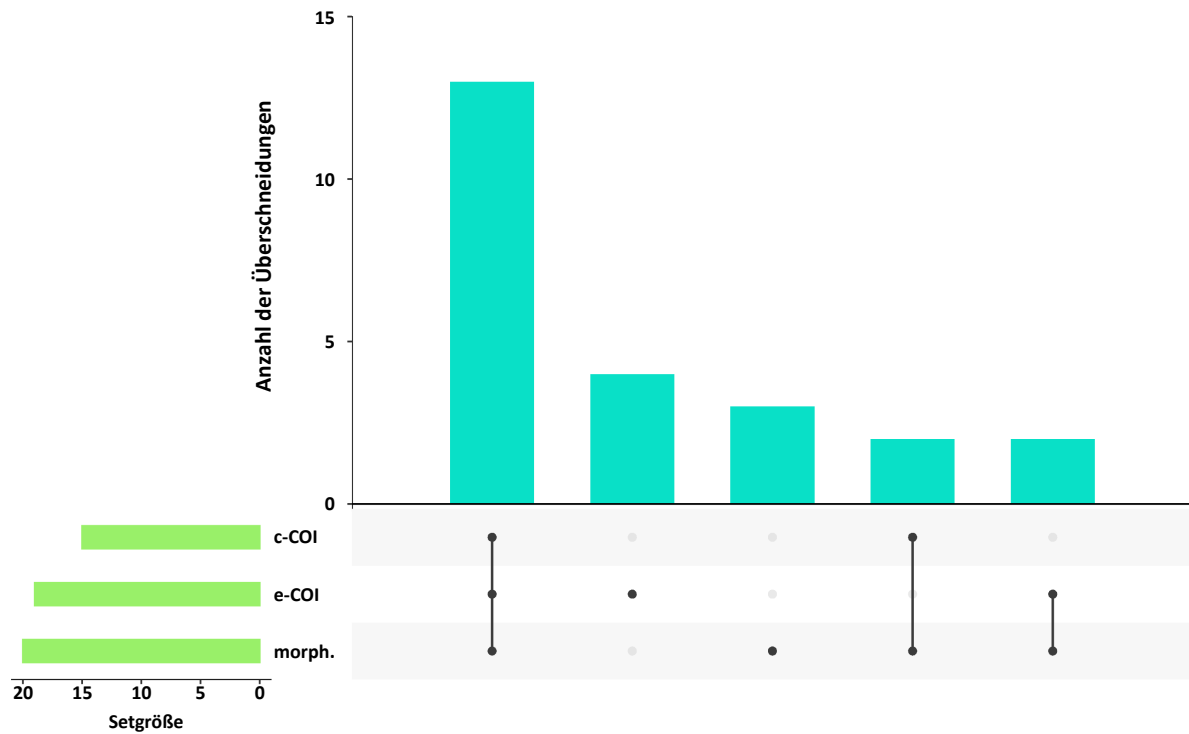
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 93: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	*
<i>Achaeta camerani</i>	*	*	*
<i>Achaeta danica</i>	*	*	*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Cognettia cognettii</i>	*		*
<i>Enchytronia parva</i>	*		*
<i>Marionina clavata</i>	*	*	*
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>			*
<i>Oconnorella cambrensis</i>	*	*	*
Summe	8	6	9

B.2.7 GAL: Galgenberg (Elbingerode), Sachsen-Anhalt

Abbildung 85: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden



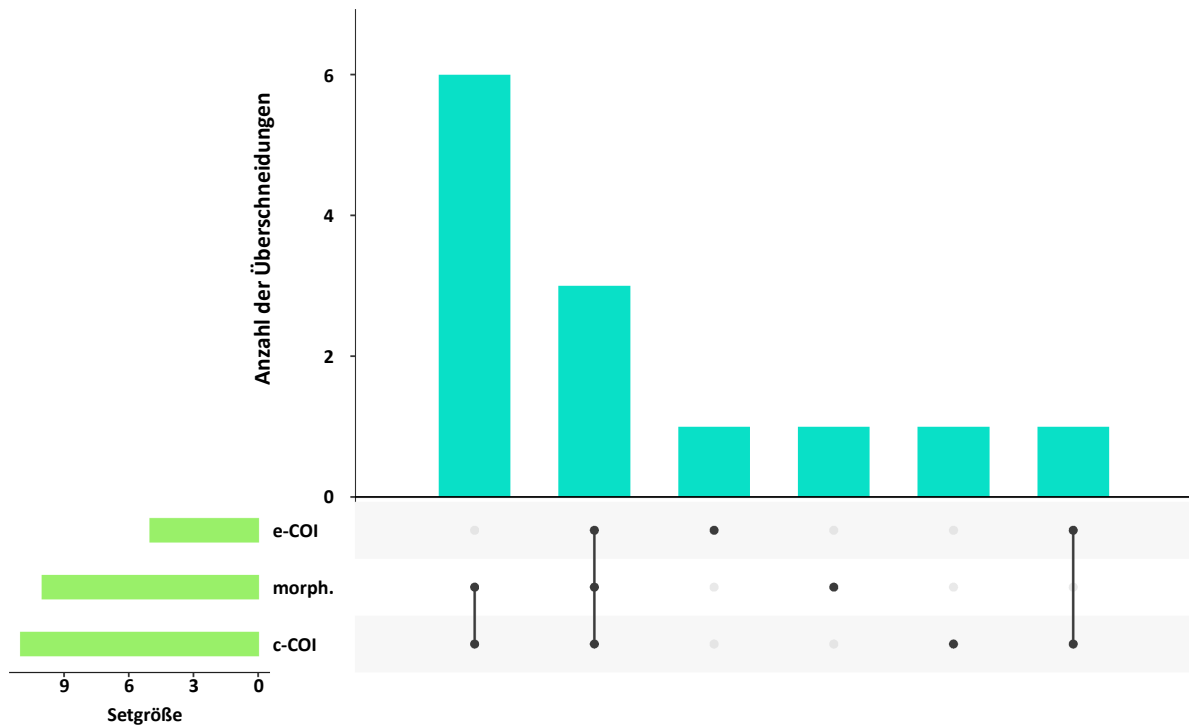
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 94: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	*		*
<i>Enchytraeus lacteus</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus</i> sp. (SPEF)			*
<i>Enchytronia christenseni</i>	*		*
<i>Enchytronia</i> sp. (2GAL)	*		
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia connata</i>	*	*	*
<i>Fridericia deformis</i>			*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	*
<i>Fridericia granosa</i>			*
<i>Fridericia hegemon</i>	*		
<i>Fridericia isseli</i>	*	*	*
<i>Fridericia lenta</i>	*	*	*
<i>Fridericia maculatiformis</i>	*		
<i>Fridericia nix</i>			*
<i>Fridericia paroniana</i>	*	*	*
<i>Fridericia sylvatica</i>	*	*	*
<i>Fridericia waldenstroemi</i>	*	*	*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Marionina communis</i>	*	*	*
<i>Marionina mendax</i>	*	*	
<i>Stercutus niveus</i>	*	*	
Summe	20	15	19

B.2.8 GHU: Großenhül In der Huh (Thurnau), Bayern

Abbildung 86: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der GHU-Probenahmestelle identifiziert wurden



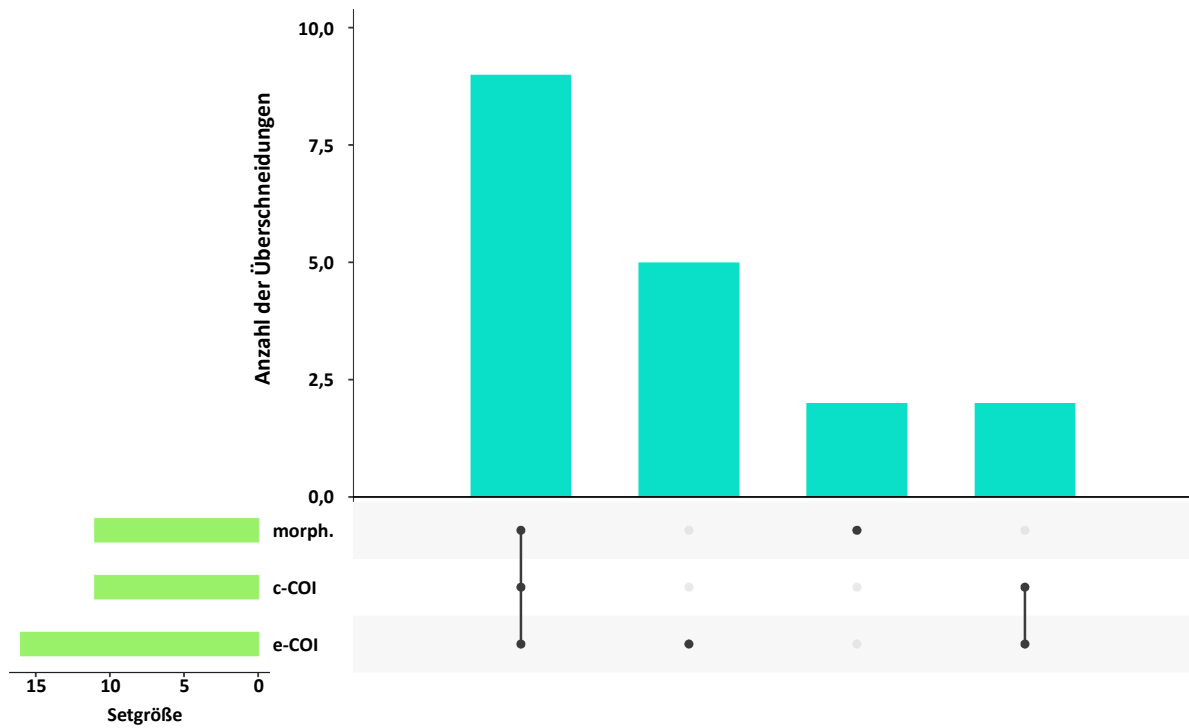
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 95: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der GHU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Cernosvitoviella</i>	*		
<i>Enchytraeidae</i> sp. BG		*	
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	*	*	
<i>Enchytronia christenseni</i>	*	*	
<i>Enchytronia parva</i>		*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	
<i>Fridericia isseli</i>	*	*	
<i>Fridericia sylvatica</i>			*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Marionina mendax</i>	*	*	
Summe	10	11	5

B.2.9 KAN: Kandel/Schaidt, Rheinland-Pfalz

Abbildung 87: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden



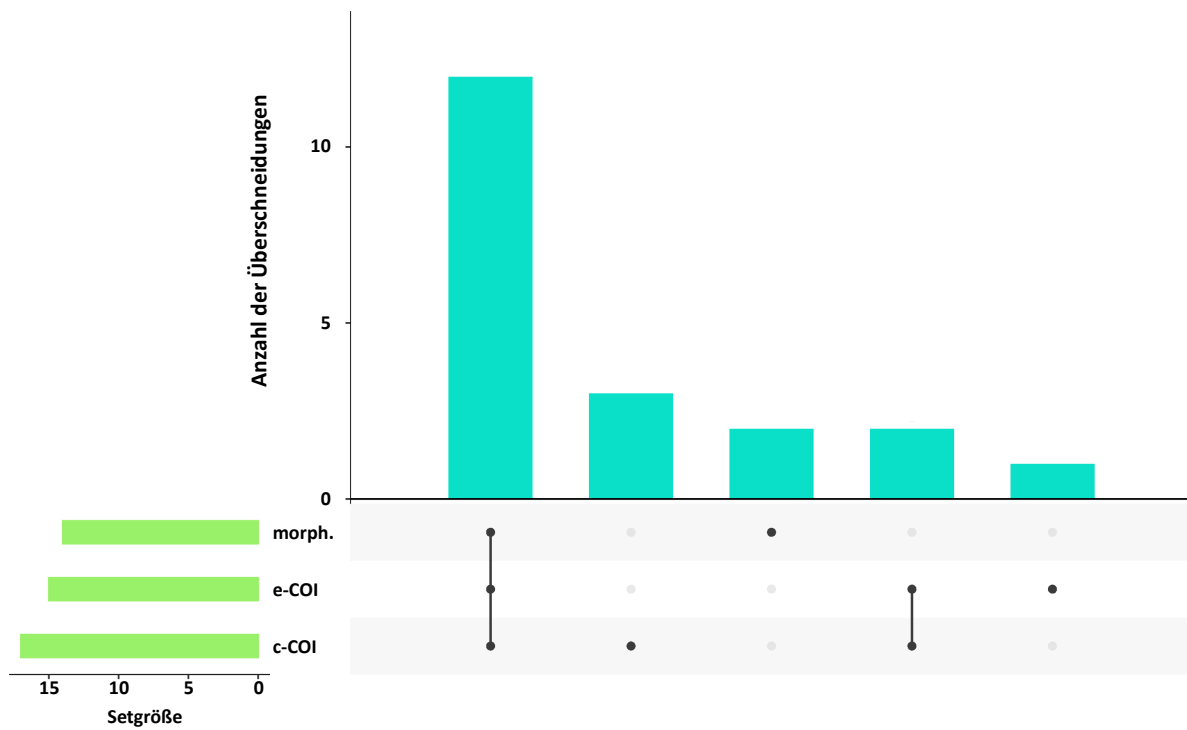
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 96: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta aberrans</i>	*	*	*
<i>Achaeta affinis</i>	*		
<i>Achaeta camerani</i>	*	*	*
<i>Achaeta danica</i>		*	*
<i>Achaeta</i> sp. (PAFU)	*	*	*
<i>Buchholzia appendiculata</i>			*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Cognettia pseudosphagnetorum</i>		*	*
<i>Cognettia sphagnetorum</i>	*	*	*
<i>Cognettia varisetosa</i>			*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*		
<i>Fridericia benti</i>	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>			*
<i>Fridericia striata</i>	*	*	*
<i>Marionina clavata</i>	*	*	*
<i>Marionina filiformis</i>			*
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>			*
<i>Oconnorella cambrensis</i>	*	*	*
Summe	11	11	16

B.2.10 KLK: Klein-Krauscha (Neißeau), Sachsen

Abbildung 88: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden



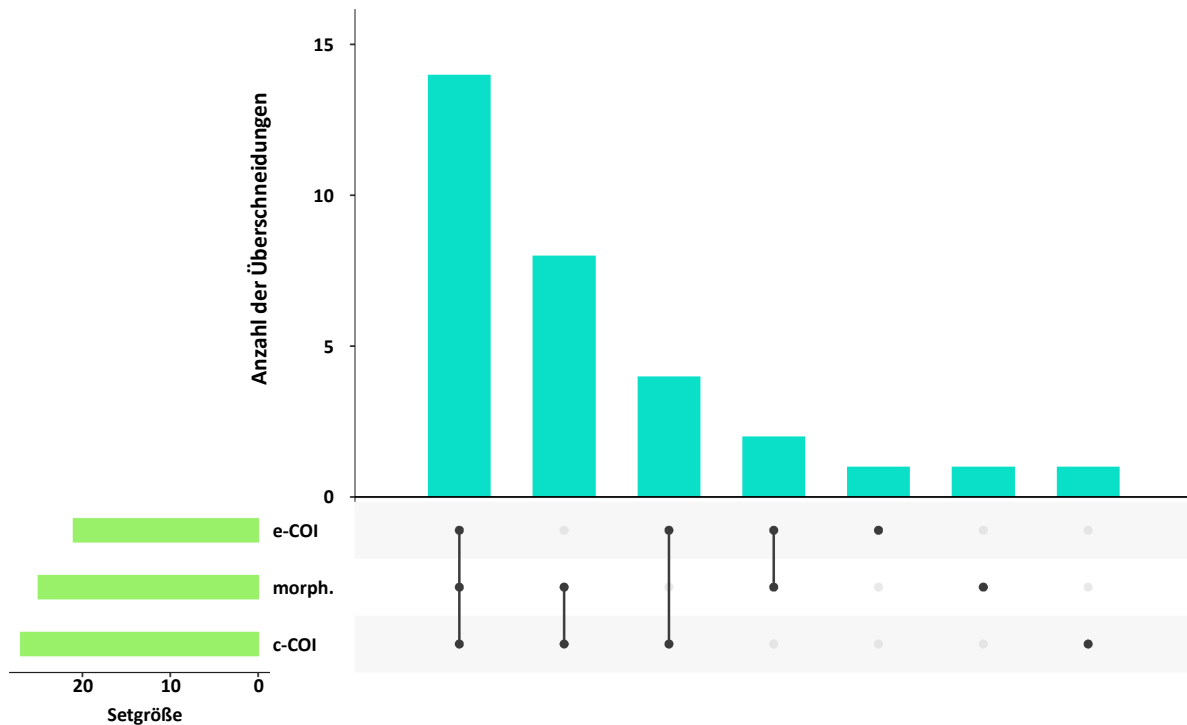
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 97: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	*
<i>Achaeta bibulba</i>			*
<i>Achaeta camerani</i>	*	*	*
<i>Achaeta diddeni</i>	*		
<i>Cognettia chlorophila</i>		*	
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	*		
<i>Enchytraeus dicaetus</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus lacteus</i>		*	*
<i>Enchytronia christenseni</i>	*	*	*
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Fridericia bisetosa</i>		*	
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia cusanica</i>	*	*	*
<i>Fridericia cylindrica</i>	*	*	*
<i>Fridericia lenta</i>		*	*
<i>Fridericia striata</i>		*	
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	*
Summe	14	17	15

B.2.11 KUM: Kümmelwiese (Braunlage), Sachsen-Anhalt

Abbildung 89: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der KUM-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

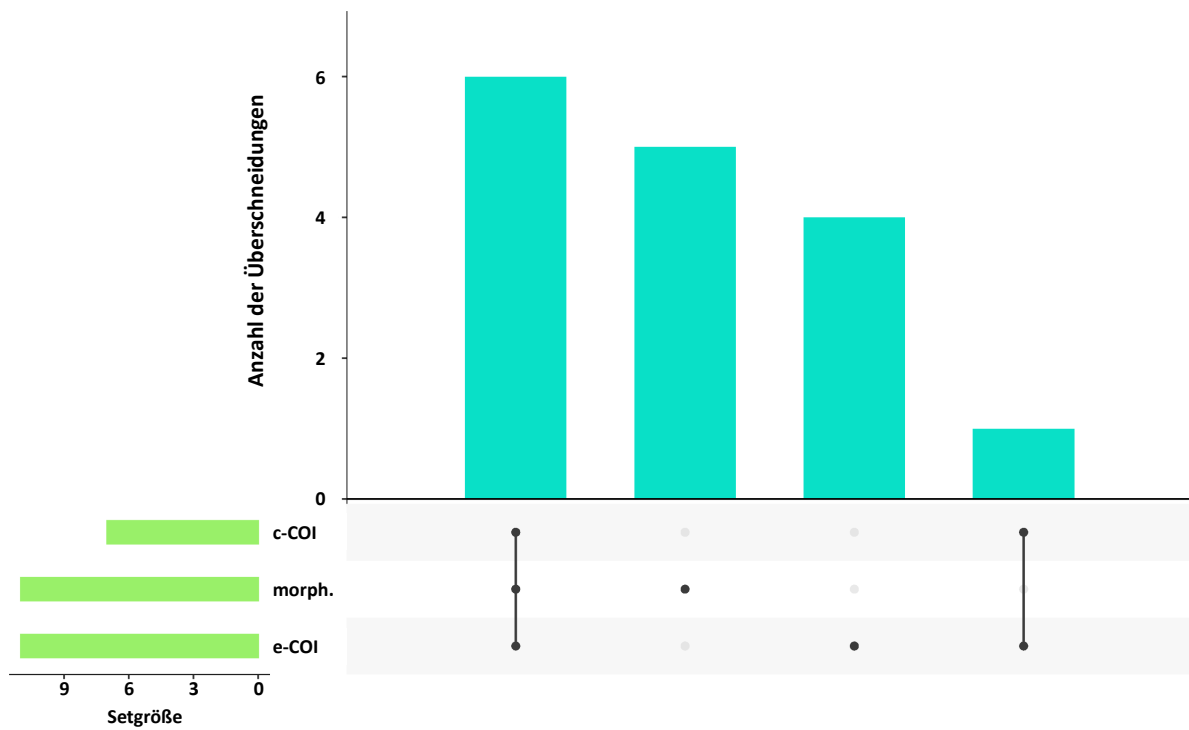
Tabelle 98: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KUM-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	
<i>Achaeta bohemica</i>	*	*	*
<i>Achaeta danica</i>	*	*	*
<i>Achaeta unibulba</i>		*	*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Cernosvitoviella</i>	*	*	
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Cognettia varisetosa</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	
<i>Enchytraeus christenseni</i>	*	*	
<i>Enchytraeus lacteus</i>	*	*	

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	*	*	
<i>Enchytronia christenseni</i>	*		*
<i>Enchytronia holochaeta</i>	*	*	*
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	*	*	
<i>Fridericia benti</i>			*
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*
<i>Fridericia connata</i>	*	*	*
<i>Fridericia deformis</i>		*	*
<i>Fridericia dura</i>		*	*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>	*	*	*
<i>Fridericia ulrikae</i>	*	*	*
<i>Fridericia waldenstroemi</i>		*	
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	
<i>Marionina argentea</i>		*	*
<i>Marionina deminuta</i>	*		
<i>Marionina mendax</i>	*	*	*
<i>Oconnorella tubifera</i>	*	*	*
<i>Stercutus niveus</i>	*		*
Summe	25	27	21

