

2021

Sensitivität des eDNA-Nachweises von Zerkariendermatitis-
Erregern in oberösterreichischen Gewässern



Sensitivität des eDNA-Nachweises von Zerkariendermatitis-
Erregern in oberösterreichischen Gewässern



Projektbericht:
Sensitivität des eDNA-Nachweises von Zerkariendermatitis-Erregern
(Trematoda, Digenea, Schistosomatidae) in oberösterreichischen
Gewässern

Naturhistorisches Museum Wien (NHM)

Zentrale Forschungslaboratorien/ 3. Zoologische Abteilung/ ABOL

Burgring 7, 1010 Wien

Nikolaus Helmer, Elisabeth Haring, Christoph Hörweg, Helmut Sattmann,

Nikolaus Szucsich

(alle NHM)

Beauftragung: Amt der Oö. Landesregierung

Direktion Umwelt und Wasserwirtschaft

Abteilung Wasserwirtschaft

Gewässergüteaufsicht

Wien, 09.04.2021

Inhalt

1. Einleitung.....	5
1.1. Hintergrund und Ziele	5
1.2. Umwelt-DNA – „Environmental DNA“ (eDNA) und eDNA-Barcoding.....	7
2. Ziele der Studie.....	8
3. Methoden und Arbeitsplan	10
3.1. Modifikationen bedingt durch Umstände aufgrund der COVID-Pandemie.....	10
3.2. Freilandarbeit – Sammeln - Bestimmen.....	10
3.3. eDNA-Versuche – Probennahme.....	11
3.4. DNA-Analyse – DNA-Barcodes und Sequenzvergleiche	12
3.5. Etablierung der eDNA-PCR-Primer	14
3.6. DNA-Analyse – Nachweis von Trematoden-DNA in eDNA-Proben	15
3.7. Zerkarien-Schlüpfversuche.....	16
3.8. Test auf Sensitivität des PCR-Nachweises	16
3.9. Stammbaumerstellung	17
4. Ergebnisse	17
4.1. DNA-Analyse – DNA-Barcodes und Sequenzvergleich	17
4.2. Etablierung der eDNA-PCR-Primer	20
4.3. eDNA-Versuche – Freiland	21
4.4. eDNA-Versuche – Labor	23
4.5. Schlüpfversuche	24
4.6. Verdünnungsreihe.....	25
4.7. DNA-basierter Baum.....	26
5. Diskussion.....	28
5.1. PCR-Primer zum Nachweis von <i>Trichobilharzia</i> -Arten	28

5.2. Haltbarkeit der DNA und Sensitivität des PCR-Nachweises	29
5.3. eDNA-Barcoding zur Detektion von <i>Trichobilharzia</i> in der Praxis.....	30
5.4. Verbreitung von <i>Trichobilharzia</i> -Arten	32
6. Zusammenfassung.....	34
7. Literatur.....	35
Appendix – Tabellen.....	38

Team: Florian Billinger (Uni Salzburg), Hubert Blatterer (Land OÖ), Jana Bulantová (Uni Prag), Michael Duda (NHM Wien), Hans-Peter Grasser (Land OÖ), Elisabeth Haring (NHM Wien), Wolfgang Heinisch (Land OÖ), Nikolaus Helmer (NHM Wien), Christoph Hörweg (NHM Wien), Luise Kruckenhauser (NHM Wien), Zuzana Pokrupová (Uni Prag), Susanne Reier (NHM Wien), Helmut Sattmann (NHM Wien), Nikolaus Szucsich (NHM Wien)

1. Einleitung

1.1. Hintergrund und Ziele

Die vorliegende Studie des Jahres 2020 schließt an die Pilotstudie des Jahres 2019 an, in der die Grundlagen für einen genetischen Nachweis von Zerkariendermatitis-Erregern (Schistosomatidae) mittels DNA-Barcoding geschaffen wurden.

Saugwürmer (Trematoden) sind obligatorische Parasiten von Tieren. Eine der beiden Großgruppen, die Digenea, nutzen als Endwirte Wirbeltiere - in diesen findet die geschlechtliche Fortpflanzung statt. Erste Zwischenwirte (ungeschlechtliche Fortpflanzung) sind immer Mollusken, häufig aquatische Schnecken (Abb. 1), die von Schwimmlarven, sogenannten Mirazidien, befallen werden, welche sich aus den mit dem Kot der Endwirte freigesetzten Eiern entwickeln. Bei der Familie Schistosomatidae dringen die in den Schnecken durch ungeschlechtliche Vermehrung entstehenden Larven (Zerkarien) (Abb. 2) aktiv in den Endwirt ein. Bei den meisten anderen digenen Trematoden ist/sind noch ein zweiter oder weitere Zwischenwirt(e) eingeschaltet und die Infektion erfolgt häufig durch den Verzehr dieser Zwischenwirte (Sattmann & Hörweg 2019).



Abb. 1: Die Spitzhornschncke (*Lymnaea stagnalis*), ein häufiger Zwischenwirt von Trematoden.

Die im Fokus des Projektes stehenden Vogel-Schistosomatiden sind vor allem durch die von ihren Zerkarien verursachten Dermatitis-Symptome („Badedermatitis“, „Zerkariendermatitis“) und die medizinischen Folgen wie Juckreiz und mögliche Sekundärinfektionen von medizinischer Relevanz. Die Infektionslarven treten in naturnahen Gewässern auf, wo die entsprechenden Schnecken-Zwischenwirte und Vögel-Endwirte vorkommen. Der Mensch und andere Säugetiere sind hier Fehlwirte, weil sich die Larven in ihnen nicht weiter entwickeln können (Auer & Aspöck 2002; Sattmann et al. 2006). Aufgrund der Symptomatik der verursachten Hautausschläge kann das Auftreten der Zerkarien zur Schließung von naturnahen Badeanlagen führen. Darüber hinaus können sie Behinderungen für gewisse Berufsgruppen (z.B. Fischer, Biologen) darstellen. Damit ist neben der medizinischen auch eine gewisse ökonomische Relevanz gegeben.

Die im Jahr 2019 im Auftrag der Abteilung Wasserwirtschaft des Landes Oberösterreich von Mitarbeitern des Naturhistorischen Museums Wien (NHMW) durchgeführte Pilotstudie („Pilotstudie

zum Nachweis von Zerkarien-Dermatitis-Erregern in OÖ Badeseen mittels DNA-Barcoding“) diene dem Ziel, Grundlagen für den genetischen Nachweis von Zerkariendermatitis-Erregern mittels eines DNA-Barcoding-Ansatzes zu erarbeiten. Dazu zählte der Aufbau einer Referenzdatenbank mit DNA-Barcodes von in Oberösterreich vorkommenden Trematoden und ihrer Zwischenwirte (Süßwassermollusken) sowie das Erarbeiten der Grundlagen zum Nachweis von in Österreich vorkommenden Dermatitis-Erregern der Gattung *Trichobilharzia* (und allenfalls anderer Schistosomatidae) und ihrer Zwischenwirte aus Umwelt-DNA (“environmental DNA“, “eDNA“).



Abb. 2: Verschiedene, im Laufe des Projekts nachgewiesene Zerkarien: (A) Xiphidiocercarie aus *Lymnaea stagnalis*, (B) *Trichobilharzia szidati* aus *Lymnaea stagnalis*, (C) *Trichobilharzia szidati* aus *Lymnaea stagnalis*, (D) Xiphidiocercarie aus *Lymnaea stagnalis*, (E) Echinostomatidae aus *Radix auricularia*. © NHMW

DNA-Barcoding ist eine Methode, die dazu dient, Organismen anhand eines standardisierten Abschnitts ihres Erbguts (der DNA) zu bestimmen. Als eine Art „Bestimmungsbuch“ dient dabei eine Referenzdatenbank, in der diese DNA-Abschnitte, sogenannte DNA-Barcodes, von zuverlässig bestimmten Organismen gespeichert sind. Die Belege der Referenzorganismen sind in öffentlich zugänglichen wissenschaftlichen Sammlungen hinterlegt. Die in öffentlichen Datenbanken verfügbaren DNA-Barcodes erlauben die Bestimmung von Arten aus einer Vielfalt an Proben. Für Biomonitoring wird DNA-Barcoding zum Einzelnachweis von Arten eingesetzt oder, als DNA-Metabarcoding, für die Analyse der Artenzusammensetzung von Mischproben.