B.2.12 LIS: Saarlouis-Lisdorf, Saarland

Abbildung 90: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden



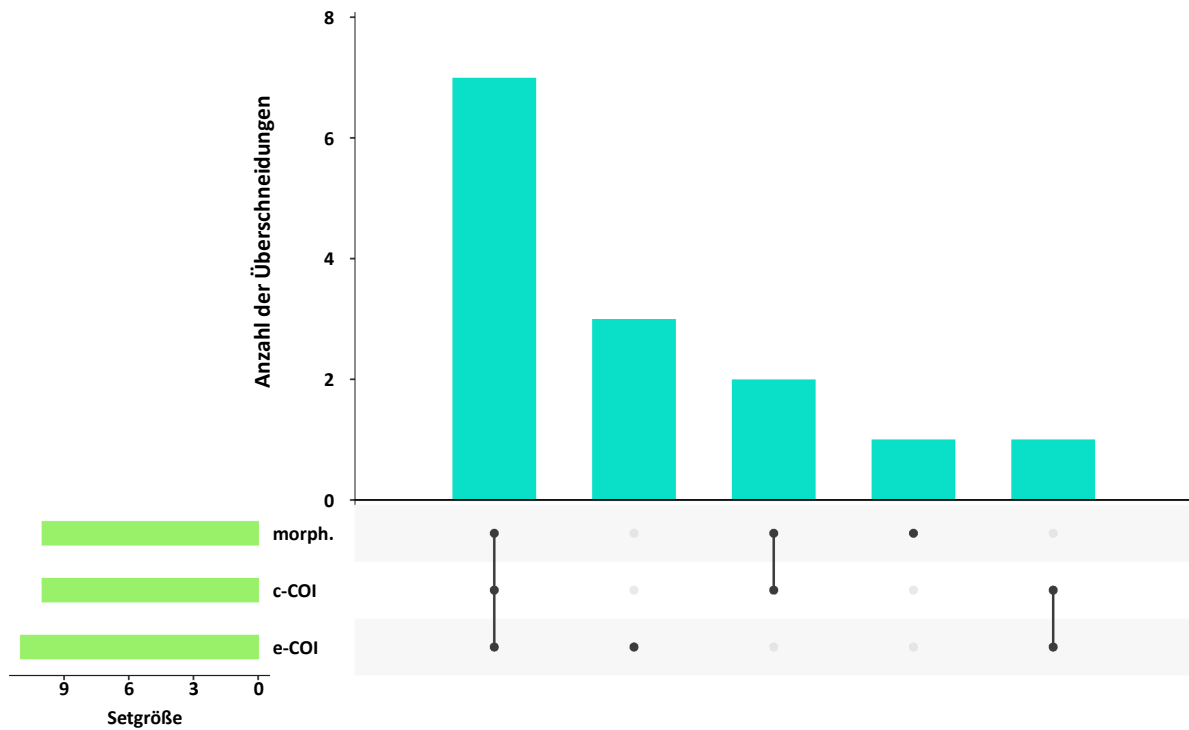
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 99: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Buchholzia</i> sp. (PAPP)	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bulbosus</i>			*
<i>Enchytraeus lacteus</i>			*
<i>Enchytraeus</i> sp. (BUCL)	*		
<i>Enchytraeus</i> sp. (GRAN)	*		
<i>Enchytraeus</i> sp. (NICO)		*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	*
<i>Fridericia isseli</i>	*	*	*
<i>Fridericia paroniana</i>			*
<i>Fridericia</i> sp. (GLIF)	*	*	*
<i>Fridericia</i> sp. (LIS1)	*		
<i>Fridericia</i> sp. (LNIX)	*		
<i>Fridericia</i> sp. (NLD1)			*
<i>Marionina mendax</i>	*		
Summe	11	7	11

B.2.13 MER: Merzalben, Rheinland-Pfalz

Abbildung 91: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden



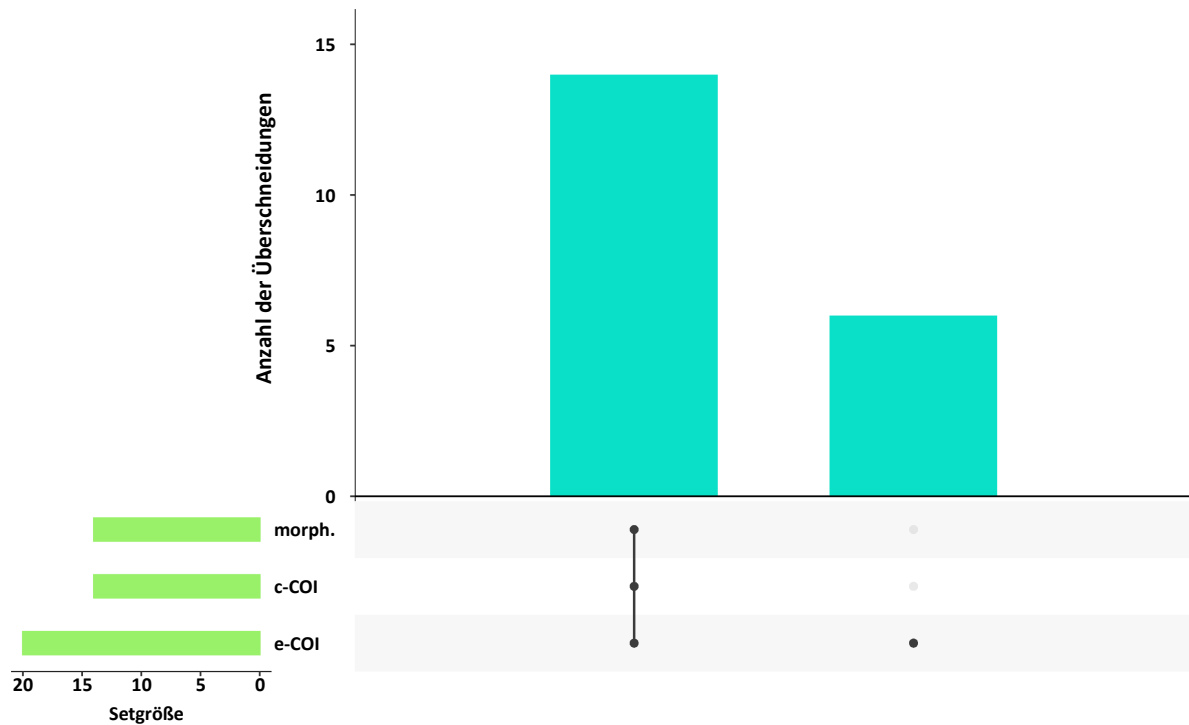
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 100: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta aberrans</i>			*
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	*
<i>Achaeta bibulba</i>			*
<i>Achaeta camerani</i>	*	*	*
<i>Achaeta danica</i>		*	*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	*	*	*
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	*		
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	
<i>Marionina clavata</i>	*	*	*
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>			*
<i>Oconnorella cambrensis</i>	*	*	*
Summe	10	10	11

B.2.14 NEU: Neuhäuserfelde (Neuhaus), Niedersachsen

Abbildung 92: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden



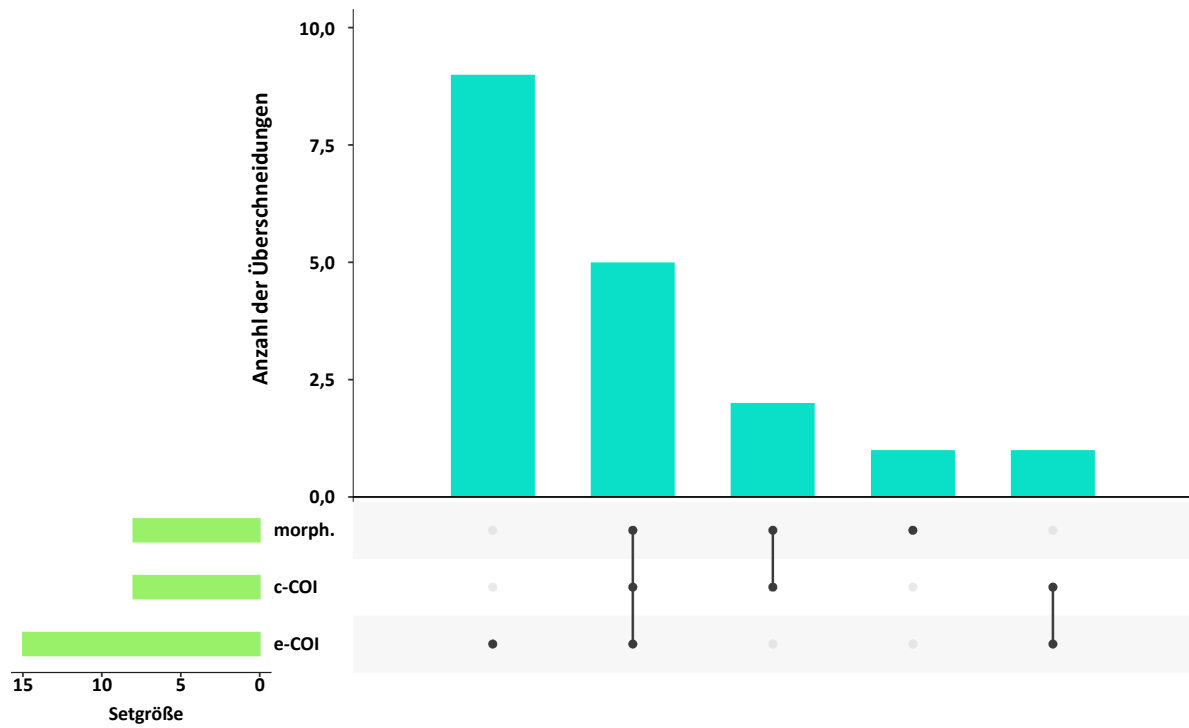
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 101: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>			*
<i>Achaeta iberica</i>			*
<i>Buchholzia appendiculata</i>			*
<i>Cognettia chlorophila</i>			*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus dichaeetus</i>	*	*	*
<i>Enchytronia christenseni</i>	*	*	*
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia connata</i>	*	*	*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	*
<i>Fridericia granosa</i>			*
<i>Fridericia nix</i>	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>			*
<i>Fridericia schmelzi</i>	*	*	*
<i>Fridericia sylvatica</i>	*	*	*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	*
Summe	14	14	20

B.2.15 PAU: Paulinenaue, Brandenburg

Abbildung 93: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden



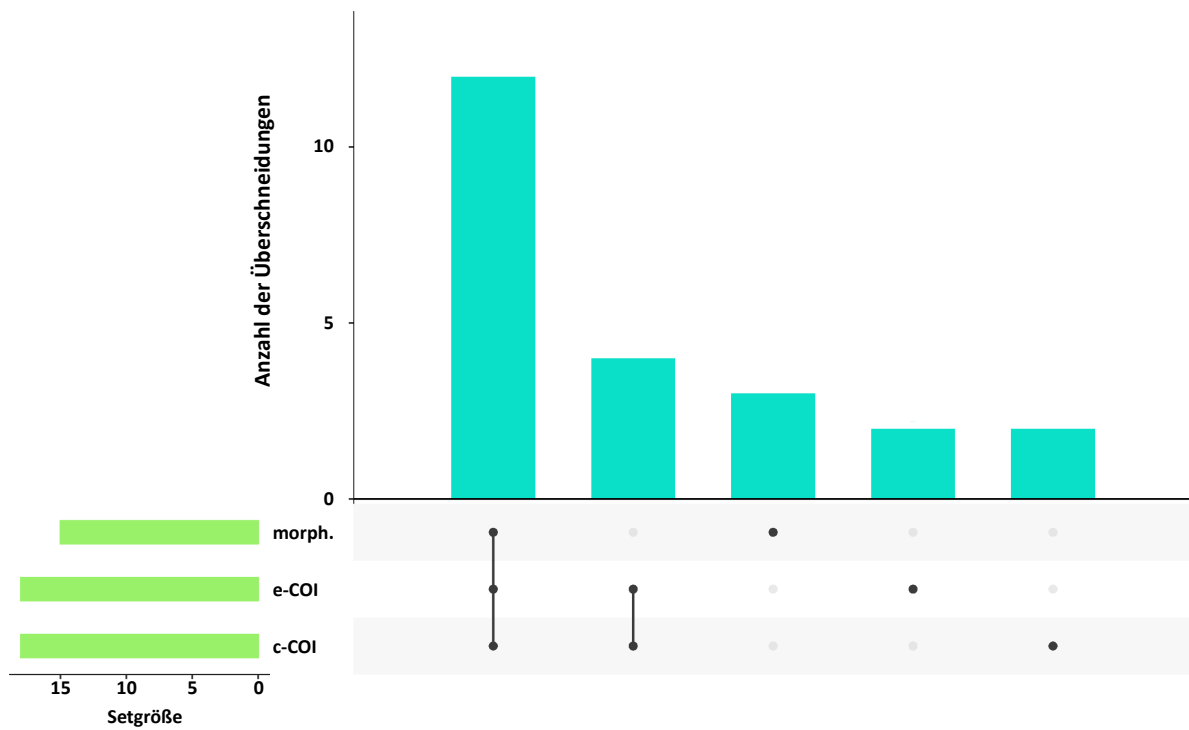
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 102: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>			*
<i>Achaeta danica</i>			*
<i>Buchholzia appendiculata</i>			*
<i>Buchholzia</i> sp. (PAPP)			*
<i>Cognettia chlorophila</i>			*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	
<i>Enchytraeus dichaeus</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus</i> sp. (NPAU)	*	*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia dura</i>	*	*	
<i>Fridericia perrieri</i>			*
<i>Fridericia ratzeli</i>			*
<i>Fridericia schmelzi</i>			*
<i>Henlea montana</i>		*	*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	*
<i>Marionina argentea</i>	*		
<i>Marionina deminuta</i>			*
Summe	8	8	15

B.2.16 POS: Possen (Sondershausen), Thüringen

Abbildung 94: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der POS-Probenahmestelle identifiziert wurden



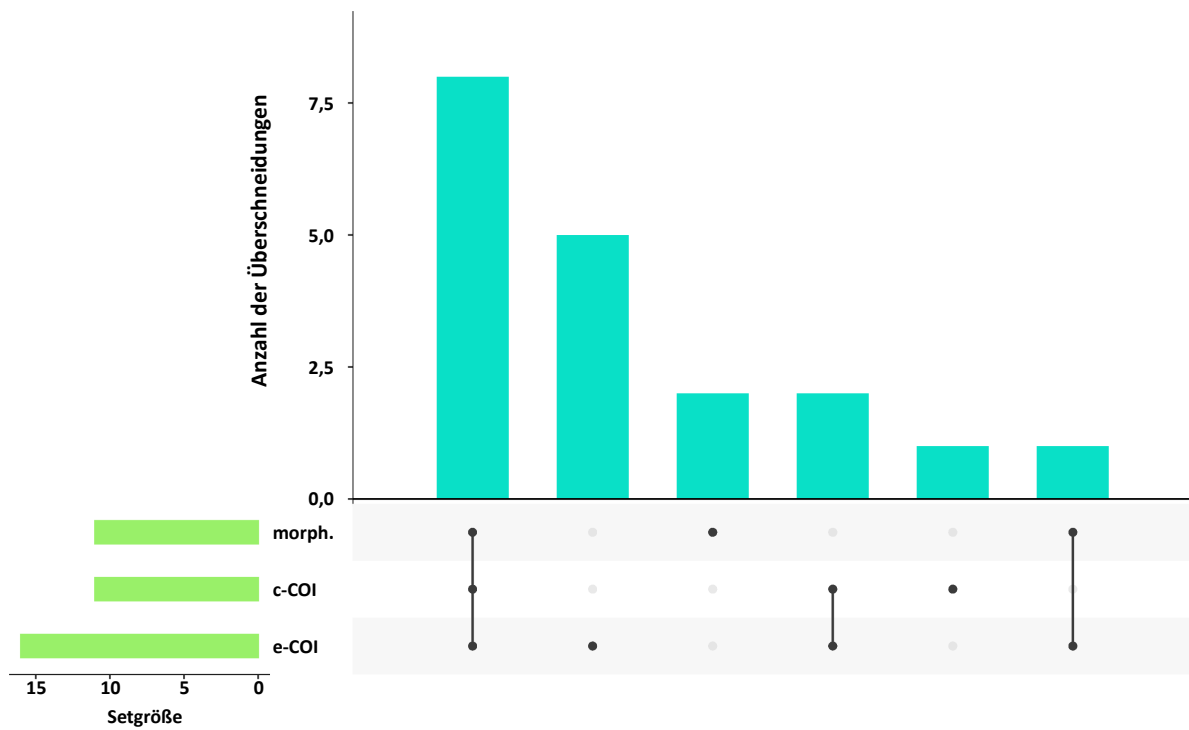
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 103: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der POS-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	*
<i>Achaeta bibulba</i>		*	*
<i>Achaeta bohemica</i>			*
<i>Achaeta camerani</i>			*
<i>Achaeta danica</i>		*	*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Cognettia varisetosa</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bigeminus</i>		*	
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus japonensis</i>		*	
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	*	*	*
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	*		
<i>Fridericia benti</i>		*	*
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*
<i>Fridericia connata</i>	*	*	*
<i>Fridericia dura</i>	*	*	*
<i>Fridericia striata</i>	*		
<i>Marionina clavata</i>	*		
<i>Oconnorella cambrensis</i>	*	*	*
<i>Oconnorella tubifera</i>	*	*	*
<i>Stercutus niveus</i>		*	*
Summe	15	18	18

B.2.17 SBU: Schlegeler Buchberg (Zittau-Schlegel), Sachsen

Abbildung 95: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden



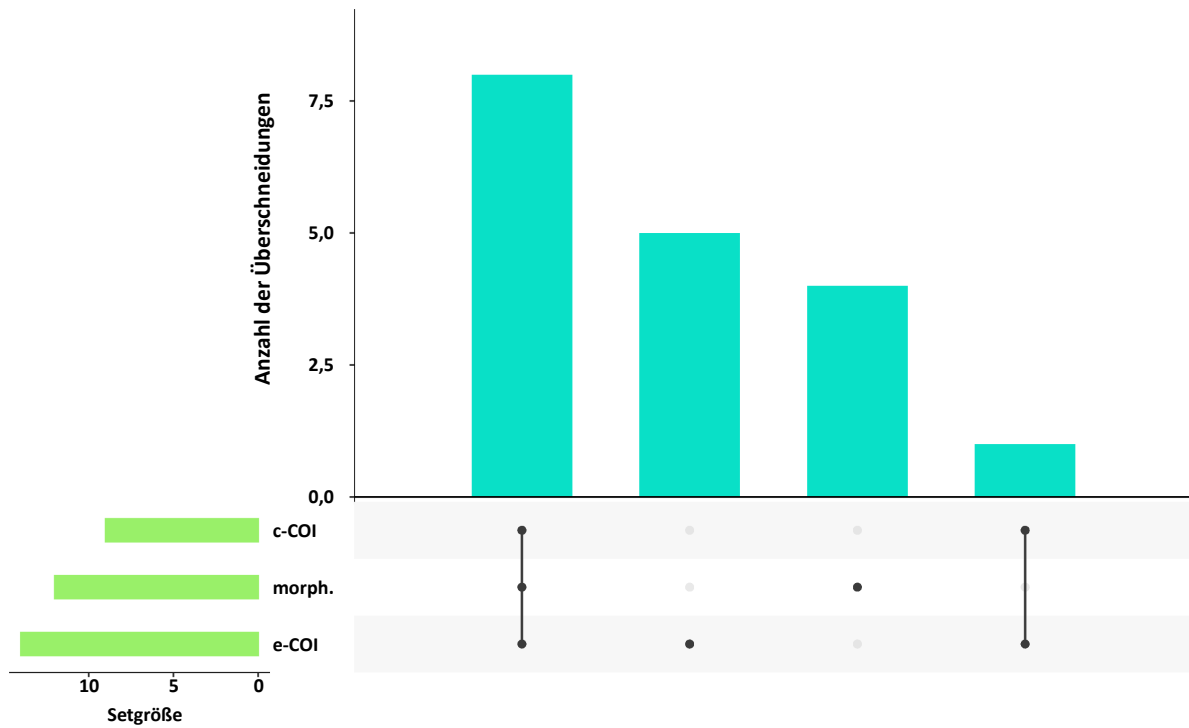
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 104: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	*
<i>Achaeta danica</i>		*	
<i>Achaeta</i> sp. (DZWI)	*		
<i>Achaeta unibulba</i>			*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus lacteus</i>		*	*
<i>Enchytronia hellenica</i>			*
<i>Enchytronia holochaeta</i>	*		*
<i>Enchytronia minor</i>	*		
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Enchytronia pratensis</i>			*
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*
<i>Fridericia dura</i>	*	*	*
<i>Fridericia paroniana</i>	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>		*	*
<i>Fridericia sylvatica</i>			*
<i>Fridericia waldenstroemi</i>			*
<i>Oconnorella tubifera</i>	*	*	*
Summe	11	11	16

B.2.18 SHG: Schwanheim II (Kelsterbach), Hessen

Abbildung 96: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden



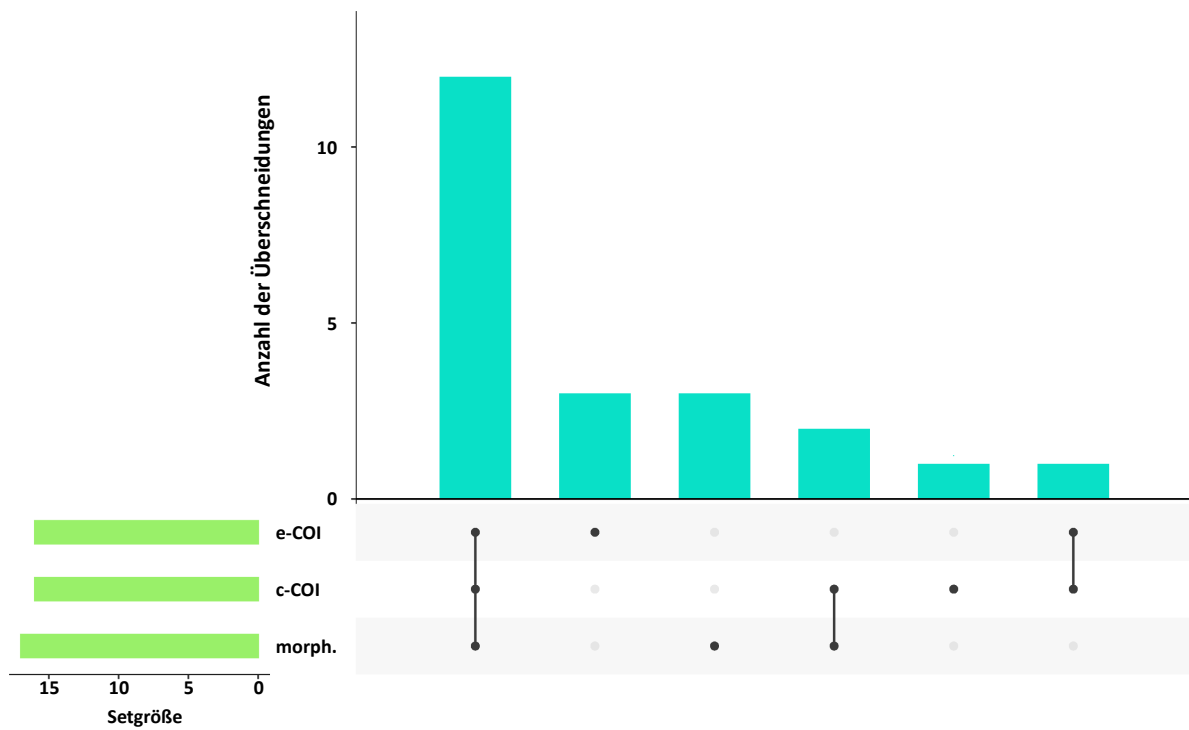
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 105: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>			*
<i>Buchholzia fallax</i>	*	*	*
<i>Buchholzia</i> sp. (PAPP)			*
<i>Buchholzia</i> sp. (BNBN)			*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus lacteus</i>	*	*	*
<i>Enchytronia christenseni</i>	*	*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*		
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia galba</i>		*	*
<i>Fridericia hegemon</i>	*		
<i>Fridericia isseli</i>	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>			*
<i>Fridericia</i> sp. (DOZZ)	*		
<i>Fridericia striata</i>			*
<i>Marionina brendae</i>	*	*	*
<i>Marionina</i> sp. (DEMI)	*		
Summe	12	9	14