In der Pilotstudie im Jahr 2019 wurden von 125 der insgesamt 836 gesammelten Wassermollusken in Schlüpfversuchen Zerkarien entlassen (Duda et al. 2019). Darunter waren auch Trichobilharzien. Eine Art aus *Radix auricularia* wurde als *Trichobilharzia franki* bestimmt und stellte einen Neunachweis für Österreich dar (Reier et al. 2020). Eine zweite Art aus *Lymnaea stagnalis* konnte nicht sicher zugeordnet werden, ist aber vermutlich *T. szidati*. Die DNA-Sequenzen der bearbeiteten Zerkarien wurden im Projektbericht 2019 in einem phylogenetischen Baum dargestellt, der 12 Clades enthielt. Zusätzlich wurde die Referenzdatenbank für österreichische Mollusken um die DNA-Barcodes von acht Schnecken- und einer Muschelart erweitert. Die Grundlagen für einen eDNA-Ansatz zum Nachweis von in Österreich vorkommenden Arten der Gattung *Trichobilharzia* und ihrer Schnecken-Zwischenwirte wurden erarbeitet.

Für die Abschätzung, ob Hautausschläge auf Zerkarien in Badegewässern oder andere Ursachen zurückzuführen sind, wäre ein funktionierender eDNA-Ansatz von besonderer Bedeutung. Die vorliegende Studie schließt an die Pilotstudie im Jahr 2019 an. Im Folgeprojekt 2020 sollte daher vor allem die Sensitivität der DNA-Barcoding-Methode aus Umwelt-DNA (eDNA) beurteilt werden. Die Ergebnisse der Studie sollten eine Evaluierung zulassen, inwieweit sich der eDNA-Ansatz für ein Entwarnsystem bei Badedermatitis eignen könnte.

1.2. Umwelt-DNA – „Environmental DNA“ (eDNA) und eDNA-Barcoding

Alle Organismen geben über Hautzellen, Schleimzellen und Darmzellen DNA an ihre Umwelt ab, auch nach dem Tod des Organismus gelangt dessen DNA in die Umwelt. Diese DNA wird als Umwelt-DNA oder auch eDNA (für environmental DNA) bezeichnet und kann über genetische Methoden wie DNA-Barcoding nachgewiesen und analysiert werden (Pawlowski et al. 2020). Sie kann intrazellulär oder extrazellulär vorliegen, letztere kann frei in der Umwelt vorliegen oder mehr oder weniger stark an Partikeln gebunden sein.

Im Unterschied zum klassischen Monitoring, bei dem für einen Nachweis von Organismen eine direkte Beobachtung und/oder Besammlung notwendig ist, dienen beim eDNA-Ansatz Umweltproben als Grundlage für Nachweise. Ein Monitoring mittels Umwelt/Wasserprobe hätte im Falle der Dermatitis-erzeugenden Zerkarien mehrere Vorteile. Der direkte Nachweis der Erreger ist aufgrund ihrer Kleinheit und Fragilität schwierig. Der Nachweis aus den Zwischenwirten erfordert in der Regel das Absammeln einer großen Stückzahl von Schnecken. Viele Süßwassermollusken-Arten sind allerdings gefährdet (und naturschutzrechtlich unter Schutz) und daher sind Eingriffe in die Populationen nicht wünschenswert.

Wasserproben bieten gegenüber anderen Umweltproben gewisse methodische Vorteile, sind aber auch mit bestimmten Schwierigkeiten verbunden, die es zu bedenken gilt. Anders als in terrestrischen Systemen, wo die DNA in erster Linie lokal nachweisbar bleibt, verteilt sich die DNA (bzw. die Zellen) in Wasser und ist damit – allerdings verdünnt – in einem größeren Teil des Wasserkörpers nachweisbar.

Ein zweiter Unterschied zu terrestrischen Systemen wird durch den schnelleren Abbau von DNA in aquatischen Systemen bedingt. Die Geschwindigkeit des Abbaus kann dabei stark variieren und ist abhängig von Faktoren wie Wassertemperatur, pH, UV-Exponierung, Ionen, aber auch organische Aktivität durch Makro- und Mikroorganismen (Jo et al. 2020; Strickler et al. 2015; Troth et al. 2021; van Bachove et al. 2020). Zusätzlich ist extrazelluläre eDNA im Allgemeinen kurzlebiger als intrazelluläre eDNA – auch zwischen freier eDNA und partikelgebundener eDNA gibt es Unterschiede in der Geschwindigkeit des Abbaus (Taberlet et al. 2018).