B.2.19 SHW: Schwanheim 1 (Kelsterbach), Hessen

Abbildung 97: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden



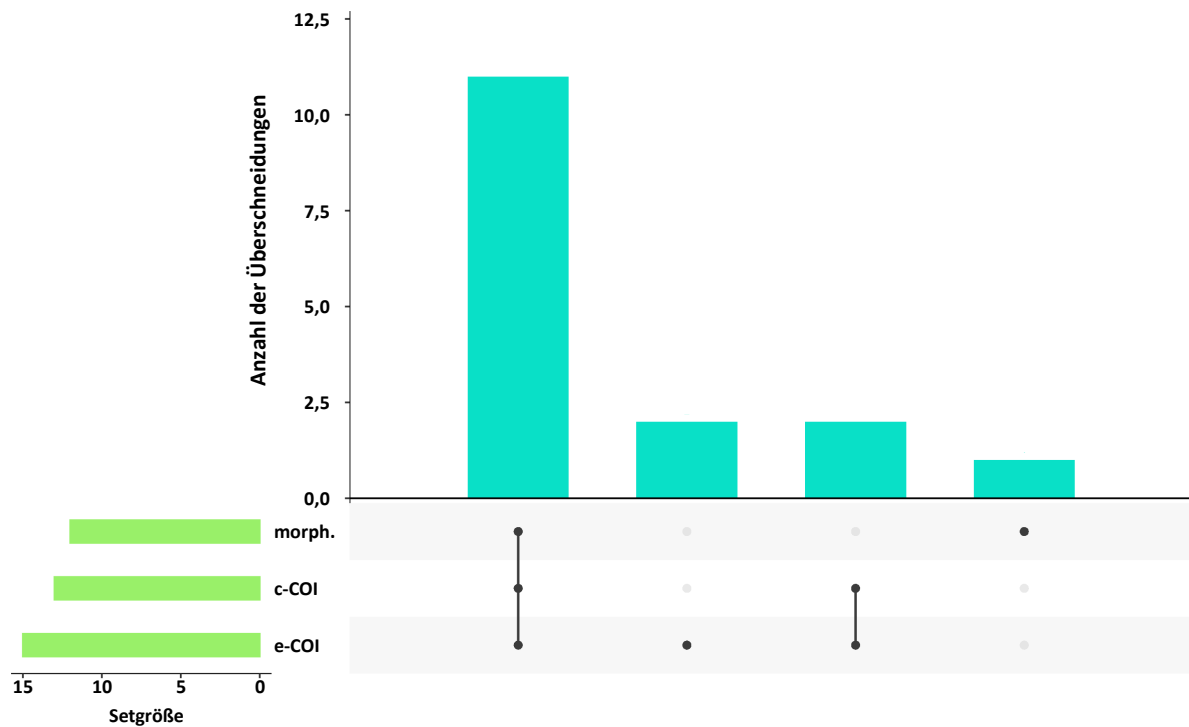
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 106: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	*
<i>Achaeta danica</i>		*	*
<i>Achaeta</i> sp. (PDZW)		*	
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus lacteus</i>			*
<i>Enchytraeus</i> sp. (BUCL)	*		
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	*		
<i>Fridericia benti</i>			*
<i>Fridericia bisetosa</i>	*		
<i>Fridericia connata</i>	*	*	*
<i>Fridericia cylindrica</i>	*	*	*
<i>Fridericia dura</i>	*	*	*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	*
<i>Fridericia paroniana</i>	*	*	*
<i>Fridericia perrieri</i>	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>	*	*	*
<i>Fridericia</i> sp. (BISY)	*	*	*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	
<i>Marionina simillima</i>	*	*	
<i>Stercutus niveus</i>			*
Summe	17	16	16

B.2.20 SLT: Sülstorf, Mecklenburg-Vorpommern

Abbildung 98: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden



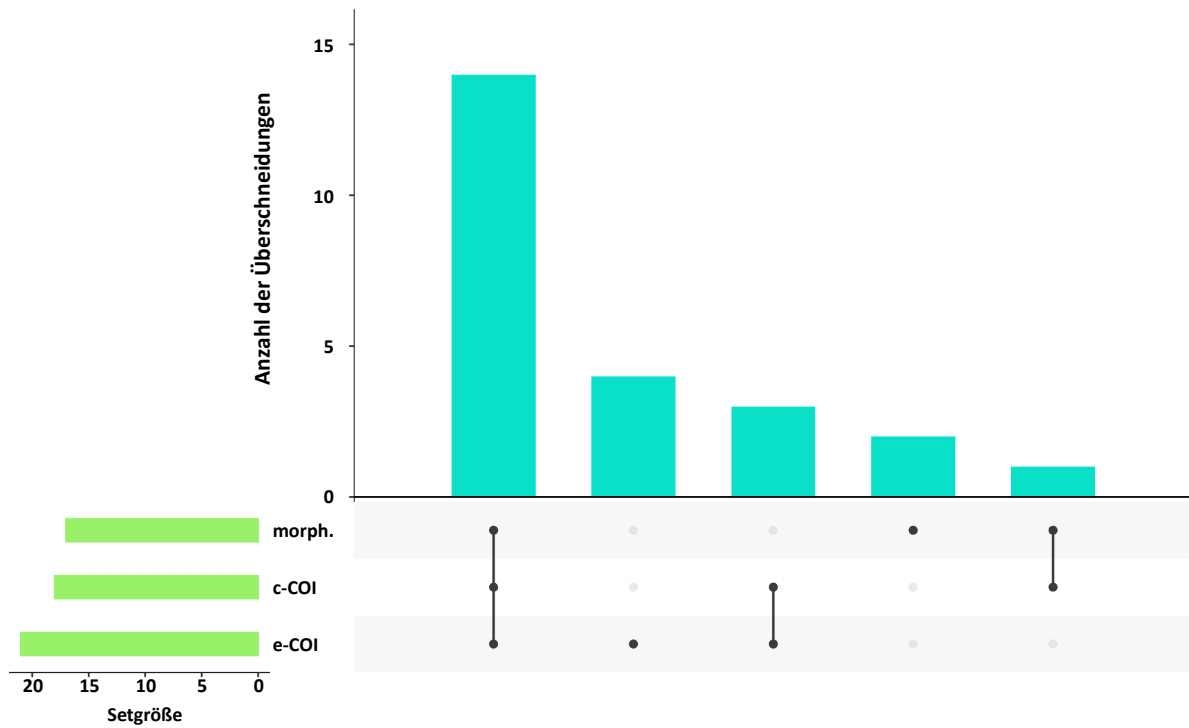
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 107: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta iberica</i>		*	*
<i>Achaeta pannonica</i>	*		
<i>Achaeta</i> sp. (DZWI)			*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Buchholzia</i> sp. (BNBN)		*	*
<i>Cognettia chlorophila</i>			*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus dicaetus</i>	*	*	*
<i>Enchytronia christenseni</i>	*	*	*
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Enchytronia pratensis</i>	*	*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia sylvatica</i>	*	*	*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Marionina communis</i>	*	*	*
Summe	12	13	15

B.2.21 TRO: Trochtelfingen, Baden-Württemberg

Abbildung 99: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden



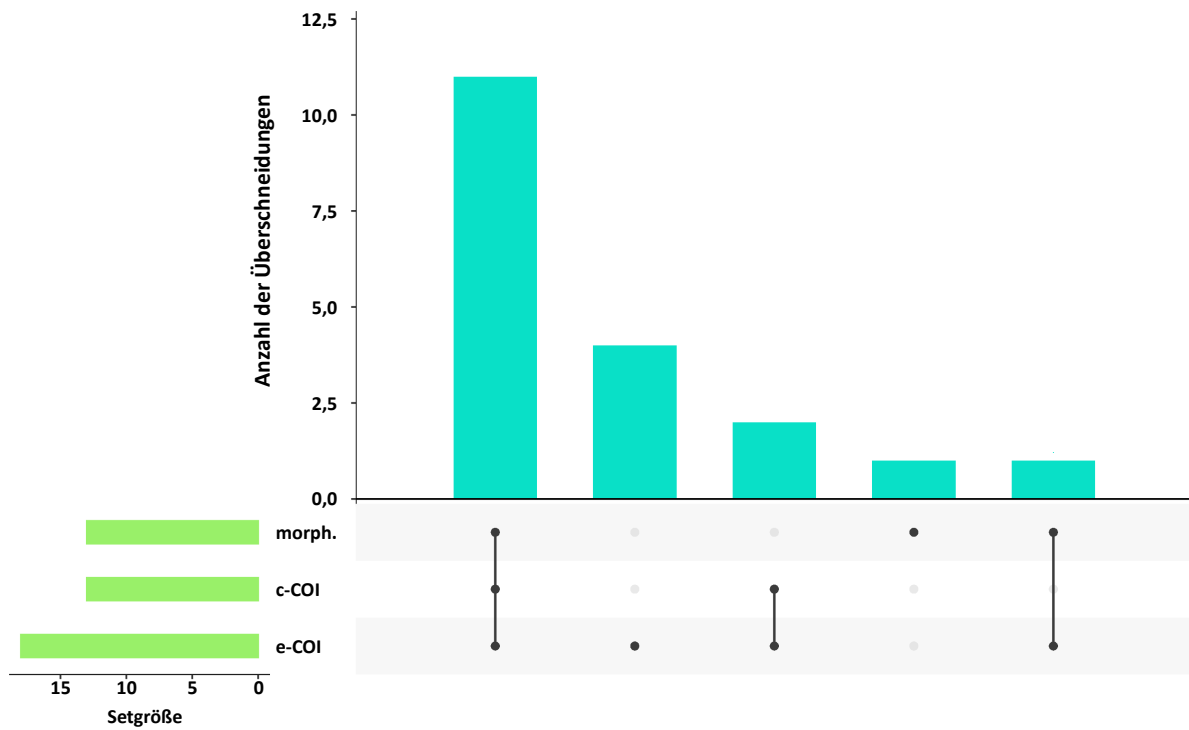
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 108: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus lacteus</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus</i> sp. (NPAU)		*	*
<i>Enchytraeus</i> sp. (SPEF)		*	*
<i>Enchytronia christenseni</i>	*	*	*
<i>Fridericia bisetosa</i>			*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia deformis</i>	*	*	*
<i>Fridericia dura</i>			*
<i>Fridericia galba</i>	*	*	*
<i>Fridericia isseli</i>	*	*	*
<i>Fridericia paroniana</i>	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>	*	*	
<i>Fridericia semisetosa</i>		*	*
<i>Fridericia singula</i>	*		
<i>Fridericia</i> sp. (2TRO)	*	*	*
<i>Fridericia</i> sp. (NTRO)	*	*	*
<i>Fridericia sylvatica</i>			*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Marionina argentea</i>			*
<i>Marionina communis</i>	*	*	*
<i>Marionina mendax</i>	*		
Summe	17	18	21

B.2.22 WBU: Wächterbuche (Monschau), Nordrhein-Westfalen

Abbildung 100: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden



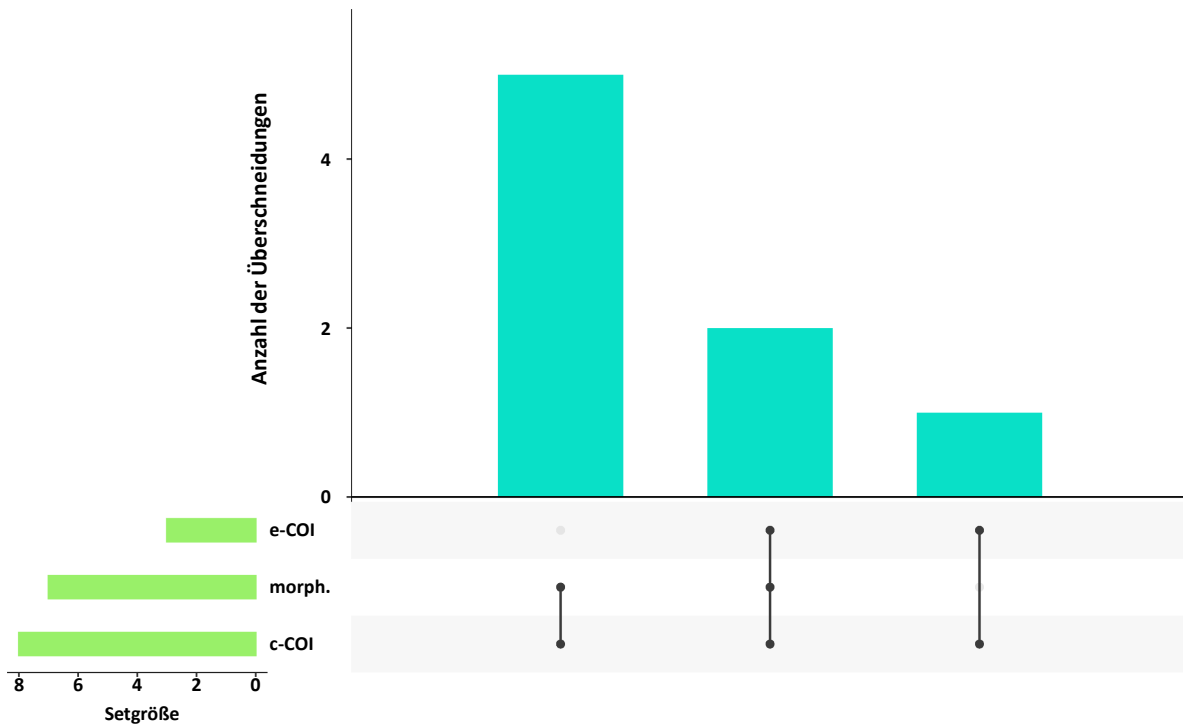
Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 109: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta aberrans</i>			*
<i>Achaeta abulba</i>	*	*	*
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	*
<i>Achaeta camerani</i>	*	*	*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Cognettia cognettii</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>		*	*
<i>Enchytraeus norvegicus</i>	*		
<i>Enchytronia parva</i>	*	*	*
<i>Enchytronia pygmaea</i>			*
<i>Enchytronia</i> sp. (TENU)	*		*
<i>Fridericia benti</i>			*
<i>Fridericia striata</i>	*	*	*
<i>Marionina clavata</i>		*	*
<i>Mesenchytraeus armatus</i>	*	*	*
<i>Mesenchytraeus glandulosus</i>	*	*	*
<i>Oconnorella cambrensis</i>	*	*	*
<i>Stercutus niveus</i>			*
Summe	13	13	18

B.2.23 WOL: Wolferschwenda, Thüringen

Abbildung 101: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

Tabelle 110: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>	*	*	
<i>Achaeta iberica</i>		*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	
<i>Enchytraeus bulbosus</i>	*	*	
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	
<i>Fridericia sylvatica</i>	*	*	*
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	
Summe	7	8	3

B.2.24 ZEC: Zeckerin, Brandenburg

Abbildung 102: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden

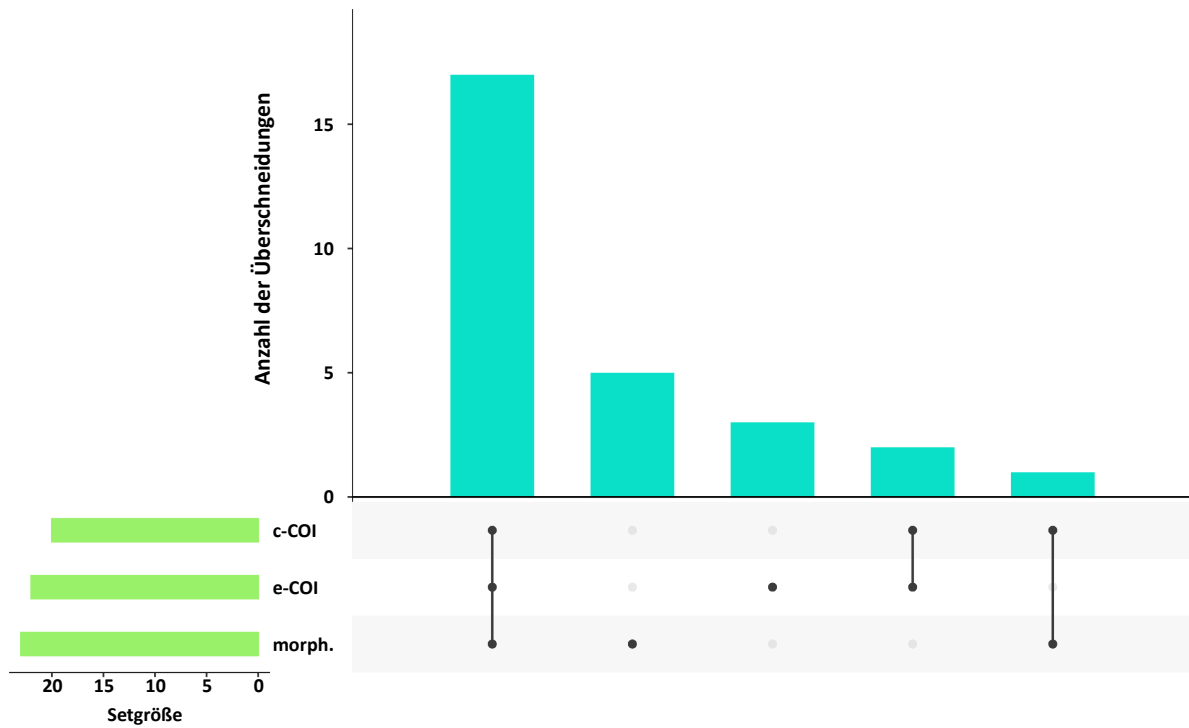
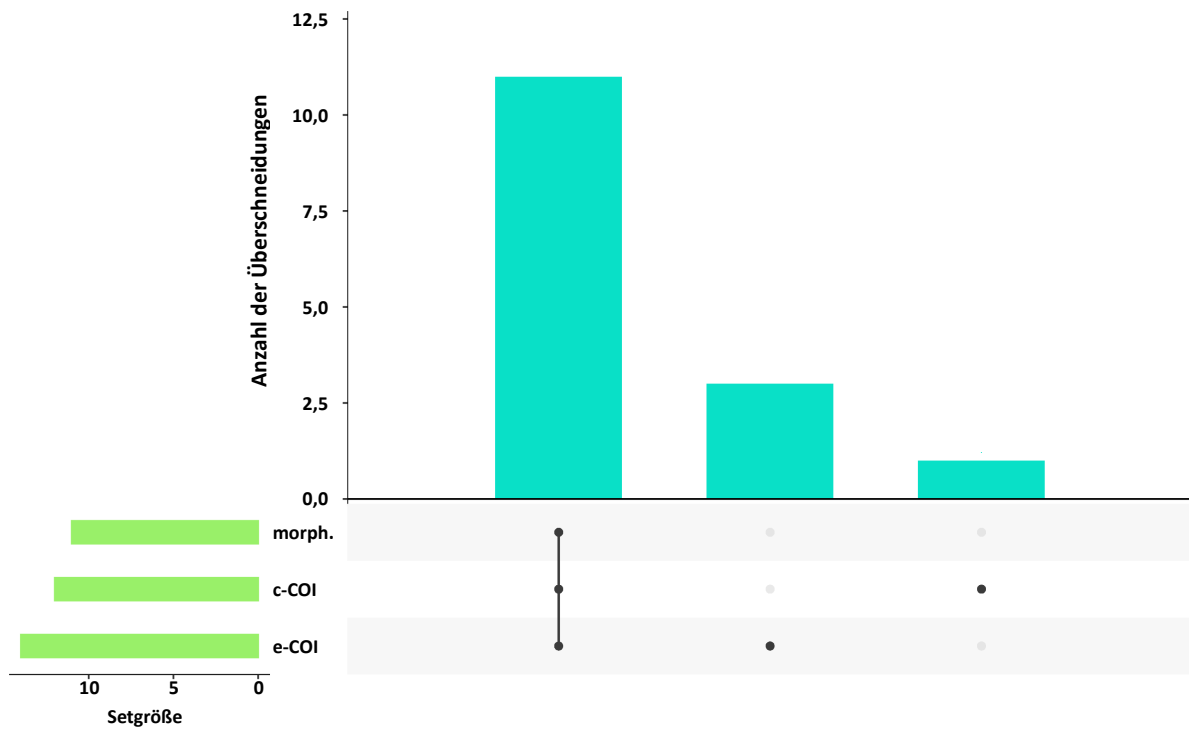


Tabelle 111: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta pannonica</i>			*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Buchholzia</i> sp. (BNBN)		*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus dichaeetus</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus lacteus</i>	*		
<i>Fridericia benti</i>			*
<i>Fridericia bisetosa</i>	*	*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia christeri</i>	*	*	*
<i>Fridericia connata</i>	*	*	*
<i>Fridericia deformis</i>	*		
<i>Fridericia dura</i>			*
<i>Fridericia galba</i>	*		
<i>Fridericia granosa</i>		*	*
<i>Fridericia lenta</i>	*	*	*
<i>Fridericia maculata</i>	*	*	*
<i>Fridericia nix</i>	*		
<i>Fridericia paroniana</i>	*	*	*
<i>Fridericia perrieri</i>	*	*	*
<i>Fridericia ratzeli</i>	*	*	*
<i>Fridericia schmelzi</i>	*	*	*
<i>Hemifridericia parva</i>	*	*	*
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	*
<i>Marionina communis</i>	*	*	*
<i>Marionina deminuta</i>	*	*	
<i>Marionina mendax</i>	*		
Summe	23	20	22

B.2.25 ZIN: Zingst, Mecklenburg-Vorpommern

Abbildung 103: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Enchytraeidenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (morph.), durch COI comDNA (c-COI)- und durch COI eDNA-Metabarcoding (e-COI) in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, AllGenetics & Biology SL

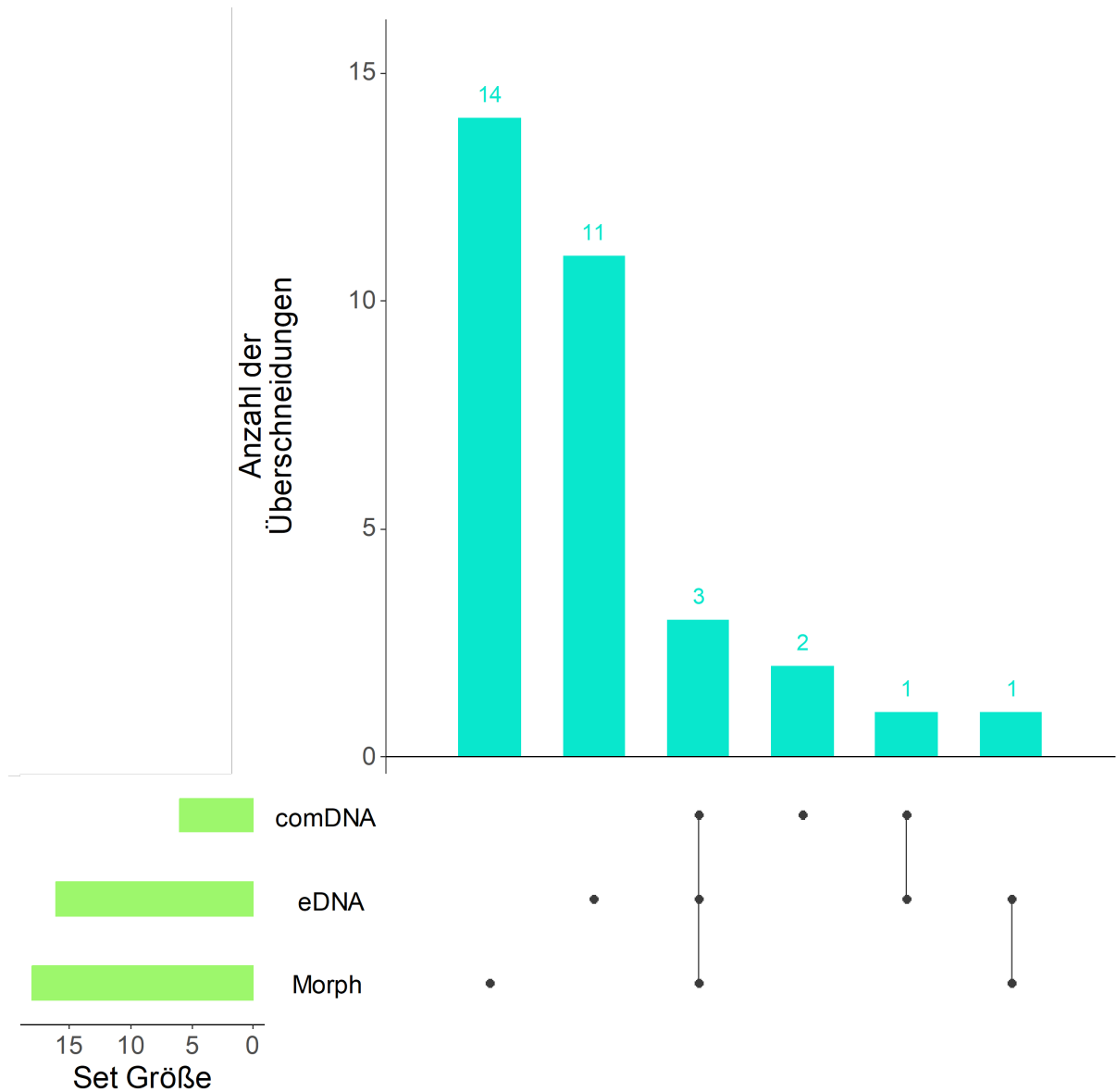
Tabelle 112: Enchytraeidenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	morph.	comDNA	eDNA
<i>Achaeta affinis</i>			*
<i>Bryodrilus parvus</i>			*
<i>Buchholzia appendiculata</i>	*	*	*
<i>Cognettia chlorophila</i>	*	*	*
<i>Cognettia varisetosa</i>	*	*	*
<i>Enchytraeus buchholzi</i>	*	*	*
<i>Fridericia bulboides</i>	*	*	*
<i>Fridericia cylindrica</i>	*	*	*
<i>Fridericia dura</i>	*	*	*
<i>Fridericia paroniana</i>			*
<i>Fridericia ratzeli</i>	*	*	*
<i>Hemifridericia parva</i>		*	
<i>Henlea perpusilla</i>	*	*	*
<i>Henlea ventriculosa</i>	*	*	*
<i>Marionina communis</i>	*	*	*
Summe	11	12	14

B.3 Collembolen

B.3.1 ALM: Almesbach Stallkoppel (Weiden i.d. Oberpfalz), Bayern

Abbildung 104: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden



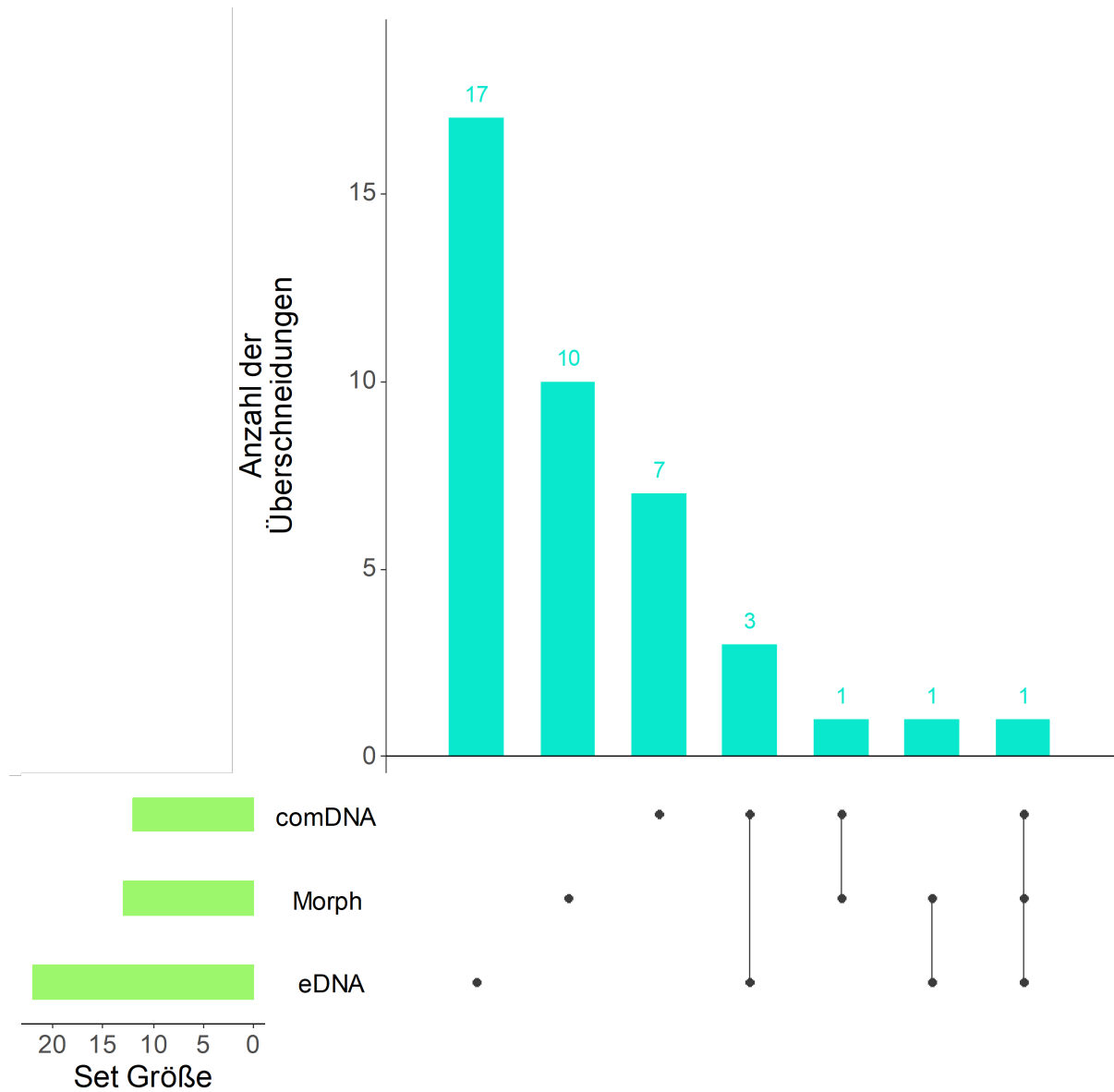
Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Tabelle 113: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ALM-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>			*
<i>Dicranocentrus gaoligongensis</i>			*
<i>Entomobrya clitellaria</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Folsomia elongata</i>			*
<i>Folsomia quadrioculata</i>			*
<i>Friesea claviseta</i>		*	
<i>Hemisotoma thermophila</i>	*		
<i>Isotoma anglicana</i>	*		
<i>Isotoma marionensis</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>		*	
<i>Isotomodes productus</i>	*		
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	*	*	*
<i>Megalothorax svalbardensis</i>			*
<i>Mesaphorura isochaeta</i>	*		
<i>Neanura muscorum</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sminthurinus elegans</i>		*	*
<i>Sphaeridia pumilis</i>	*	*	*
<i>Sphyrotheca aleta</i>			*
<i>Stenaphorura quadrispina</i>	*		
Summe	8	6	16

B.3.2 BIM: Bad Bramsted (Bimöhlen), Schleswig-Holstein

Abbildung 105: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

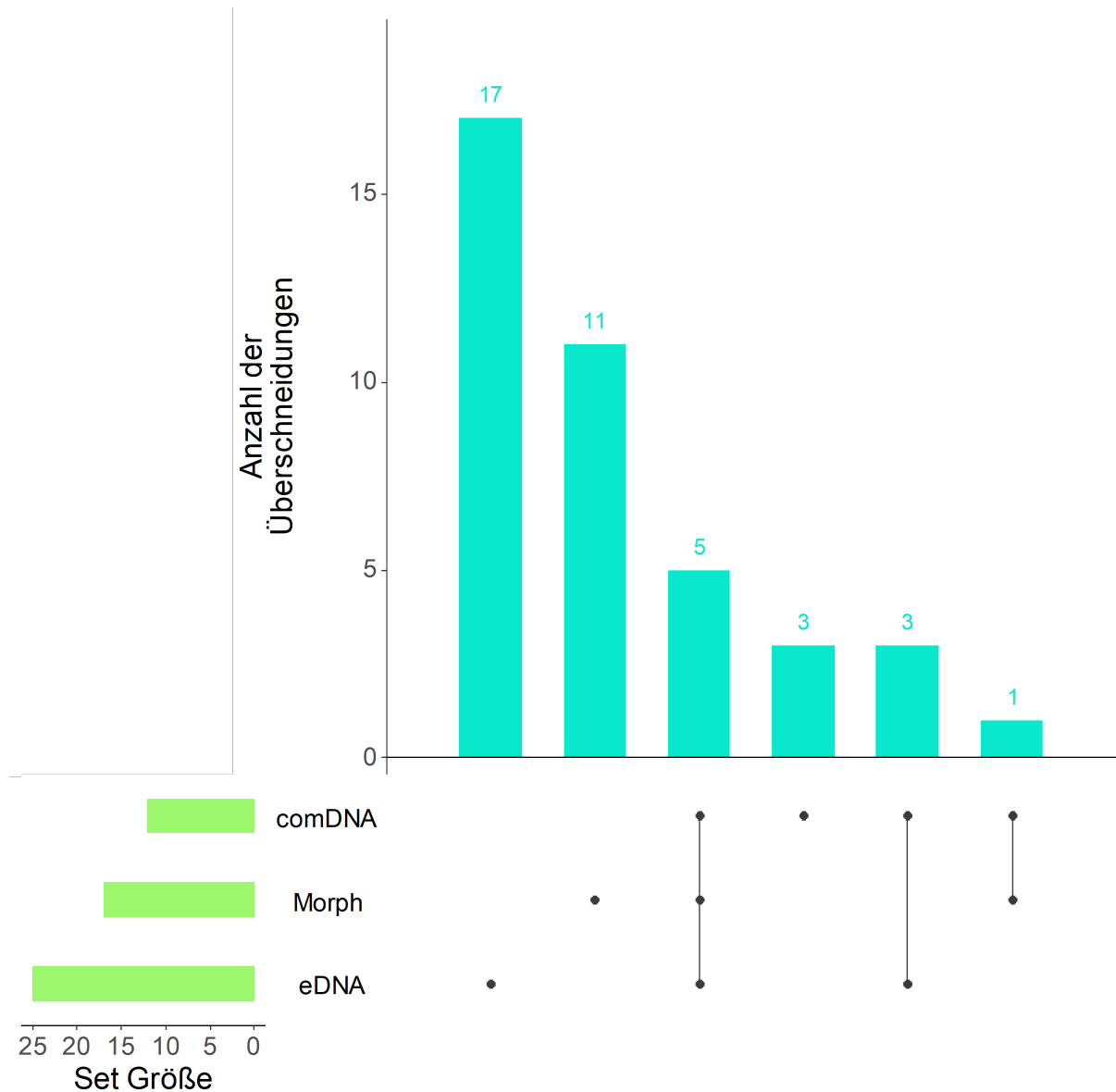
Tabelle 114: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BIM-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph	comDNA	eDNA
<i>Bilobella aurantiaca</i>			*
<i>Calvatomina rossi</i>			*
<i>Ceratophysella denticulata</i>		*	
<i>Crossodonthina laterisensillata</i>			*
<i>Cryptopygus caecus</i>			*
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>			*
<i>Deutonura caerulescens</i>			*
<i>Deutonura deficiens</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Entomobrya nivalis</i>			*
<i>Folsomia candida</i>		*	
<i>Folsomia quadrioculata</i>			*
<i>Folsomia sensibilis</i>	*		
<i>Folsomia similis</i>			*
<i>Homidia laha</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>		*	*
<i>Isotoma viridis</i>		*	
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>		*	*
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>			*
<i>Megalothorax willemi</i>		*	
<i>Parisotoma ekmani</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Pogonognathellus flavescens</i>			*
<i>Protaphorura cancellata</i>		*	
<i>Protaphorura fimata</i>		*	

Spezies	Morph	comDNA	eDNA
<i>Pseudisotoma sensibilis</i>		*	
<i>Pseudosinella alba</i>		*	
<i>Sminthurides hyogramme</i>			*
<i>Sminthurinus aureus</i>		*	*
<i>Stenaphorura denisi</i>	*		
<i>Stenaphorura quadrispina</i>	*		
<i>Tomocerina purpurithora</i>			*
Summe	4	12	22

B.3.3 BOV: Bovenden, Niedersachsen

Abbildung 106: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

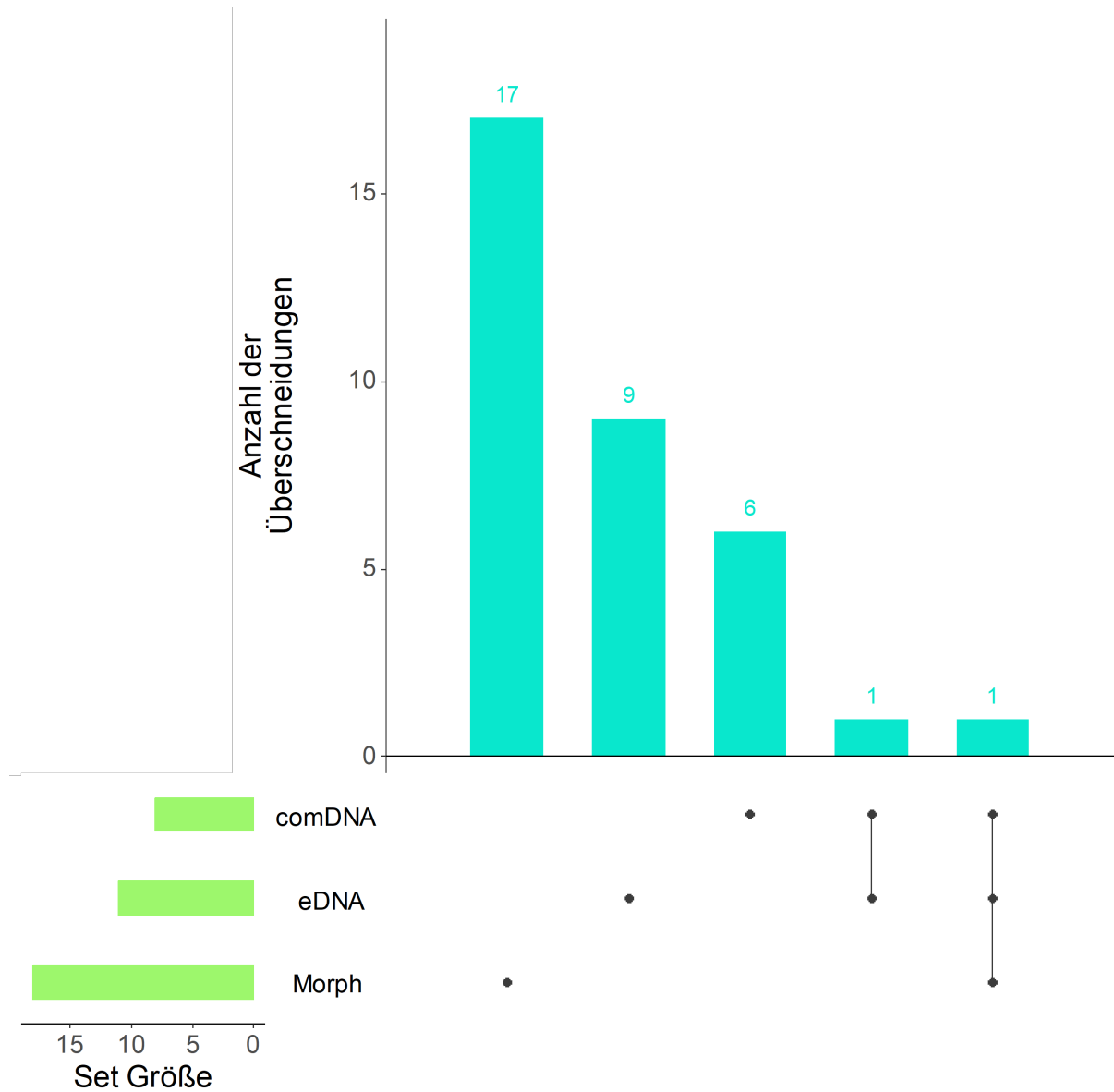
Tabelle 115: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BOV-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Bilobella aurantiaca</i>			*
<i>Calvatomina rossi</i>			*
<i>Ceratophysella denticulata</i>	*	*	*
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Deuteraphorura inermis</i>		*	*
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>			*
<i>Deutonura monticola</i>		*	
<i>Dicyrtomina minuta</i>			*
<i>Entomobrya clitellaria</i>			*
<i>Entomobrya marginata</i>			*
<i>Entomobrya nivalis</i>			*
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*	*	*
<i>Friesea grisea</i>			*
<i>Homidia laha</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotomiella minor</i>	*	*	
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>		*	
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>		*	*
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>		*	*
<i>Lipothrix lubbocki</i>	*		
<i>Megalothorax minimus</i>			*
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	*		
<i>Neelus murinus</i>			*
<i>Orchesella bifasciata</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Pseudosinella alba</i>	*	*	*
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sminthurinus similitortus</i>			*
<i>Sphyrotheca aleta</i>			*
<i>Supraphorura furcifera</i>		*	*
<i>Tomocerus sibiricus</i>		*	
Summe	7	12	25