Während in Fließgewässern der Transport von eDNA eine starke Rolle spielt (Ort des Nachweises kann dadurch weit vom Ort, an dem diese Organismen leben, entfernt sein), spielt dieser in Stillgewässern eine geringere Rolle – Faktoren wie Windrichtung und Strömungen, aber auch Schichtung, können aber auch hier beeinflussend wirken (Harrison et al. 2019).

2. Ziele der Studie

Für das Jahr 2020 waren Untersuchungen an ausgewählten oberösterreichischen Gewässern sowie Laborversuche geplant, um folgenden Fragen nachzugehen bzw. folgende Ziele zu erreichen: Im Zentrum stand das Etablieren von artspezifischen PCR-Primern für Analysen an Umwelt-DNA (eDNA) sowie das Testen der Methode an eDNA-Proben, vor allem auch an eDNA-Proben mit gesichertem Nachweis von Zerkarien. Ein zweiter Aspekt zielte auf die Haltbarkeit von Zerkarien-DNA im Wasser hin. Im Rahmen von Experimenten im Labor (Wasser aus Aquarium) sollte getestet

werden, wie lange die DNA im Wasser nachweisbar ist. Schließlich sollte der Zusammenhang zwischen Wassertemperatur und dem Schlüpfen von Zerkarien getestet werden.

Dazu sollte (1) eine Optimierung der artspezifischen PCR-Primer für den eDNA-Nachweis von *Trichobilharzia*-Arten (*T. franki*, *T. regenti*, *T. szidati*) durchgeführt und (2) ein Testen des eDNA-Ansatzes anhand einer größeren Anzahl von Proben vorgenommen werden. Dies sollte mit künstlich hergestellten Proben (d.h., Positivkontrollen: Aquarium-Wasser, Verdünnungsreihen von Zerkarien-DNA) sowie auch mit im Freiland gewonnenen eDNA-Proben durchgeführt werden. Auch das Aufarbeiten vorhandener eDNA-Proben aus dem Pilotprojekt war vorgesehen. (3) Ein weiterer Aspekt – die präferierte Schlüpftemperatur für *Trichobilharzia*-Zerkarien – sollte in Laborexperimenten untersucht werden.

Zusätzlich sollten DNA-Barcodes von weiteren Trematoden-Arten, die im Zuge des Projekts gefunden wurden, generiert werden, bzw. standen allgemeine Fragen, die auch im Pilotprojekt behandelt wurden, um den Kenntnisstand über parasitische Würmer und ihrer Wirtsarten in Oberösterreich zu verbessern, weiterhin im Blickpunkt des Projekts:

- Welche Zerkarien kommen in den Untersuchungsgebieten in den untersuchten Mollusken/Schnecken vor?
- Welche der detektierten Arten kommen als Erreger der Badedermatitis in Frage?
- Welche anderen Arten kommen als Pathogene von Menschen/Haustieren in Frage?
- In welchen Schneckenarten entwickeln sich welche Zerkarien?

3. Methoden und Arbeitsplan

3.1. Modifikationen bedingt durch Umstände aufgrund der COVID-Pandemie

Der Plan, bei Auftreten eines Badedermatitis-Falles eine intensive Beprobung im Freiland durchzuführen, musste abgeändert werden, da uns bis Mitte September 2020 keine Badedermatitis-Meldungen aus Oberösterreich (bzw. auch nicht von anderen Regionen) bekannt wurden. Dadurch konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen Erfolg des eDNA-Nachweises und dem Ort bzw. Zeitpunkt der Beprobung und der Badedermatitis-Meldung erst ab Ende September mit Proben aus dem Pleschinger See untersucht werden. Als alternativer Standort wurde ein Weiher bei Rekawinkel (Gemeinde Pressbaum, NÖ) gewählt, in dem im August 2020 das Vorkommen von *Trichobilharzia* durch Schlüpfversuche nachgewiesen wurde.