B.3.4 BRU: Bruchsal (Forst), Baden-Württemberg

Abbildung 107: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden



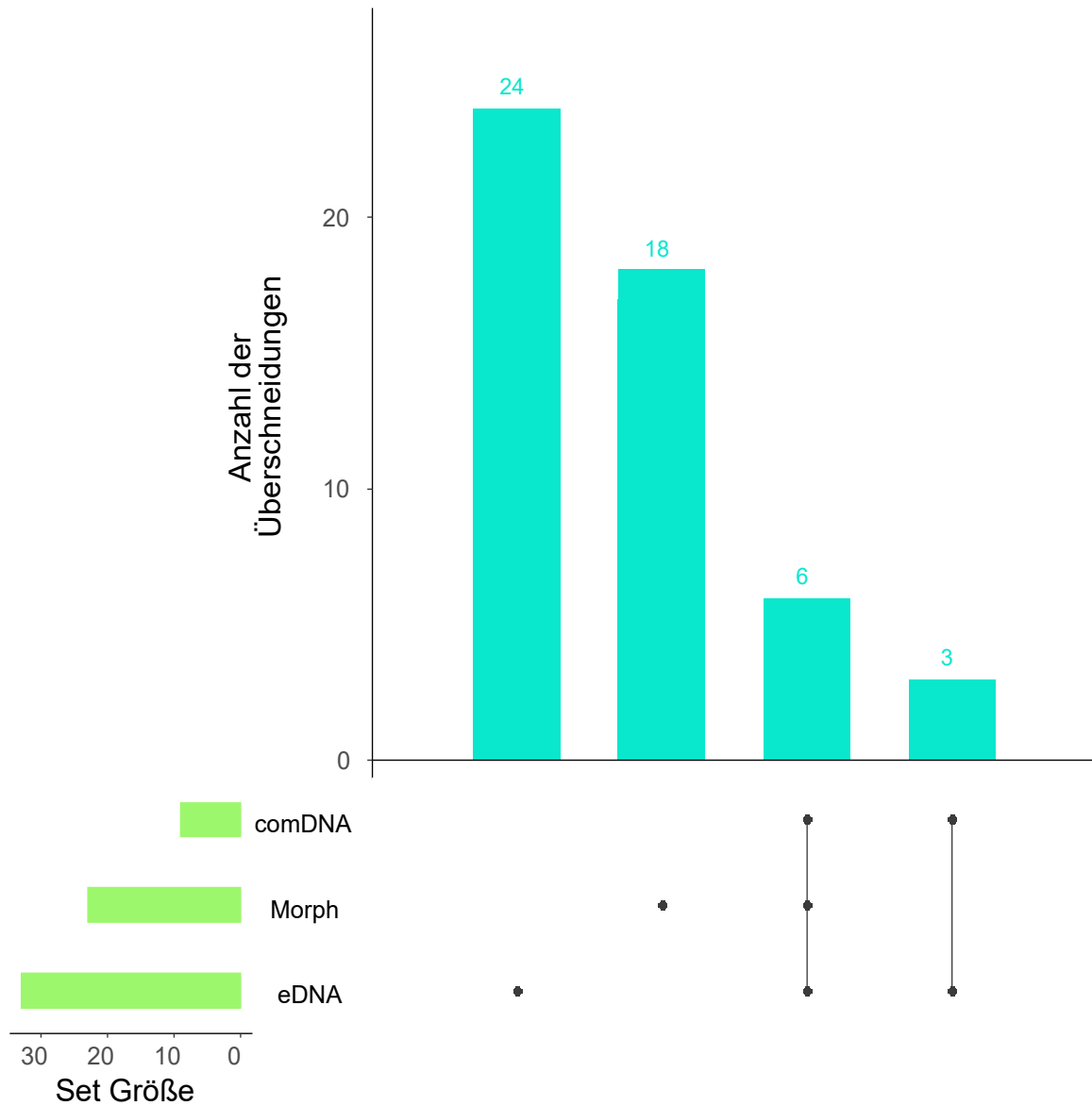
Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Tabelle 116: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der BRU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Anurida tullbergi</i>			*
<i>Brachystomella parvula</i>		*	
<i>Cryptopygus bipunctatus</i>	*		
<i>Cryptopygus caecus</i>		*	*
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>			*
<i>Entomobrya atrocincta</i>			*
<i>Entomobrya marginata</i>			*
<i>Folsomia quadrioculata</i>			*
<i>Heteromurus nitidus</i>			*
<i>Homidia laha</i>			*
<i>Isotomiella minor</i>		*	
<i>Isotomodes productus</i>	*		
<i>Kaylathalia klofstadi</i>			*
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>		*	
<i>Megalothorax svalbardensis</i>		*	
<i>Mesaphorura isochaeta</i>	*		
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	*		
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Protaphorura armata</i>		*	
<i>Pseudachorutella asigillata</i>	*		
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sphaeridia pumilis</i>	*		
<i>Stenacidia violacea</i>	*		
<i>Tomocerus sibiricus</i>		*	
Summe	8	8	11

B.3.5 EUT: Wüstenfelde (Eutin), Schleswig-Holstein

Abbildung 108: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

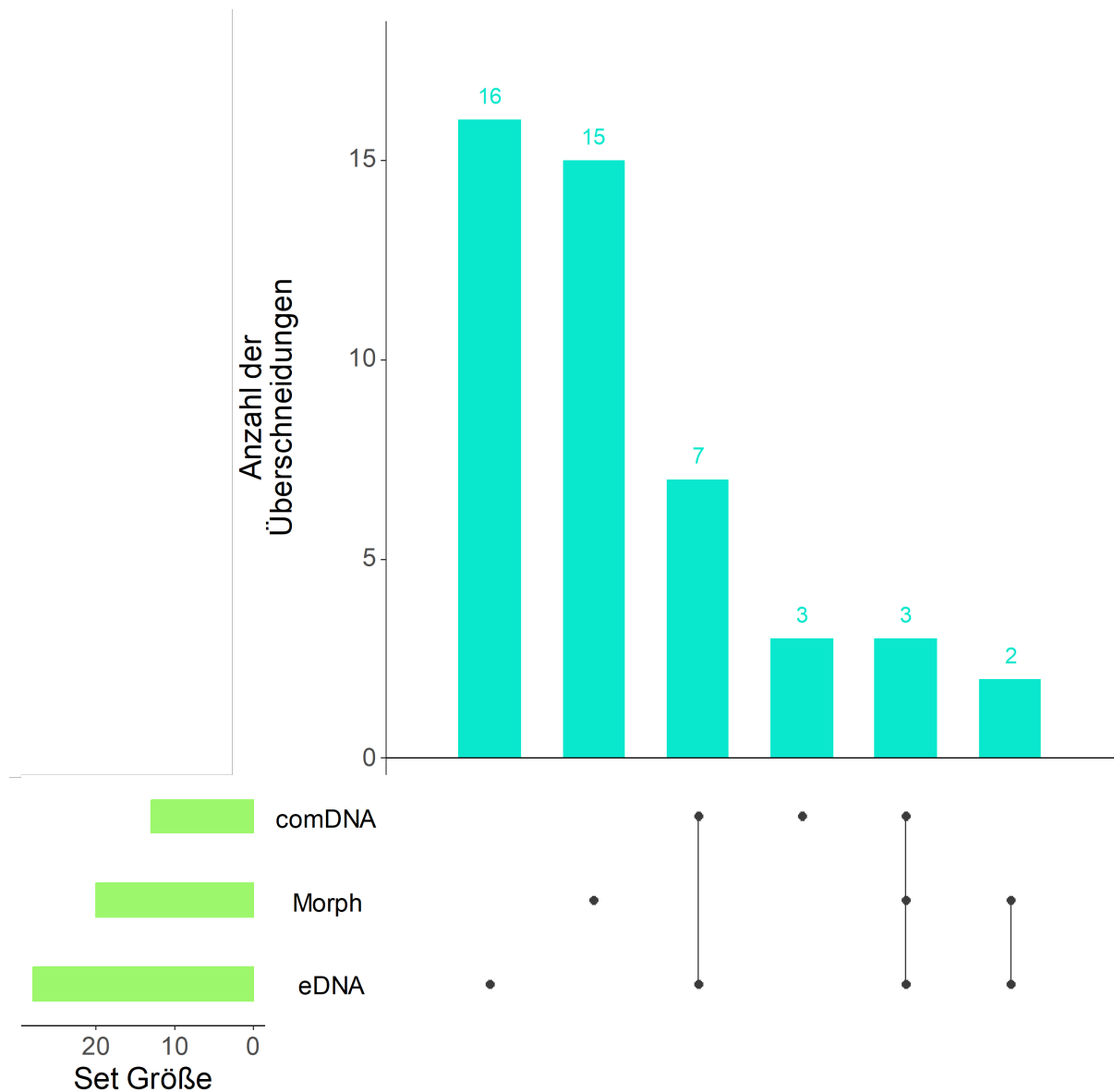
Tabelle 117: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der EUT-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Bilobella aurantiaca</i>			*
<i>Ceratophysella armata</i>	*		
<i>Ceratophysella denticulata</i>	*	*	*
<i>Crossodonthina laterisensillata</i>			*
<i>Cryptopygus antarcticus</i>			*
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>		*	*
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Dicyrtomina minuta</i>			*
<i>Dicyrtomina saundersi</i>			*
<i>Entomobrya assuta</i>			*
<i>Entomobrya clitellaria</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Folsomia penicula</i>			*
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*	*	*
<i>Hemisotoma thermophila</i>	*		
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotomiella minor</i>	*	*	*
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>			*
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>			*
<i>Megalothorax minimus</i>		*	*
<i>Megalothorax svalbardensis</i>			*
<i>Mesaphorura isochaeta</i>	*		
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	*		
<i>Mesaphorura tenuisensillata</i>	*		
<i>Micranurida pygmaea</i>			*
<i>Micraperura absoloni</i>			*

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Neanura muscorum</i>		*	*
<i>Neelus murinus</i>			*
<i>Orchesella flavescens</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Pogonognathellus flavescens</i>			*
<i>Pogonognathellus longicornis</i>			*
<i>Proisotoma minima</i>	*		
<i>Protaphorura armata</i>	*		
<i>Protaphorura pseudovanderdrifti</i>		*	*
<i>Protaphorura subarmata</i>	*		
<i>Pseudosinella alba</i>	*	*	*
<i>Sminthurides hyogramme</i>			*
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Supraphorura furcifera</i>	*		
<i>Tomocerina purpurithora</i>			*
<i>Willemia denisi</i>			*
Summe	14	9	33

B.3.6 FIS: Fichte Süd (Monschau), Nordrhein-Westfalen

Abbildung 109: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

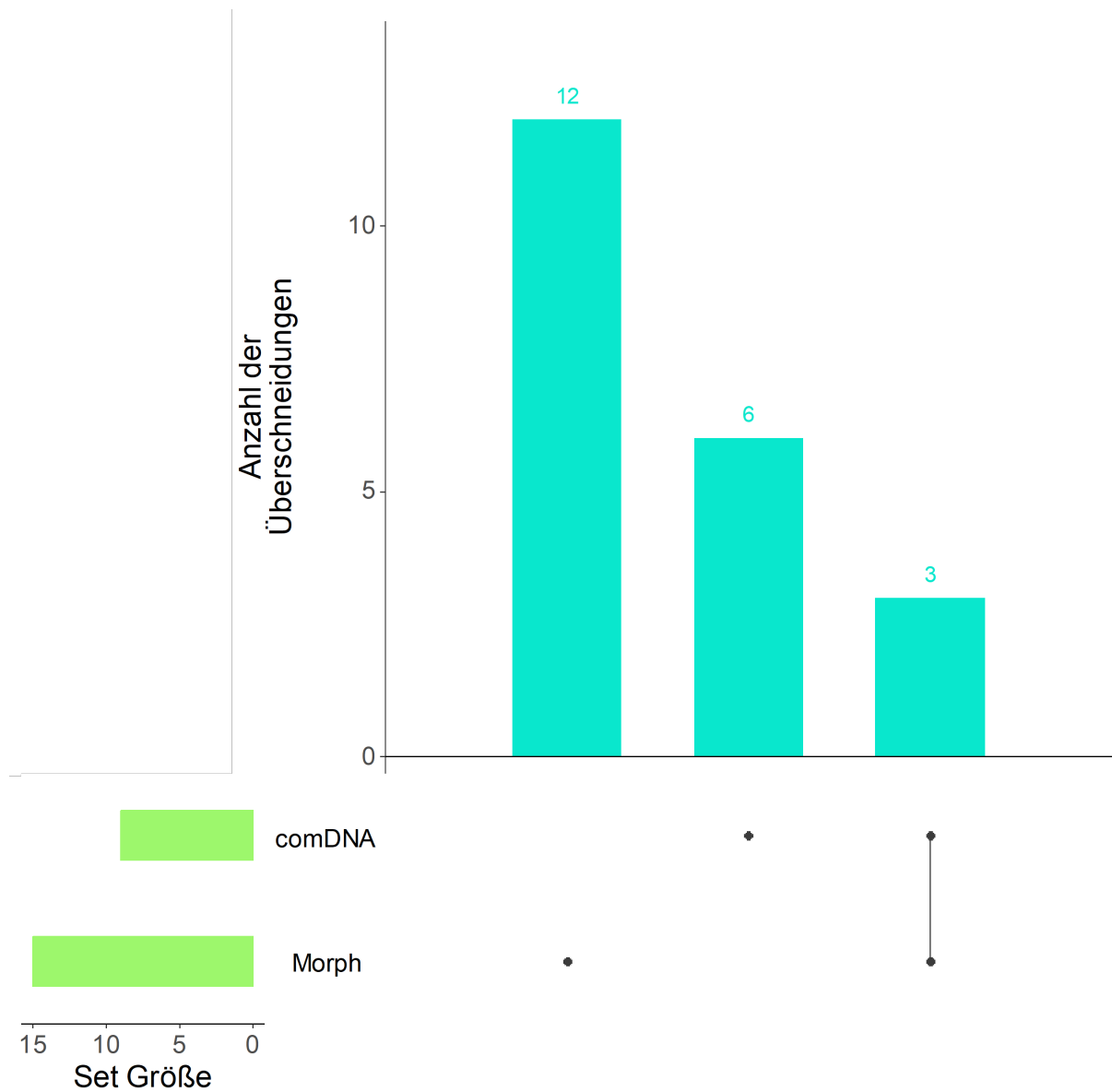
Tabelle 118: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der FIS-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Antarctophorus subpolaris</i>		*	*
<i>Ceratophysella granulata</i>			*
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Deutonura decolorata</i>			*
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Deutonura vallespirensis</i>			*
<i>Dicyrtomina ornata</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Entomobrya multifasciata</i>		*	*
<i>Folsomia candida</i>			*
<i>Folsomia penicula</i>		*	*
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*		
<i>Friesea claviseta</i>		*	
<i>Isotoma anglicana</i>	*		
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>		*	
<i>Isotomiella minor</i>	*	*	*
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>			*
<i>Lipothrix lubbocki</i>	*		
<i>Megalothorax minimus</i>			*
<i>Megalothorax svalbardensis</i>			*
<i>Mesaphorura tenuisensillata</i>	*		
<i>Micranurida pygmaea</i>			*
<i>Neanura muscorum</i>	*		*
<i>Orchesella bifasciata</i>		*	*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Pseudisotoma sensibilis</i>		*	*
<i>Pseudosinella alba</i>	*		
<i>Pseudosinella immaculata</i>			*
<i>Pseudosinella octopunctata</i>	*		
<i>Schoettella ununguilata</i>	*		
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sminthurinus elegans</i>		*	*
<i>Supraphorura furcifera</i>	*	*	*
<i>Tomocerus sibiricus</i>		*	
<i>Willemia anophthalma</i>			*
<i>Willemia denisi</i>		*	*
<i>Xenylla mediterranea</i>			*
Summe	11	13	28

B.3.7 GAL: Galgenberg (Elbingerode), Sachsen-Anhalt

Abbildung 110: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden



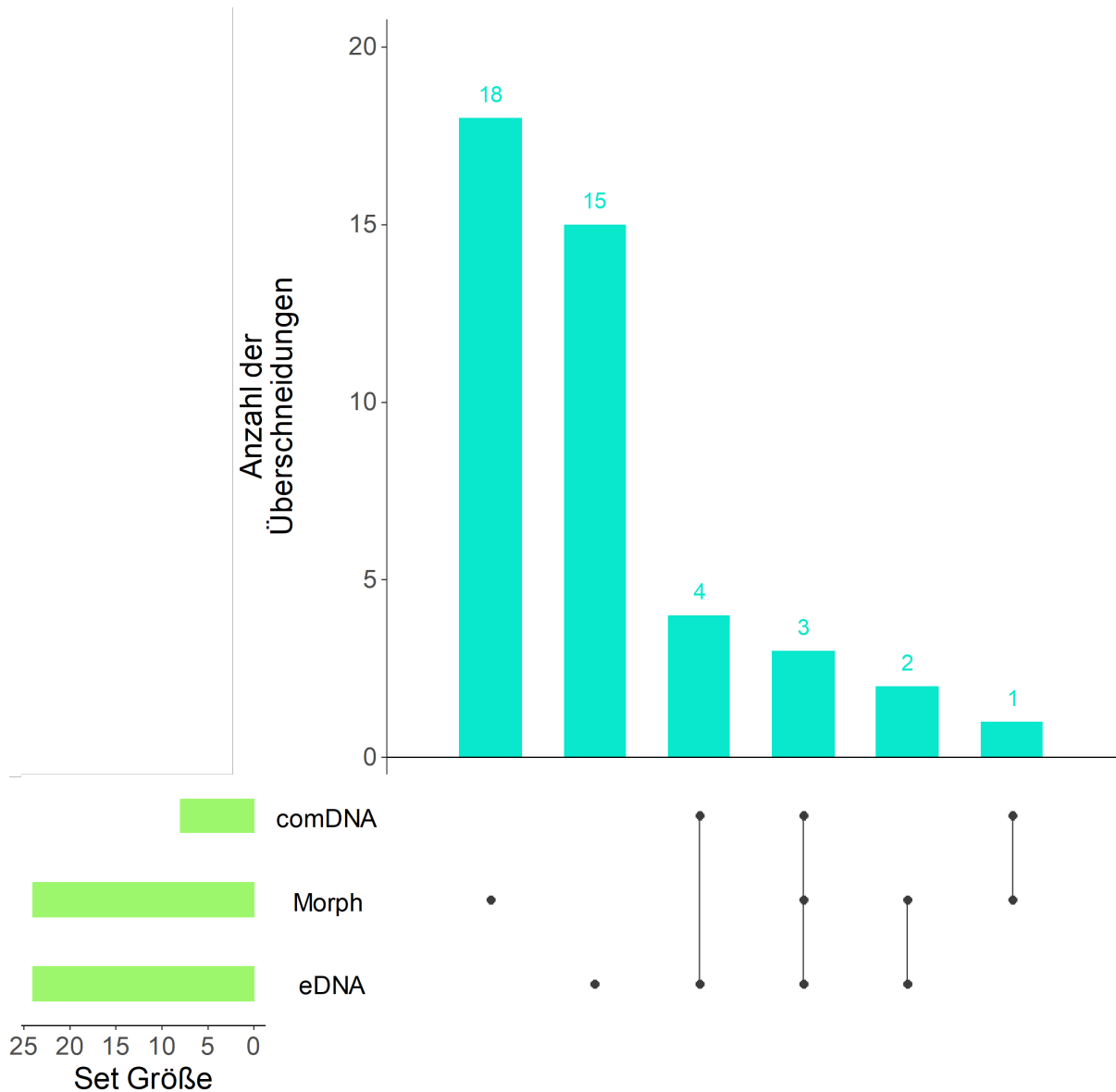
Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Tabelle 119: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der GAL-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Antarctophorus subpolaris</i>		*	
<i>Cryptopygus caecus</i>		*	
<i>Desoria hiemalis</i>	*		
<i>Desoria violacea</i>	*	*	
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*		
<i>Isotoma anglicana</i>	*		
<i>Isotoma viridis</i>		*	
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>		*	
<i>Metaphorura affinis</i>	*	*	
<i>Paratullbergia callipygus</i>	*		
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	
<i>Protaphorura armata</i>		*	
<i>Sminthurinus aureus</i>		*	
Summe	7	9	0

B.3.8 KAN: Kandel/Schaidt, Rheinland-Pfalz

Abbildung 111: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

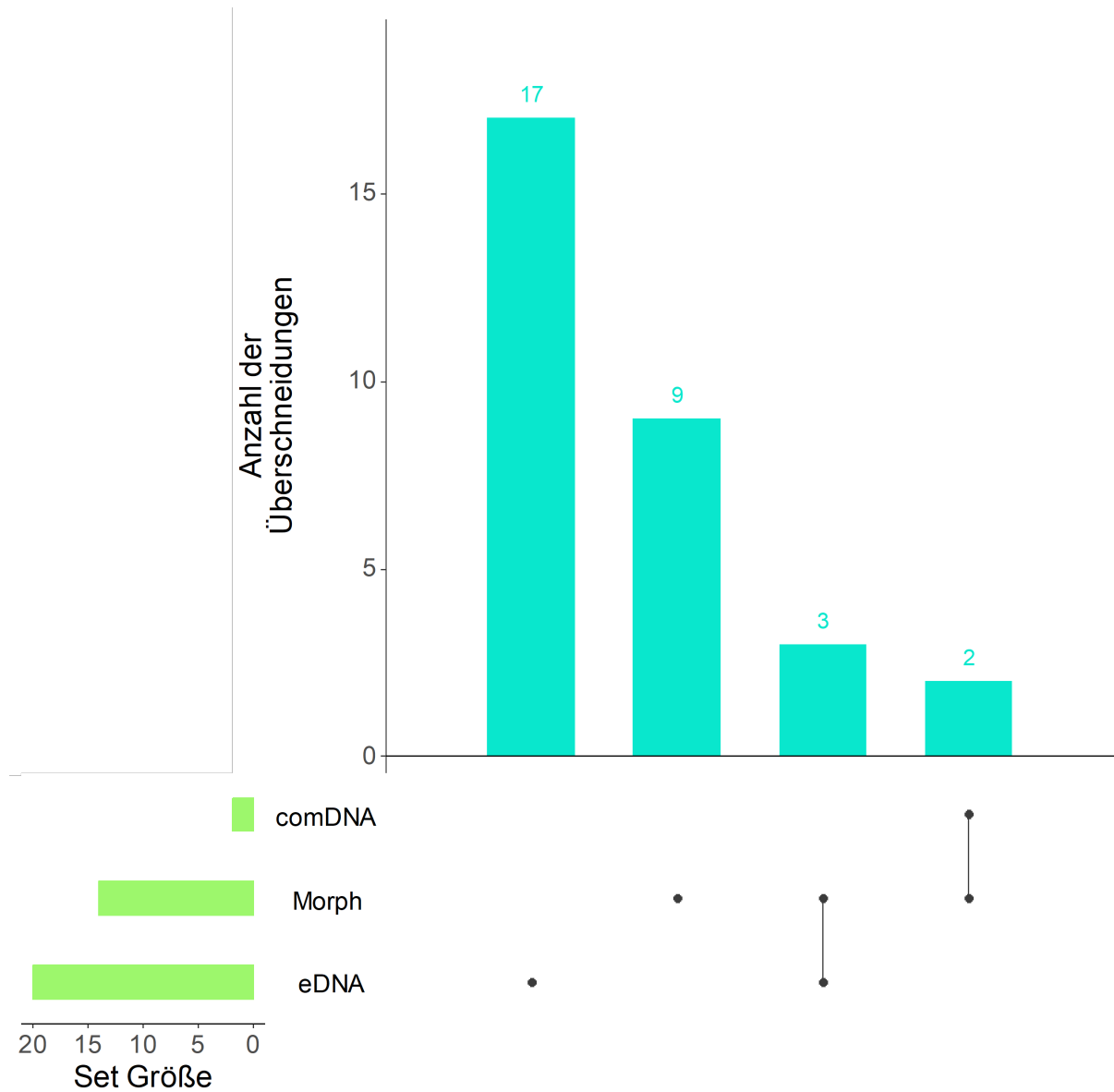
Tabelle 120: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KAN-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Arrhopalites caecus</i>	*		
<i>Arrhopalites pygmaeus</i>	*		
<i>Bilobella braunerae</i>			*
<i>Ceratophysella denticulata</i>	*	*	
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Dicyrtomina ornata</i>			*
<i>Entomobrya assuta</i>			*
<i>Entomobrya atrocincta</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Folsomia penicula</i>		*	*
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*		
<i>Friesea claviseta</i>			*
<i>Friesea truncata</i>	*		
<i>Gisinianus flammeolus</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>		*	*
<i>Isotomiella minor</i>	*		*
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>			*
<i>Megalothorax minimus</i>		*	*
<i>Megalothorax svalbardensis</i>			*
<i>Mesaphorura isochaeta</i>	*		
<i>Neanura muscorum</i>	*	*	*
<i>Orchesella cincta</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Pogonognathellus longicornis</i>			*
<i>Protaphorura armata</i>	*	*	*