Der in der Projektplanung vorgeschlagene Alternativplan, ein Gewässer, das von Privaten zur Verfügung gestellt wird und keine Schnecken enthält, als Experimentier-Gewässer zu verwenden (und zeitweilig mit infizierten Schnecken in einem Schwimmkäfig zu bestücken), wurde aufgegeben, da das Eingehen eines gewissen Risikos einer Weiterübertragung der Zerkarien aus diesem Gewässer nicht gerechtfertigt und rechtlich bedenklich erschien. In der Folge wurden die Schlüpfversuche sowie die eDNA-Versuche mit Wasser aus Aquarien mit Schnecken aus dem Gewässer in Rekawinkel (NÖ) durchgeführt.

Dank guter Kontakte zum Department für Parasitologie der Karls-Universität in Prag konnte das Projekt um eine transnationale Kooperation mit Jana Bulantová und Zuzana Pokrupová erweitert werden. Diese Kooperation ermöglichte durch die Bereitstellung von Material aus dem dortigen Labor die Erstellung von DNA-Barcodes von vier *Trichobilharzia*-Arten sowie weiterer Trematoden-Arten aus der Tschechischen Republik. Am Department für Parasitologie in Prag werden seit längerer Zeit Zerkarien-Freiland-Screenings und Infektionsversuche mit Zerkarien durchgeführt sowie Lebenszyklen von mehreren *Trichobilharzia*-Arten im Labor aufrechterhalten. Das vorhandene Laborequipment ermöglicht perfekte Bedingungen für Untersuchungen zur präferierten Schlüpftemperatur von *Trichobilharzia*-Arten.

3.2. Freilandarbeit – Sammeln - Bestimmen

In ausgewählten (oberösterreichischen und niederösterreichischen) Gewässern wurden Süßwassermollusken gesammelt und mittels konventioneller Methoden auf Zerkarien untersucht (Schlüpfversuche und Sezieren der Schnecken).

Insgesamt fanden 2020 neun Exkursionen statt, die von den Teams aus Wien und Oberösterreich durchgeführt wurden (Appendix 1), aufgrund der durch die COVID-19-Pandemie verursachten Umstände konnte jedoch nur eine gemeinsame Exkursion organisiert werden. Material, das vom oberösterreichischen Team gesammelt wurde, wurde dort entweder selbst untersucht oder zur Untersuchung an das NHM übermittelt.

Die Schlüpfversuche wurden einerseits am NHM, andererseits von der Abteilung für Oberflächengewässerwirtschaft am Land der oberösterreichischen Landesregierung durchgeführt. Die Schnecken wurden vereinzelt in Gläser gesetzt und am Fensterbrett aufgestellt, da Licht das Entlassen der Zerkarien anregt. Entlassene Zerkarien wurden in 80 % Ethanol fixiert, ebenso die befallenen Schnecken für etwaige folgende Sektionen.

Für die morphologische Bestimmung wurden isolierte und fixierte Zerkarien (aus Schlüpfversuchen und Sektionen) in ein Glycerin-Ethanol-Gemisch (50:50) überführt. Nach dem Verdunsten des Ethanols wurden Zerkarien in einem Tropfen puren Glycerins auf einem Objektträger platziert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Einbettung in Glycerin hellt die Gewebe auf und macht innere Organe besser sichtbar. Die Präparate wurden unter einem Durchlichtmikroskop morphologisch untersucht und es wurden Mikrofotografien erstellt. Die Präparate wurden in Form von Dauerpräparaten in die Sammlung des NHMW überführt.

Die Zerkarien wurden, soweit möglich, morphologisch mit Hilfe von Vermessungen unter dem Mikroskop zugeordnet, wobei auf detaillierte Lebendbeobachtung aus organisatorischen und zeitlichen Gründen verzichtet wurde, ebenso wie auf aufwändige mikroskopische Präparationsmethoden. DNA-Barcodes wurden herangezogen, um im Vergleich mit publizierten DNA-Sequenzen (so diese verfügbar waren) die Bestimmung zu bestätigen bzw. zu verfeinern.

3.3. eDNA-Versuche – Probennahme

Wasserproben aus den Gewässern im Freiland wurden an mehreren Stellen in unterschiedlicher Entfernung von der Fundstelle der gesammelten Schnecke/n entnommen.

Um der Frage nachzugehen, wie lange nach dem Schlüpfen von Zerkarien (und nach dem Absterben der Zerkarien) diese noch über eDNA nachweisbar sind, wurden im Labor Wasserproben aus dem Aquarium genommen, und zwar nach dem Schlüpfen der Zerkarien sowie nach dem Entfernen der Wirtsschnecke. Diese Beprobung des Aquarium-Wassers (Zimmertemperatur, im

Mittel 23 °C) wurden im Zeitraum 24. August 2020 – 07. Oktober 2020 vierzehn Mal wiederholt.

Dabei wurde, bis auf zwei

Kontrollen (eDNA-21 und eDNA-23), das Wasser im Aquarium umgerührt, um Wasserbewegung zu simulieren.

Für die eDNA-Probennahme wurde Wasser (0,06 – 1,2 Liter) durch 45 µl Sterivex™ Filter gepresst (Abb. 3), gekühlt transportiert und so rasch wie möglich bei –80 °C gelagert. Das Volumen des durch die Filter pressbaren Wassers variiert stark und hängt von der Menge an Schwebstoffen im beprobten Wasser ab.

Zusätzlich wurden sieben eDNA-Proben aus dem Jahr 2019 analysiert. Zwei davon schlugen fehl, da die Verschlusschrauben des Sterivex™ Filters innerhalb des Gewindes zerbrachen, wodurch der Filter nicht für die DNA-Extraktion eingesetzt werden konnte.



Abb. 3: eDNA-Probennahme: Wasser wird mittels Spritze durch einen Filter gepresst. © H. Sattmann

3.4. DNA-Analyse – DNA-Barcodes und Sequenzvergleiche

Präparierte Zerkarien (aus seziierten Schnecken und Schlüpfversuchen) wurden morphologisch untersucht und, soweit möglich, taxonomisch zugeordnet. Erstmals im Probenmaterial auftretende Arten wurden mittels DNA-Barcodes erfasst (1-3 Individuen). Zusätzlich wurde aus dem Material von der Karls-Universität Prag DNA isoliert, um DNA-Barcodes zu erstellen.

Für die DNA-Analyse wurde aus Zerkarien die DNA extrahiert. Dafür wurde der QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, der für sehr kleine Gewebeproben optimiert ist. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden ausgewählte Genabschnitte vervielfältigt (amplifiziert) und anschließend bei Microsynth Austria sequenziert (Sanger-Sequenzierung). Folgende Gene wurden untersucht: (1) das mitochondriale *Cytochrome-c-Oxidase* Untereinheit 1-Gen (*COI*), (2) das im Kern codierte *18S* rRNA-Gen (*18S*).

Das *COI*-Gen, das am häufigsten verwendete DNA-Barcoding-Gen, wurde routinemäßig in allen Proben untersucht. Alle Trematoden wurden mittels PCR mit dem bereits verfügbaren, universell (d.h., in vielen Trematoden) bindenden Primerpaar *Schisto-COI-5-Fw* + *Schisto-COI-3-Rv* getestet, welches ein Fragment von ungefähr 1200 bp Länge liefert. Dieser Abschnitt des *COI*-Gens ist wesentlich länger als der üblicherweise als DNA-Barcode eingesetzte Abschnitt (die ca. 650 bp lange, sogenannte „Folmer-Region“). In der Vergangenheit wurde für Schistosomatidae ein ähnliches Stück des *COI*-Gens publiziert. Da allerdings in anderen Gruppen der Trematoden verschiedene (und verschieden lange) Abschnitte dieses *COI*-Gens publiziert wurden (die zum Teil nicht mit der Folmer-Region überlappen), bietet der von uns gewählte lange Abschnitt eine wesentlich bessere Basis zum Vergleich mit den diversen in den Datenbanken verfügbaren *COI*-Sequenzen. Zusätzlich wurde in diesem Projektjahr für in Mitteleuropa zu erwartenden *Trichobilharzia*-Arten ein Primerset aus 12 verschiedenen Primern entwickelt. Diese Primer sollen spezifischer und verlässlicher in *Trichobilharzia* binden und (durch das Amplifizieren von mehreren kurzen Fragmenten) die Ermittlung der *COI*-Sequenz auch aus Proben mit geringerer DNA-Qualität erlauben. Durch Kombination mehrerer Primer ist es möglich, die gesamte *COI*-Markersequenz mit (bis zu) vier überlappenden Teilfragmenten in der PCR zur vervielfältigen und anschließend zu sequenzieren. Die mit diesen Primern amplifizierbaren Fragmente sind zwischen 170 und 1300 bp lang (Abb. 4). Getestet wurden sie primär an *Trichobilharzia franki*, *T. szidati*, *T. regenti* und *T. filiformis*. Die PCR-Produkte wurden von beiden Seiten mit den PCR-Primern sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden anhand der Elektropherogramme kontrolliert, editiert und mittels Sequenzvergleich einer Plausibilitätskontrolle unterworfen (Alignments und BLAST-Suche in der internationalen Referenzdatenbank der Barcodinginitiativen BOLD <https://v4.boldsystems.org/> und der NCBI-Gendatenbank GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