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Pseudosinella alba</i>	*		
<i>Sminthurinus aureus</i>	*		*
<i>Sphaeridia pumilis</i>	*		
<i>Supraphorura furcifera</i>	*		
<i>Tomocerina purpurithora</i>			*
<i>Tomocerus minor</i>	*		
<i>Willemia denisi</i>		*	*
<i>Xenylla mediterranea</i>			*
Summe	15	8	24

B.3.9 KLK: Klein-Krauscha (Neißeau), Sachsen

Abbildung 112: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden



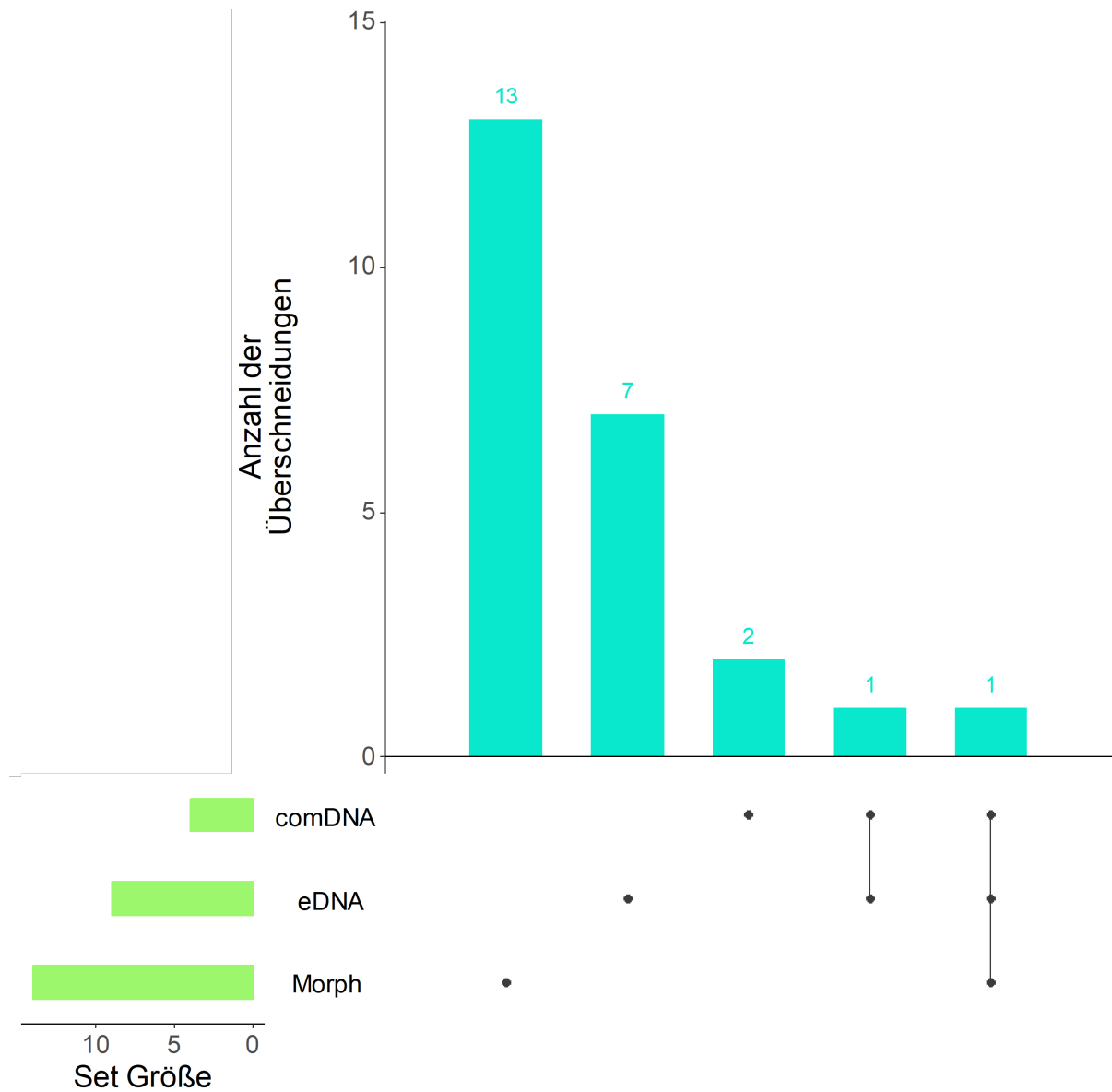
Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Tabelle 121: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der KLK-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Brachystomella parvula</i>	*	*	
<i>Crossodonthina laterisensillata</i>			*
<i>Dicyrtoma atra</i>			*
<i>Dicyrtomina minuta</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Entomobrya marginata</i>			*
<i>Entomobrya multifasciata</i>			*
<i>Folsomia candida</i>		*	
<i>Friesea ladeiroi</i>	*		
<i>Gressittacantha terranova</i>			*
<i>Hemisotoma thermophila</i>	*		
<i>Isotoma marionensis</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>			*
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>			*
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>			*
<i>Mesaphorura yosii</i>	*		
<i>Neanura muscorum</i>			*
<i>Orchesella cincta</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*		*
<i>Protaphorura aurantiaca</i>			*
<i>Seira nicoya</i>			*
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sminthurinus elegans</i>			*
<i>Sphyrotheca aleta</i>			*
<i>Xenylla mediterranea</i>			*
Summe	5	2	20

B.3.10 LIS: Saarlouis-Lisdorf, Saarland

Abbildung 113: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden



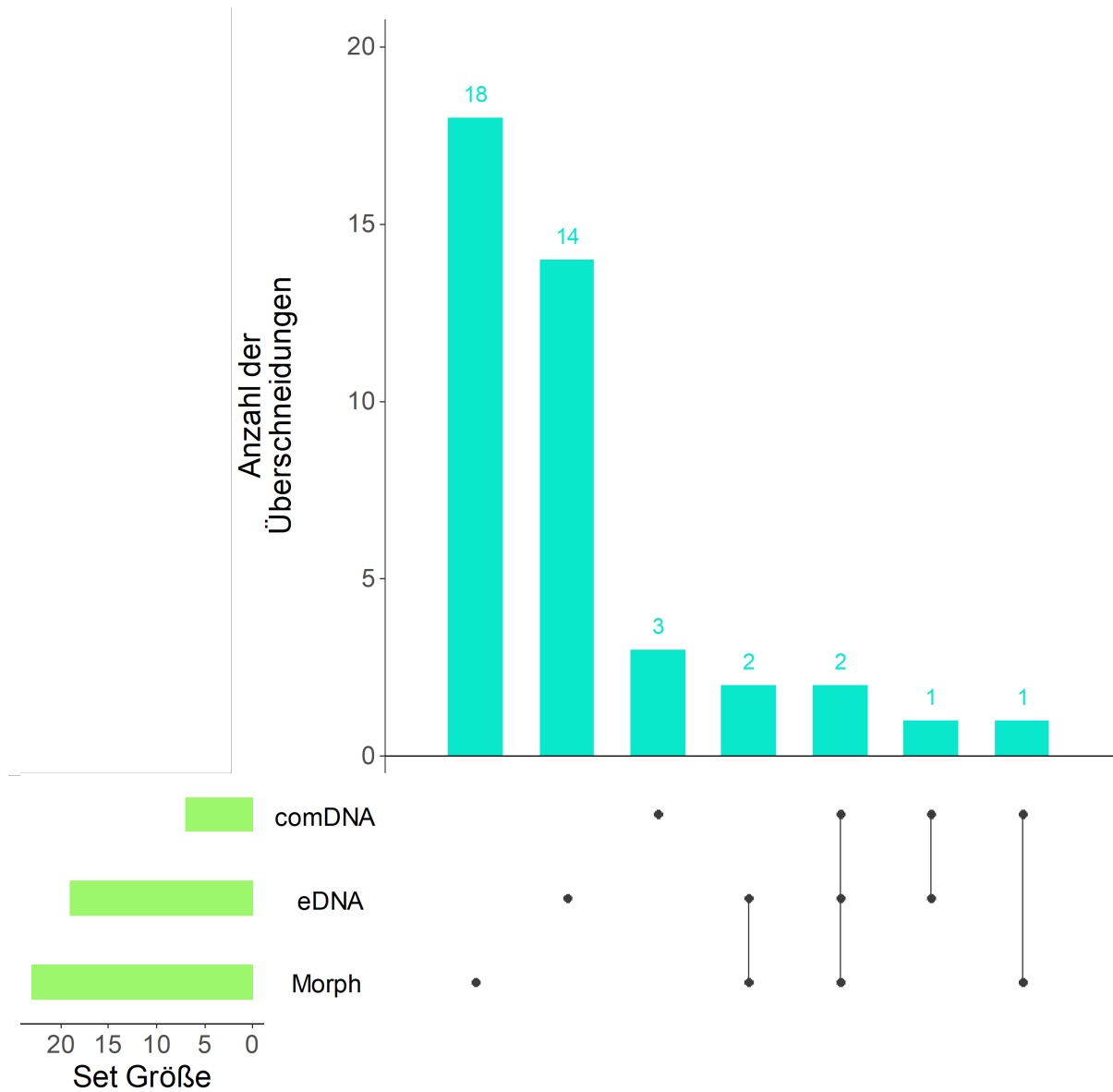
Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Tabelle 122: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der LIS-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Anurophorus palearcticus</i>			*
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Folsomia inoculata</i>	*		
<i>Folsomia quadrioculata</i>			*
<i>Heteromurus major</i>		*	
<i>Homidia phjongjangica</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>		*	*
<i>Isotomurus palustris</i>		*	
<i>Lepidocyrtus violaceus</i>	*		
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Pseudanurophorus quadrioculatus</i>	*		
<i>Pseudosinella alba</i>	*		
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Willowsia nigromaculata</i>			*
Summe	5	4	9

B.3.11 MER: Merzalben, Rheinland-Pfalz

Abbildung 114: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Tabelle 123: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der MER-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Antarctophorus subpolaris</i>			*
<i>Arrhopalites caecus</i>	*		
<i>Arrhopalites pygmaeus</i>	*		
<i>Ceratophysella denticulata</i>	*	*	
<i>Cryptopygus antarcticus</i>			*
<i>Dicyrtomina minuta</i>			*
<i>Dicyrtomina ornata</i>			*
<i>Entomobrya assuta</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*		
<i>Friesea claviseta</i>		*	*
<i>Friesea truncata</i>	*		
<i>Gisinianus flammeolus</i>			*
<i>Heteromurus nitidus</i>			*
<i>Homidia sinensis</i>			*
<i>Isotoma anglicana</i>	*		
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotomiella minor</i>	*	*	*
<i>Megalothorax svalbardensis</i>			*
<i>Megalothorax willemi</i>			*
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	*		
<i>Neanura muscorum</i>	*	*	*
<i>Parisotoma ekmani</i>		*	
<i>Parisotoma notabilis</i>	*		*
<i>Protaphorura armata</i>	*		
<i>Protaphorura pseudovanderdrifti</i>		*	

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Protaphorura tricampata</i>	*		
<i>Pseudanurophorus binoculatus</i>	*		
<i>Sminthurinus aureus</i>	*		*
<i>Sphyrotheca aleta</i>			*
<i>Xenylla grisea</i>		*	
<i>Xenylla tullbergi</i>			*
Summe	14	7	19

B.3.12 NEU: Neuhäuserfelde (Neuhaus), Niedersachsen

Abbildung 115: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden

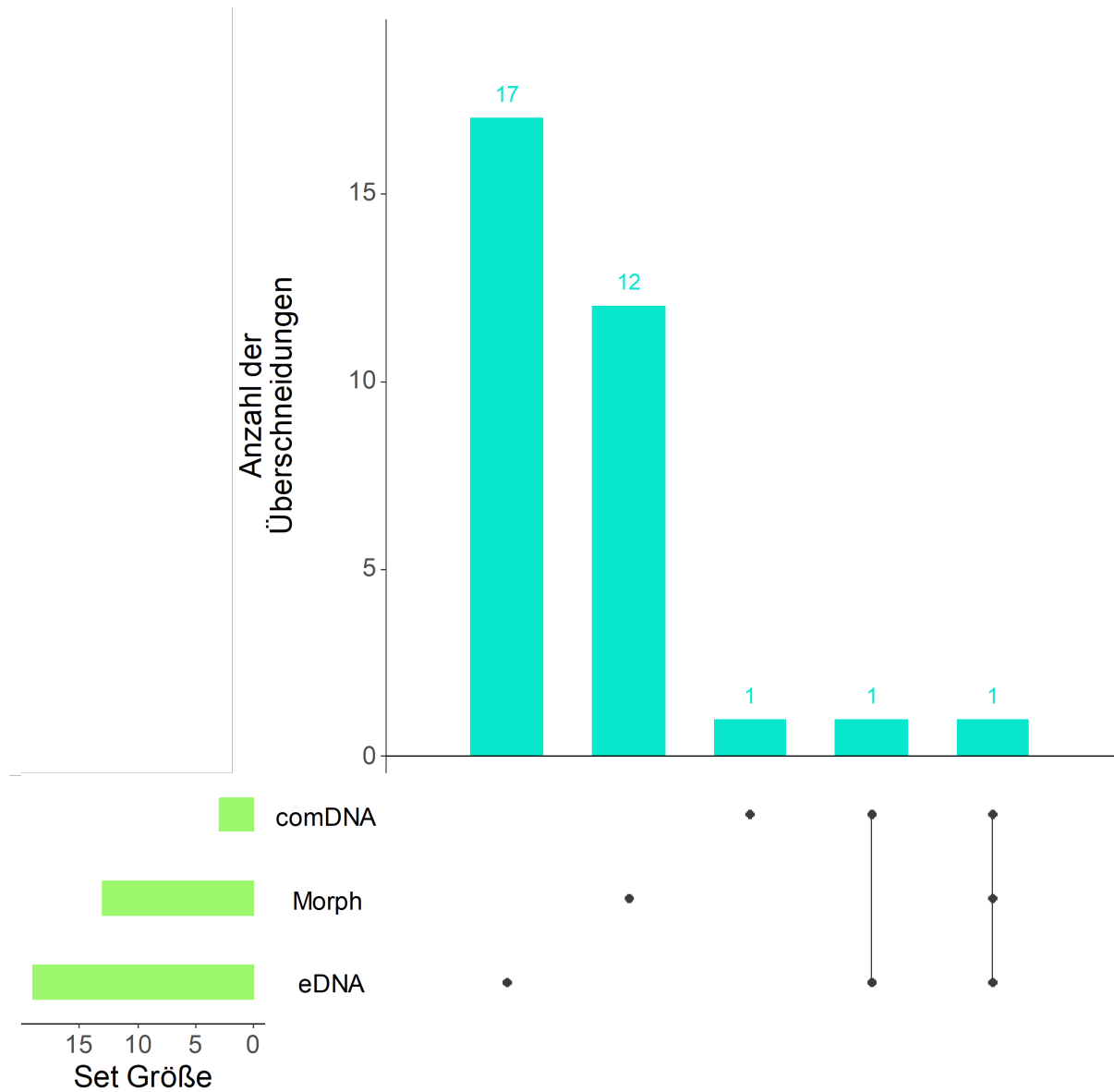
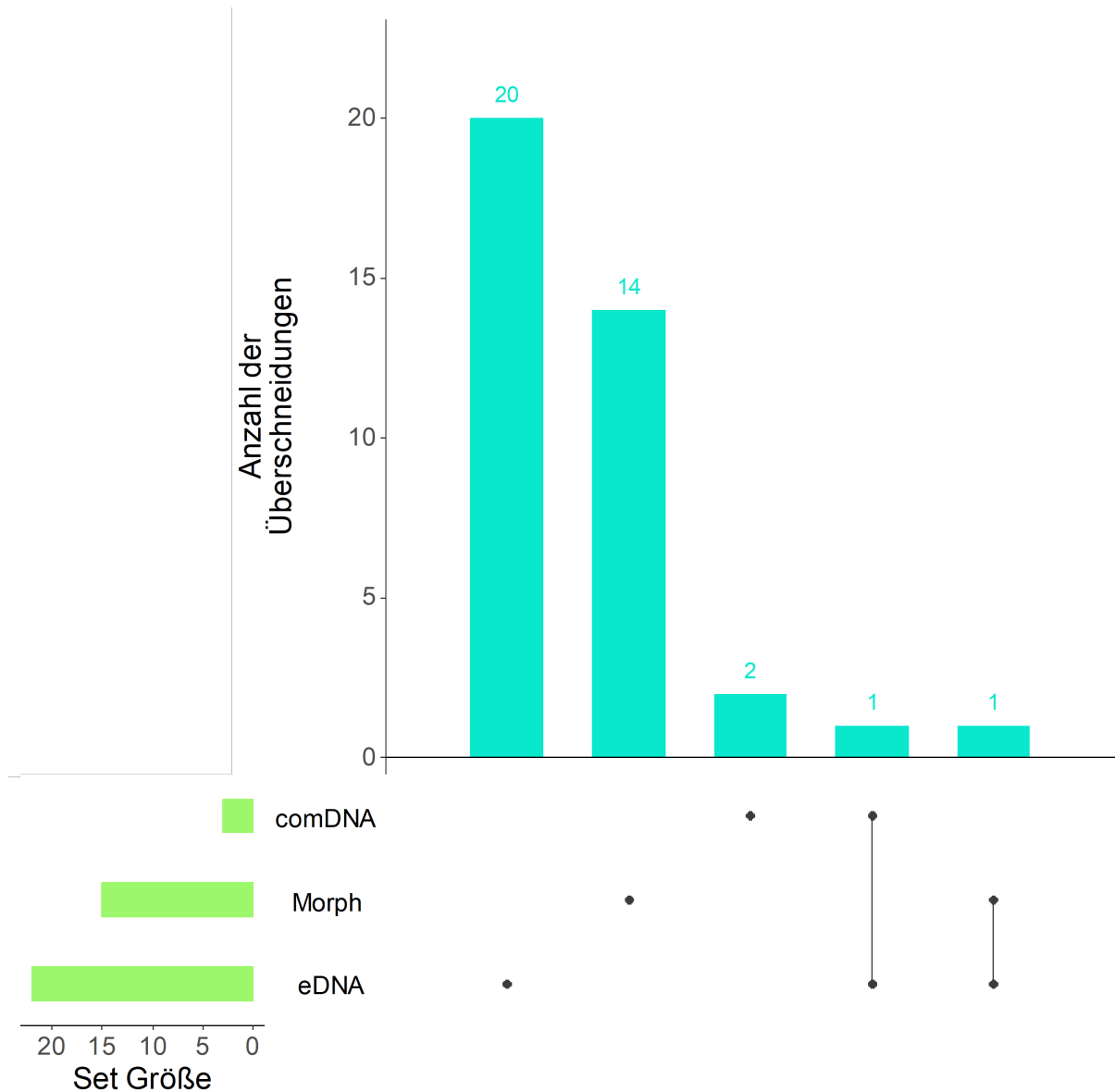


Tabelle 124: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der NEU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Bilobella aurantiaca</i>			*
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Desoria gracillisetia</i>			*
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Entomobrya atrocincta</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Folsomia similis</i>			*
<i>Hemisotoma thermophila</i>	*		
<i>Heteromurus nitidus</i>			*
<i>Homidia phjongjangica</i>			*
<i>Isotoma marionensis</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>			*
<i>Isotomurus fucicolus</i>			*
<i>Isotomurus plumosus</i>			*
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	*		
<i>Megalothorax nigropunctatus</i>			*
<i>Megalothorax willemi</i>		*	*
<i>Orchesellides sinensis</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sminthurinus elegans</i>		*	
<i>Tomocerina purpurithora</i>			*
Summe	3	3	19