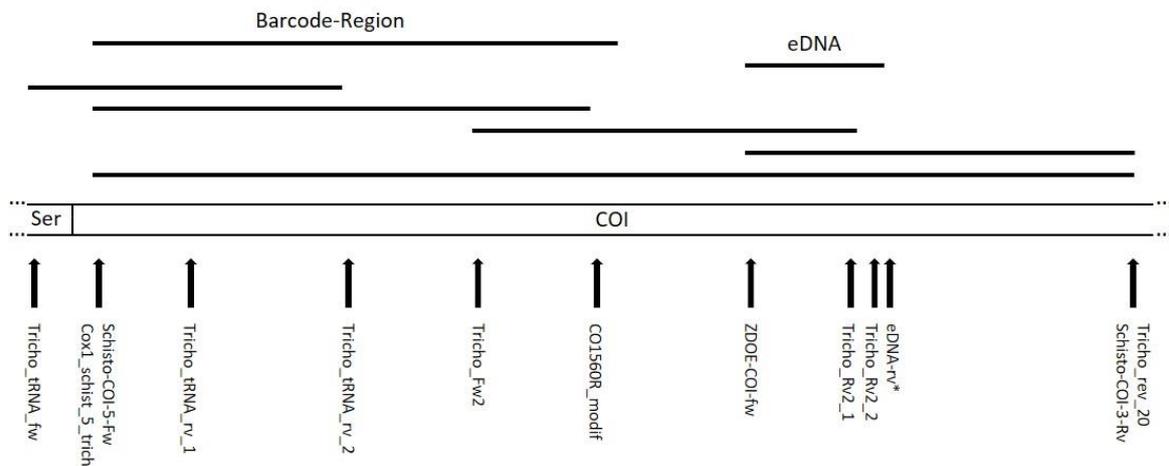


Abb. 4: Positionen der für die Amplifikation der *COI*-Sequenz verwendeten PCR-Primer. Die Pfeile markieren die Position der Primer (ein Primerpaar flankiert dabei jeweils die amplifizierte Gensequenz). Die genauen Positionen der Primer in der Referenzsequenz von *Trichobilharzia szidati* (NCBI: MG570047.1) sind in Tabelle 2 aufgelistet. Gene: Ser = *tRNA-Serin*-Gen; *COI* = *Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1* Gen. Die beiden obersten Linien entsprechen der Barcode-Region (Folmer-Region) sowie dem verwendeten eDNA-Abschnitt. Die fünf anderen Linien repräsentieren die im Projekt am häufigsten generierten Teil-Fragmente.

Das *18S*-Gen ist nicht als DNA-Barcode einsetzbar (meist zu wenig variabel, um Arten zu unterscheiden; *Trichobilharzia*-Arten sind z.B. in diesem Gen fast identisch), wurde aber zum generellen Nachweis von Trematoden in eDNA-Proben verwendet. In den Proben, in welchen mit den artspezifischen-*COI*-Primern (siehe unten, 3.5) zum Nachweis von *Trichobilharzia*-Arten keine PCR-Produkte amplifiziert werden konnten, sollte auf das Vorhandensein von amplifizierbarer Trematoden-DNA getestet werden. Dies diente dem Zweck, ein etwaiges Vorhandensein von Trematoden anderer taxonomischer Gruppen in den eDNA-Proben zu detektieren. Zusätzlich wurde das *18S*-Gen verwendet, um nicht identifizierbare Zerkarien (morphologisch oder weil verwendete *COI*-Primer nicht banden) auf höherer taxonomischer Ebene zuordnen zu können. Man geht davon aus, dass die universellen Primer für das *18S*-Gen in allen Trematoden binden.