B.3.13 PAU: Paulinenaue, Brandenburg

Abbildung 116: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

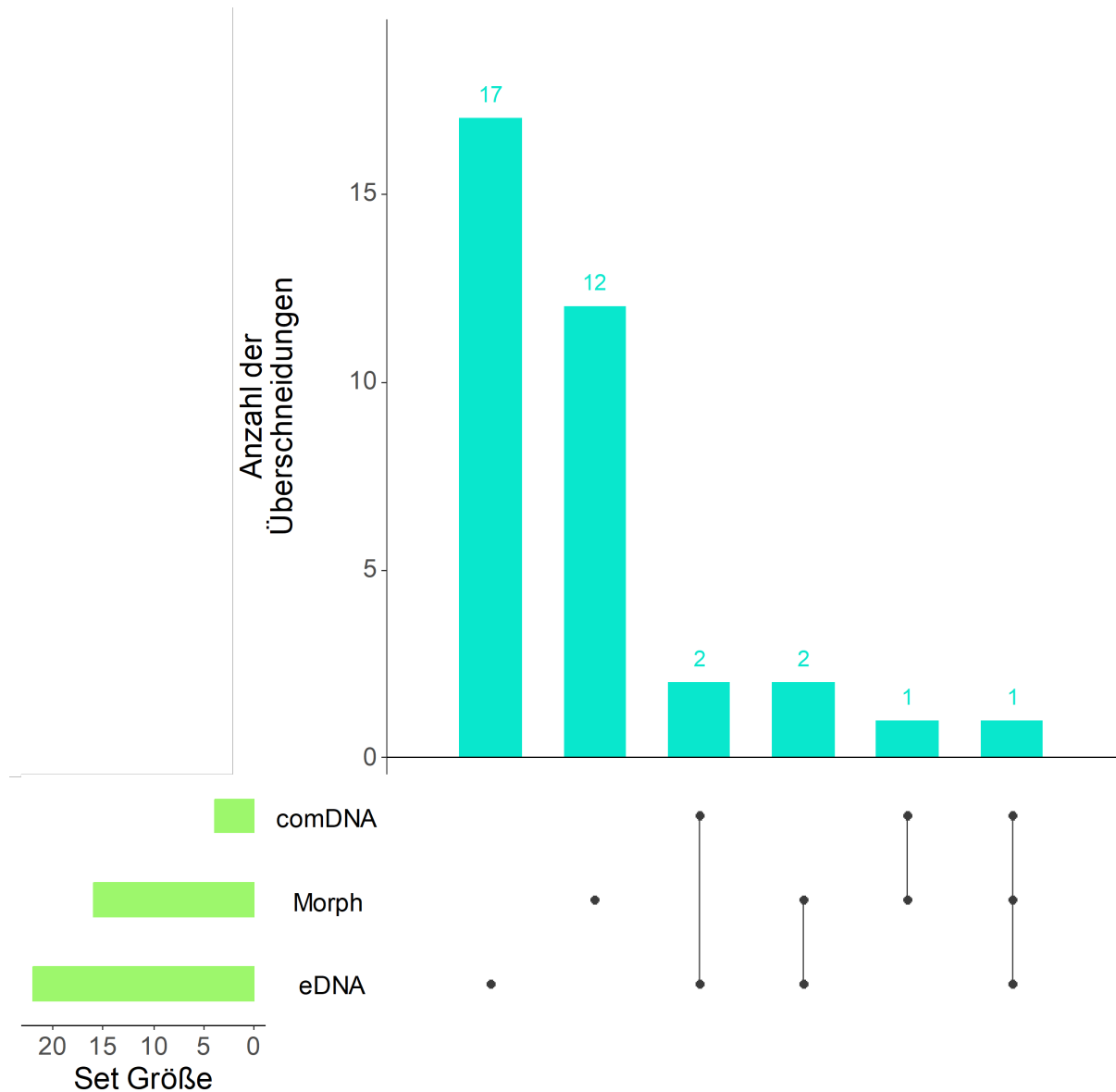
Tabelle 125: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der PAU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Ceratophysella denticulata</i>		*	
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>			*

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Entomobrya aino</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Entomobrya marginata</i>			*
<i>Folsomia manolachei</i>			*
<i>Heteromurus nitidus</i>			*
<i>Homidia phjongjangica</i>			*
<i>Isotoma anglicana</i>	*		
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>		*	*
<i>Isotomiella minor</i>	*		
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>			*
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>			*
<i>Mesaphorura krausbaueri</i>	*		
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	*		
<i>Orchesellides sinensis</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>			*
<i>Podura aquatica</i>			*
<i>Pogonognathellus flavescens</i>			*
<i>Protaphorura pseudovanderdrifti</i>		*	
<i>Pseudosinella alba</i>			*
<i>Sminthurides signatus</i>	*		
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sphaeridia pumilis</i>			*
<i>Sphyrotheca aleta</i>			*
<i>Willowsia nigromaculata</i>			*
Summe	5	3	22

B.3.14 SBU: Schlegeler Buchberg (Zittau-Schlegel), Sachsen

Abbildung 117: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

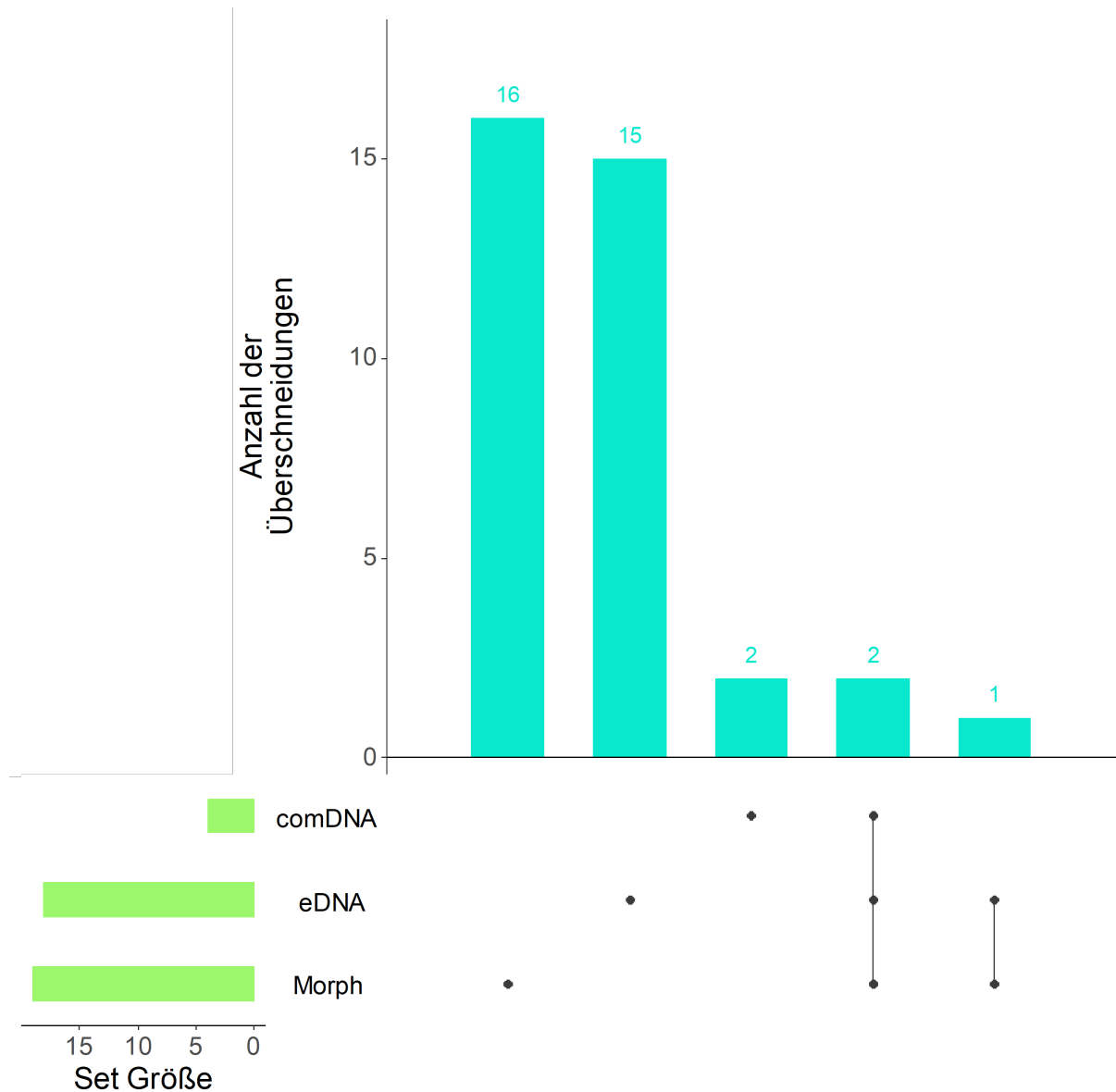
Tabelle 126: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SBU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Ceratophysella denisana</i>			*
<i>Ceratophysella sigillata</i>		*	*
<i>Cryptopygus caecus</i>			*

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Cryptopygus tricuspis</i>			*
<i>Deuterostminthurus sulphureus</i>			*
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Dicyrtoma atra</i>			*
<i>Dicyrtomina minuta</i>			*
<i>Entomobrya clitellaria</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Entomobrya nivalis</i>			*
<i>Folsomia elongata</i>			*
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*	*	
<i>Homidia laha</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotomiella minor</i>	*		*
<i>Isotomurus stuxbergi</i>		*	*
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	*		*
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>	*		
<i>Lipothrix lubbocki</i>	*		
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Pseudosinella alba</i>	*		
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sminthurinus elegans</i>			*
<i>Sminthurinus similitortus</i>			*
<i>Sphyrotheca aleta</i>			*
Summe	7	4	22

B.3.15 SHG: Schwanheim II (Kelsterbach), Hessen

Abbildung 118: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der SHG-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

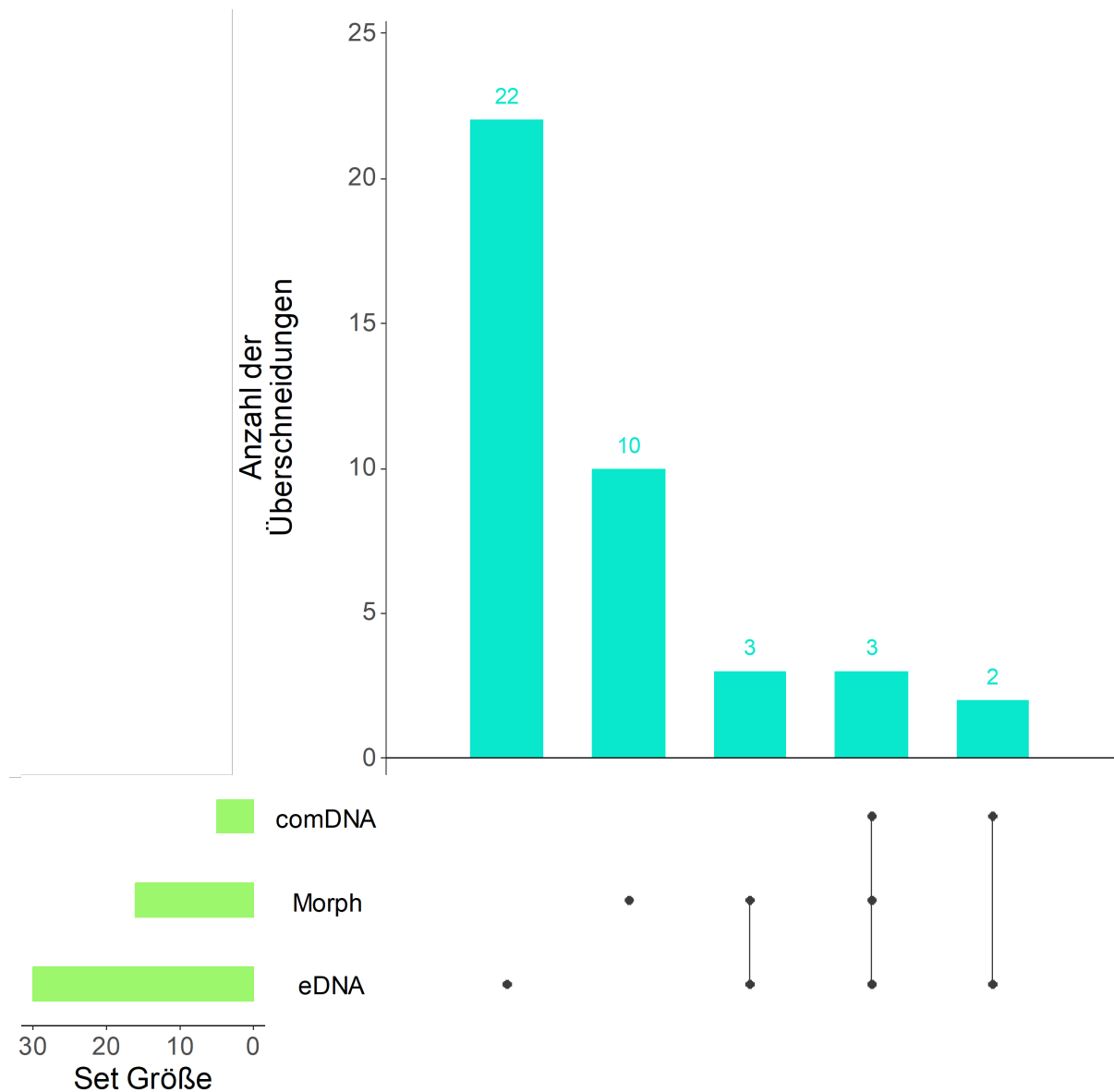
Tabelle 127: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SWG-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Anurida tullbergi</i>			*
<i>Anurophorus palearcticus</i>			*
<i>Arrhopalites caecus</i>	*		

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Cryptopygus bipunctatus</i>	*		
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Cryptopygus tricuspis</i>			*
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>			*
<i>Dicyrtoma fusca</i>			*
<i>Dicyrtomina fusca</i>	*		
<i>Dicyrtomina minuta</i>	*		
<i>Dicyrtomina ornata</i>	*		
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Entomobrya nivalis</i>			*
<i>Folsomia quadrioculata</i>			*
<i>Hypogastrura burkilli</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>			*
<i>Isotomiella minor</i>	*		
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>		*	
<i>Lepidocyrtus paradoxus</i>			*
<i>Neanura muscorum</i>			*
<i>Orchesellides sinensis</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Pseudosinella alba</i>	*	*	*
<i>Pseudosinella octopunctata</i>	*		
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Tomocerus sibiricus</i>		*	
Summe	9	4	18

B.3.16 SHW: Schwanheim 1 (Kelsterbach), Hessen

Abbildung 119: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der SHW-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

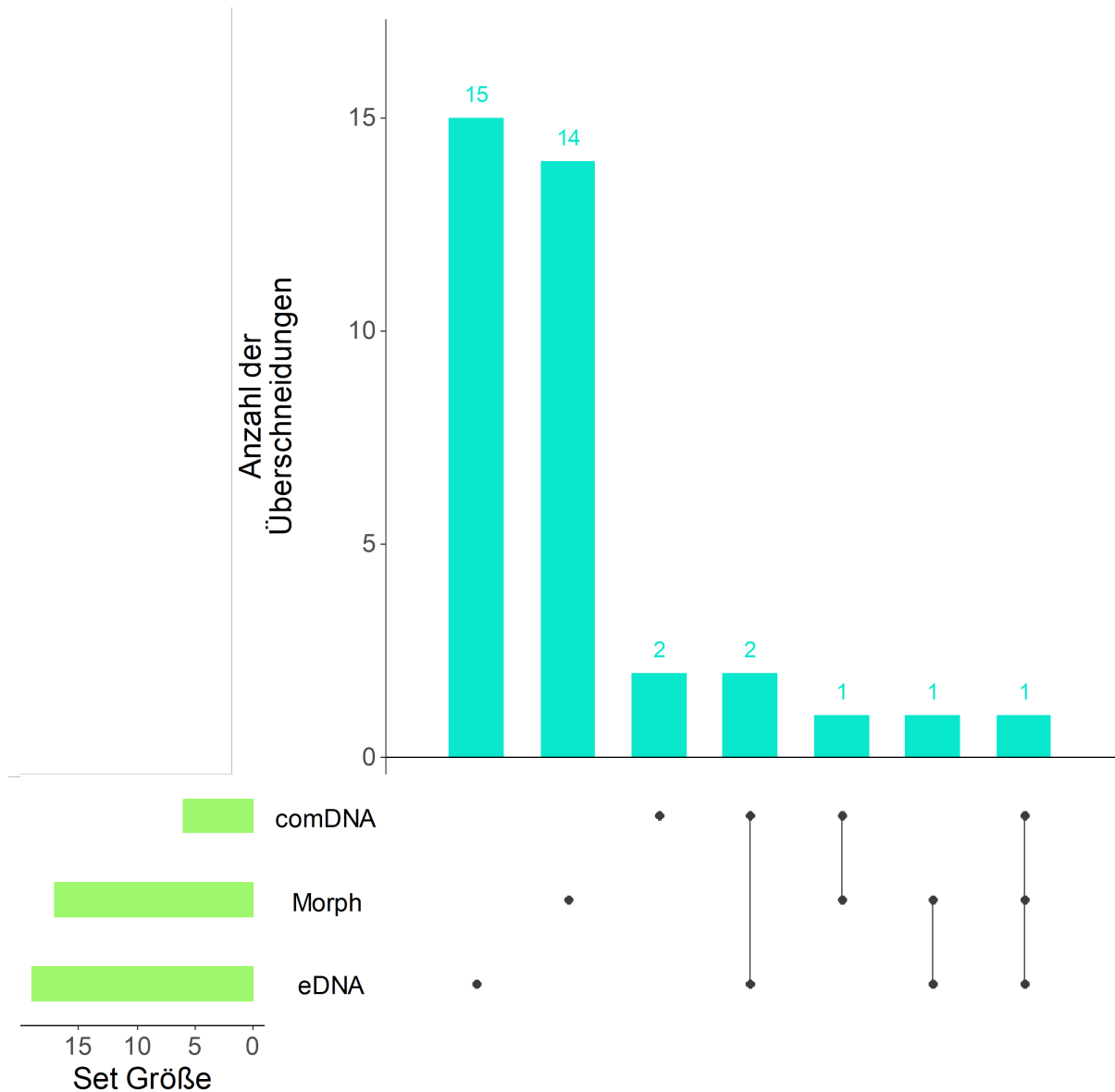
Tabelle 128: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SWW-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Antarctcinella monoculata</i>			*
<i>Crossodonthina laterisensillata</i>			*
<i>Cryptopygus antarcticus</i>			*
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>		*	*
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>			*
<i>Deutonura deficiens</i>			*
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Dicyrtomina ornata</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Entomobrya multifasciata</i>			*
<i>Entomobrya nivalis</i>			*
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*		*
<i>Gisinianus flammeolus</i>			*
<i>Homidia laha</i>			*
<i>Homidia socia</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>		*	*
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>			*
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>		*	*
<i>Megalothorax minimus</i>			*
<i>Metaphorura affinis</i>	*		
<i>Neanura muscorum</i>			*
<i>Orchesella bifasciata</i>			*
<i>Orchesella cincta</i>			*
<i>Paratullbergia callipygus</i>	*		
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Paronellides praefectus</i>			*

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Podura aquatica</i>			*
<i>Pseudisotoma sensibilis</i>			*
<i>Pseudosinella alba</i>	*	*	*
<i>Pseudosinella octopunctata</i>			*
<i>Sminthurinus aureus</i>	*		*
<i>Sminthurinus elegans</i>			*
Summe	6	5	30

B.3.17 SLT: Sülstorf, Mecklenburg-Vorpommern

Abbildung 120: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

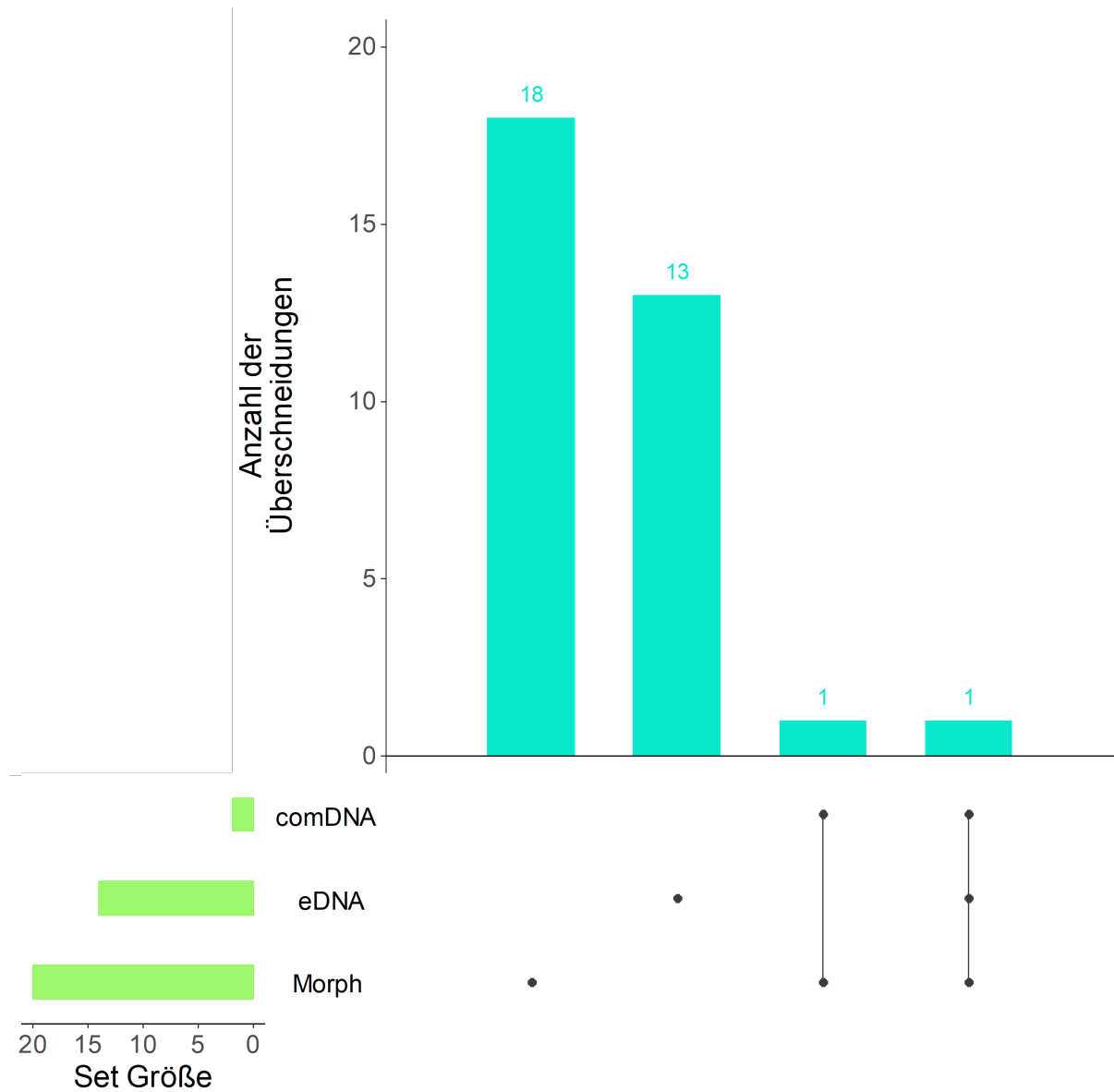
Tabelle 129: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der SLT-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Anurophorus palearcticus</i>			*
<i>Brachystomella parvula</i>	*	*	*
<i>Ceratophysella denticulata</i>			*

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Entomobrya aino</i>			*
<i>Entomobrya albocincta</i>	*		
<i>Entomobrya marginata</i>			*
<i>Entomobrya nivalis</i>			*
<i>Folsomia candida</i>		*	
<i>Folsomia manolachei</i>			*
<i>Folsomia similis</i>			*
<i>Hemisotoma thermophila</i>	*		
<i>Heteromurus nitidus</i>			*
<i>Hypogastrura papillata</i>	*		
<i>Hypogastrura vernalis</i>		*	
<i>Isotoma anglicana</i>	*		
<i>Isotoma marionensis</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>		*	
<i>Isotomodes productus</i>	*		
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>			*
<i>Lepidocyrtus lignorum</i>			*
<i>Mesaphorura critica</i>	*		
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	*		
<i>Parisotoma ekmani</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>		*	*
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sphaeridia pumilis</i>	*		
<i>Sphyrotheca aleta</i>			*
<i>Stenacidia violacea</i>		*	*
Summe	9	6	19

B.3.18 TRO: Trochtelfingen, Baden-Württemberg

Abbildung 121: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden



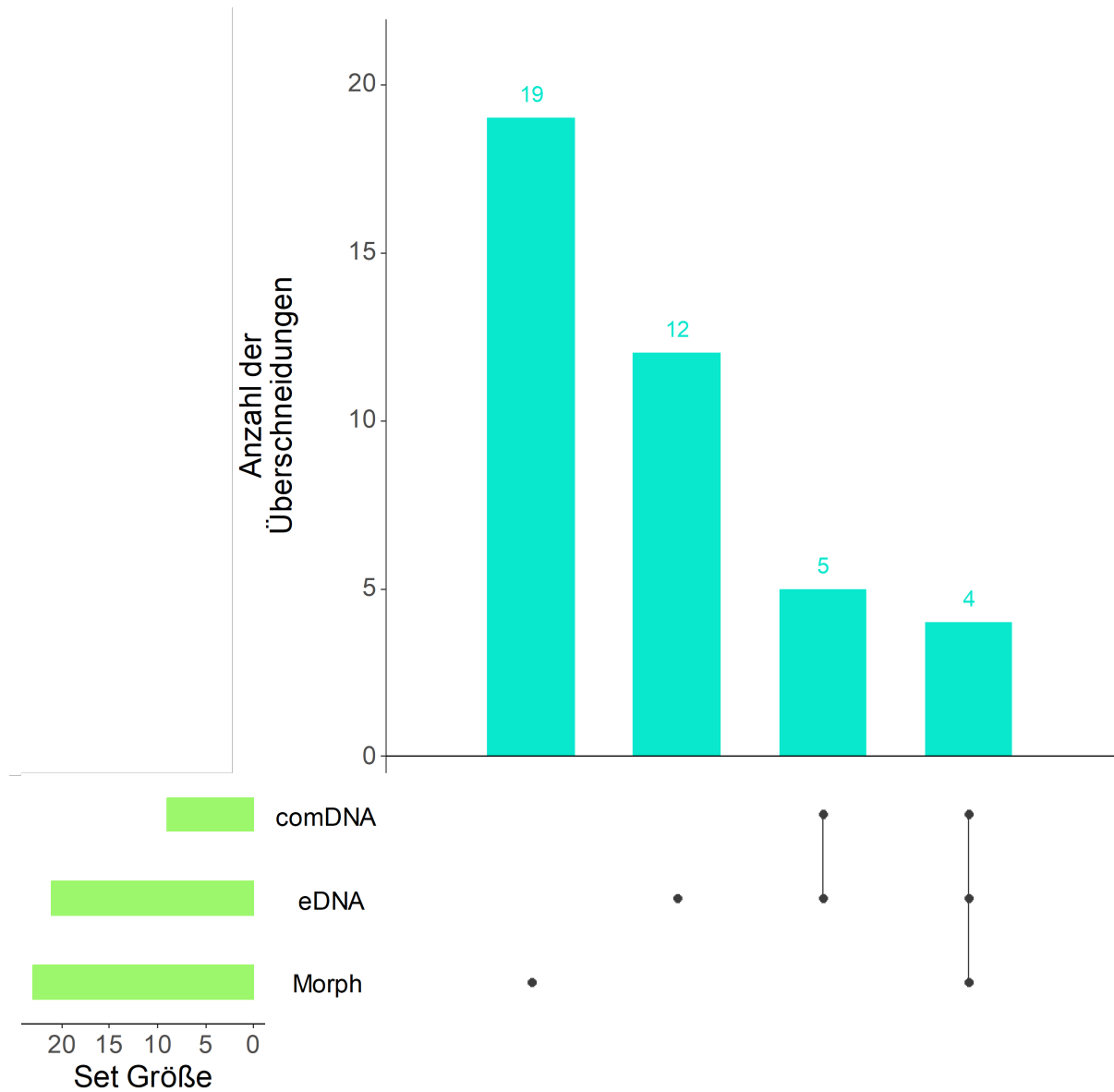
Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Tabelle 130: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der TRO-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Ceratophysella sigillata</i>			*
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>			*
<i>Dicyrtoma atra</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Entomobrya marginata</i>			*
<i>Folsomia inoculata</i>	*		
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*		
<i>Friesea truncata</i>	*		
<i>Homidia phjongjangica</i>			*
<i>Homidia sinensis</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>			*
<i>Isotomiella minor</i>	*		
<i>Isotomurus fucicolus</i>			*
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	*		
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	*		
<i>Orchesellides sinensis</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Pogonognathellus longicornis</i>			*
<i>Protaphorura armata</i>	*		
<i>Sphyrotheca aleta</i>			*
<i>Stenaphorura denisi</i>	*	*	
<i>Stenaphorura quadrispina</i>	*		
<i>Xenylla mediterranea</i>			*
Summe	10	2	14

B.3.19 WBU: Wächterbuche (Monschau), Nordrhein-Westfalen

Abbildung 122: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

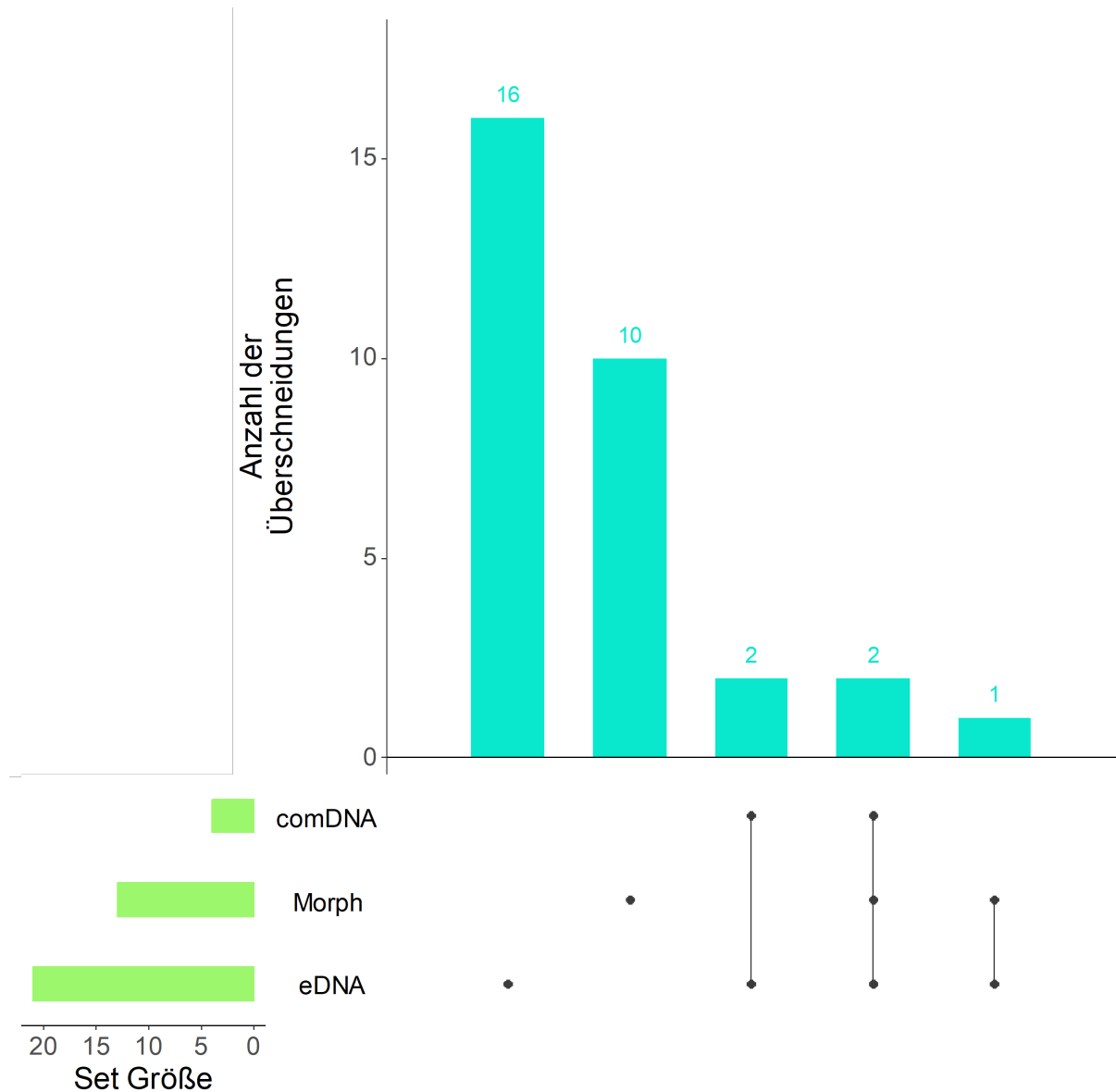
Tabelle 131: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WBU-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Arrhopalites caecus</i>	*		
<i>Arrhopalites pygmaeus</i>	*		
<i>Ceratophysella gibbosa</i>		*	*
<i>Cryptopygus antarcticus</i>			*
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Deutonura deficiens</i>			*
<i>Dicyrtomina minuta</i>			*
<i>Dicyrtomina ornata</i>	*	*	*
<i>Entomobrya atrocincta</i>			*
<i>Entomobrya clitellaria</i>			*
<i>Folsomia inoculata</i>	*		
<i>Folsomia penicula</i>		*	*
<i>Folsomia quadrioculata</i>	*		
<i>Friesea claviseta</i>		*	*
<i>Friesea truncata</i>	*		
<i>Isotomiella minor</i>	*	*	*
<i>Megalothorax minimus</i>			*
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	*		
<i>Micranurida pygmaea</i>			*
<i>Neanura muscorum</i>		*	*
<i>Neelus murinus</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Pogonognathellus flavescens</i>			*
<i>Protaphorura armata</i>		*	*
<i>Pseudosinella alba</i>	*		
<i>Schaeferia willemi</i>	*		

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Supraphorura furcifera</i>		*	*
<i>Tomocerus minor</i>	*		
<i>Willemia denisi</i>			*
<i>Xenyllodes armatus</i>	*		
Summe	13	9	21

B.3.20 WOL: Wolferschwenda, Thüringen

Abbildung 123: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden



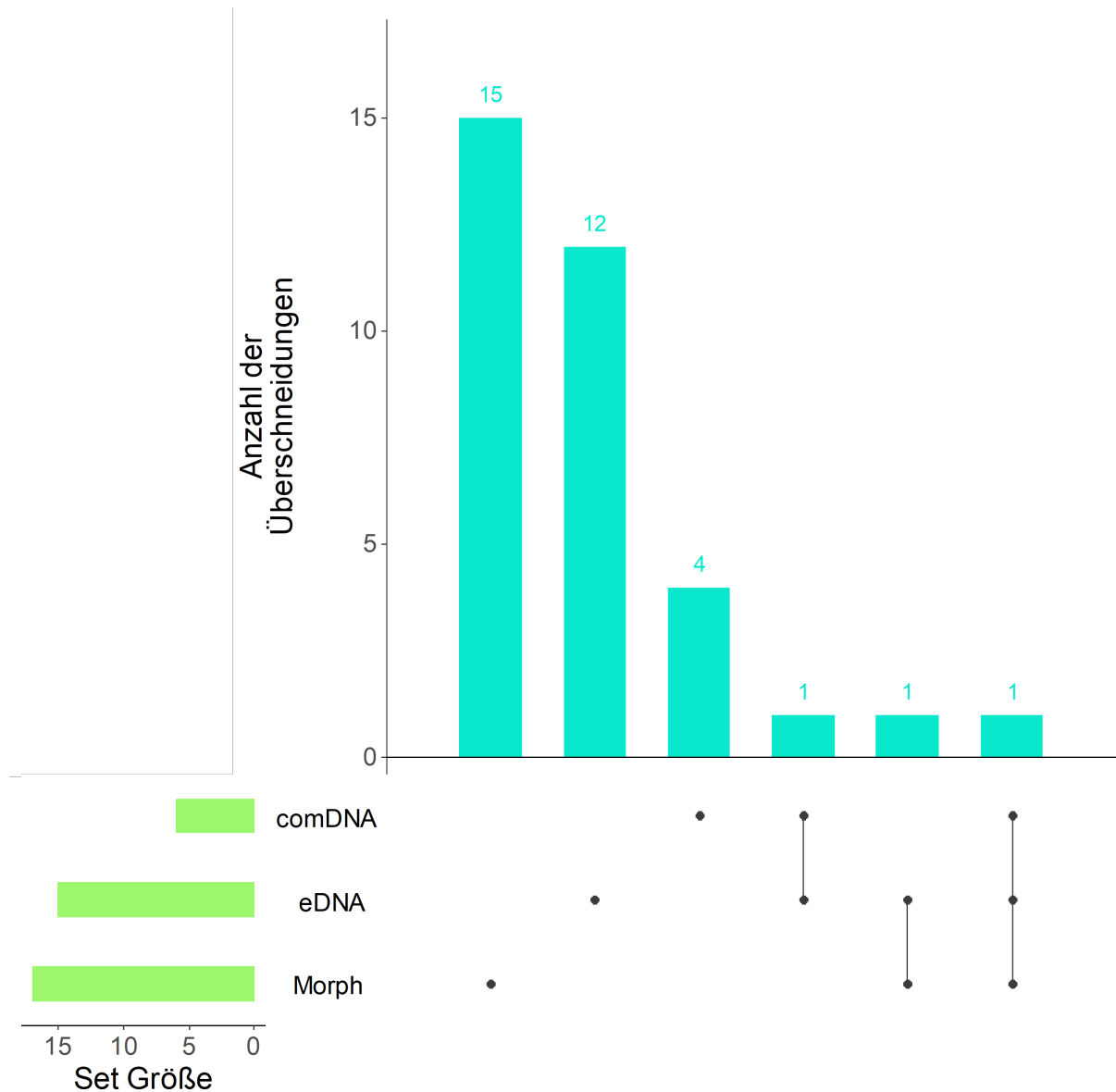
Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Tabelle 132: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der WOL-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Deutonura deficiens</i>			*
<i>Deutonura monticola</i>			*
<i>Dicyrtomina minuta</i>			*
<i>Dicyrtomina saundersi</i>			*
<i>Entomobrya gisini</i>			*
<i>Entomobrya multifasciata</i>			*
<i>Entomobrya nivalis</i>			*
<i>Folsomia candida</i>	*		
<i>Friesea claviseta</i>			*
<i>Homidia laha</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>			*
<i>Isotomiella minor</i>	*		*
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>		*	*
<i>Megalothorax nigropunctatus</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Pogonognathellus flavescens</i>			*
<i>Pseudosinella alba</i>	*	*	*
<i>Pseudosinella immaculata</i>			*
<i>Sminthurinus elegans</i>			*
<i>Willowsia nigromaculata</i>		*	*
Summe	4	4	21

B.3.21 ZEC: Zeckerin, Brandenburg

Abbildung 124: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

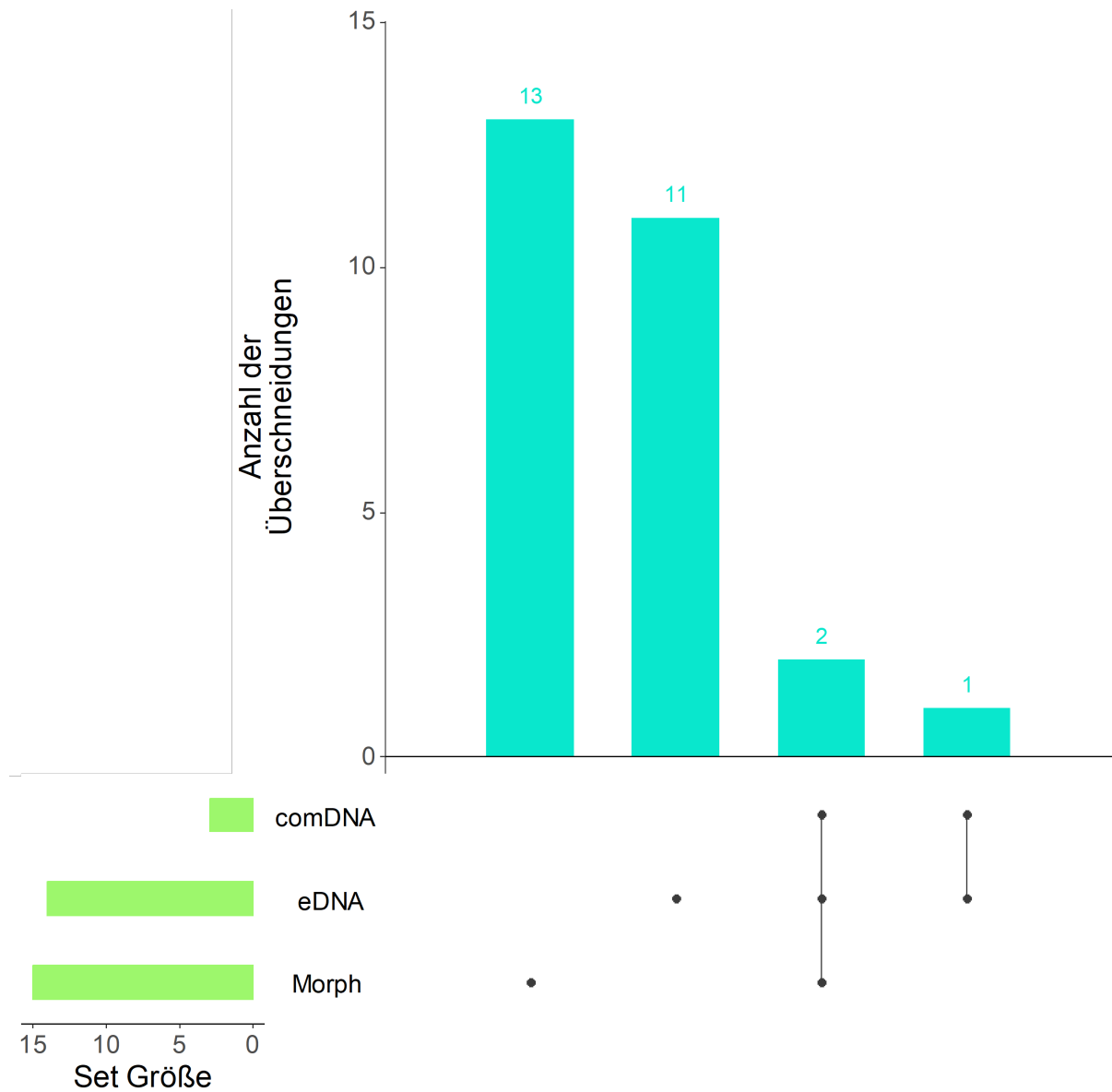
Tabelle 133: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZEC-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Crossodontina laterisensillata</i>			*
<i>Cryptopygus sverdrupi</i>			*
<i>Deuterosminthurus bicinctus</i>			*

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Deutonura decolorata</i>			*
<i>Entomobrya atrocincta</i>			*
<i>Entomobrya clitellaria</i>			*
<i>Entomobrya marginata</i>			*
<i>Folsomia candida</i>	*		
<i>Folsomia inoculata</i>	*		
<i>Friesea claviseta</i>		*	
<i>Friesea truncata</i>	*		
<i>Hemisotoma thermophila</i>	*		
<i>Homidia phjongjangica</i>			*
<i>Isotoma riparia</i>			*
<i>Isotoma viridis</i>		*	
<i>Isotomiella minor</i>	*		
<i>Lepidocyrtus arrabonicus</i>		*	
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	*		*
<i>Lepidocyrtus lanuginosus</i>		*	
<i>Lepidocyrtus paradoxus</i>		*	*
<i>Lepidocyrtus violaceus</i>	*		
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sminthurus viridis</i>			*
<i>Stenaphorura quadrispina</i>	*		
<i>Tomocerus nigrus</i>			*
Summe	9	6	15

B.3.22 ZIN: Zingst, Mecklenburg-Vorpommern

Abbildung 125: UpSet-Diagramm, das die Anzahl der Collembolenarten zeigt, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung (Morph), durch COI comDNA und durch COI eDNA-Metabarcoding in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden



Quelle: eigene Darstellung, Universität Aarhus

Tabelle 134: Collembolenarten, die gemeinsam und ausschließlich durch morphologische Bestimmung, durch comDNA- und durch eDNA-Metabarcoding in der ZIN-Probenahmestelle identifiziert wurden

Spezies	Morph.	comDNA	eDNA
<i>Calvatomina rossi</i>			*
<i>Ceratophysella denticulata</i>			*
<i>Dicyrtomina minuta</i>			*
<i>Entomobrya assuta</i>			*
<i>Entomobrya clitellaria</i>			*
<i>Folsomia quadrioculata</i>			*
<i>Hemisotoma thermophila</i>	*		
<i>Heteromurus nitidus</i>			*
<i>Hypogastrura papillata</i>	*		
<i>Isotoma anglicana</i>	*		
<i>Isotoma viridis</i>		*	*
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	*	*	*
<i>Megalothorax minimus</i>			*
<i>Parisotoma notabilis</i>	*	*	*
<i>Sminthurinus aureus</i>			*
<i>Sphaeridia pumilis</i>	*		
<i>Tomocerus nigrus</i>			*
<i>Xenylla mediterranea</i>			*
Summe	6	3	14