3.5. Etablierung der eDNA-PCR-Primer

Für *T. franki*, *T. szidati* und *T. regenti* wurden spezifische eDNA-Primer entwickelt, um kurze *COI*-Fragmente aus diesen Arten zu amplifizieren. Für jede Art besteht das Primerpaar aus *ZDOE-COI-fw* als forward-Primer und dem artspezifischen revers orientierten eDNA-Primer (*eDNA-franki-rv*, *eDNA-szidati-rv*, *eDNA-regenti-rv*) (Tab. 2). Diese neu entwickelten Primerpaare liefern ein 142 bp langes PCR-Produkt, das außerhalb des etablierten *COI*-Barcoding-Fragments (Folmer-Region) liegt. Dieser

Abschnitt wurde gewählt, da hier die Variation groß genug ist, um artspezifische Primer zu konstruieren, mit welchen DNA jeweils einer der *Trichobilharzia*-Arten amplifiziert wird, während aus den anderen beiden Arten kein PCR-Produkt erhalten wird. Die artspezifischen eDNA-Primer wurden jeweils mit allen drei *Trichobilharzia*-Arten getestet, um sicherzustellen, dass sie jeweils nur mit der Ziel-Art ein PCR-Produkt liefern und die anderen beiden ausschließen. Bei der Etablierung der eDNA-Primer wurden die Primer nicht nur in PCR-Kreuztests mit jeder der verfügbaren *Trichobilharzia*-Arten sondern auch mit anderen Trematoden-Arten getestet.

3.6. DNA-Analyse – Nachweis von Trematoden-DNA in eDNA-Proben

Für die eDNA-Analyse wurden die gesammelten Filter-Proben mit einem auf Sterivex™ Filter spezialisierten Kit extrahiert. Die damit gewonnen DNA-Extrakte wurden mit Hilfe der artspezifischen eDNA-Primerpaare für *Trichobilharzia* und auch mit den universellen 18S-Primern untersucht. Mit der DNA jeder Gewässer-Probe wurde jeweils 3-mal mit jedem der artspezifischen *Trichobilharzia* Primerpaare eine PCR durchgeführt. Die 3-malige Wiederholung ist nötig, da es in PCR-Reaktionen von eDNA-Proben zu falsch-negativ Befunden kommen kann, wenn die Menge an vorhandener DNA sehr gering ist. In dem Fall, dass alle drei Durchläufe negativ waren, wurden (von den meisten Gewässerproben) die eDNA-Extrakte auch mit den 18S-Primern untersucht, um mögliche Hinweise auf andere vorhandene Trematoden-Arten zu finden.

Bei eDNA-Proben aus dem Aquarium wurden ebenfalls mehrere (3-6) PCR-Durchläufe gemacht, um falsch-negative Ergebnisse möglichst zu erkennen. Mit allen Extrakten wurden PCR-Reaktionen mit den für *T. szidati* spezifischen Primerpaar (*ZDOE-COI-fw* + *eDNA-szidati-rv*) durchgeführt, da dies die Art war, die von der Wirtsschnecke entlassen wurde. Zusätzlich wurde jedes Extrakt jeweils einmal mit den artspezifischen eDNA-Primern der anderen beiden *Trichobilharzia*-Arten getestet.

3.7. Zerkarien-Schlüpfversuche

Ein Test zu Temperaturpräferenzen wurde im Labor der Universität Prag durchgeführt. Dazu wurden am 9. Juni 2020 hundert Individuen der Schnecke *Radix lagotis* mit je einer Mirazidie von *T. regenti* infiziert. Am 14. August 2020 wurde mit den temperaturabhängigen Zerkarien-Schlüpfversuchen begonnen. Für jede Temperatur (10, 15, 20, 25°C) wurden 20 Schnecken verwendet. Die Schnecken wurden in Gläser vereinzelt und für eine Stunde - beleuchtet mit zwei Lampen - im Thermostat (siehe Abb. 5) bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Danach wurden die Schnecken entnommen und die Zerkarien in einer Petrischale unter dem Stereomikroskop gezählt. Ein zweiter Versuch mit am 30. November 2020 infizierten Schnecken wurde am 29. Jänner 2021 begonnen. Es konnten je 8 Schnecken von *R. lagotis* bei 5°C, 15°C bzw. 25°C inkubiert werden.

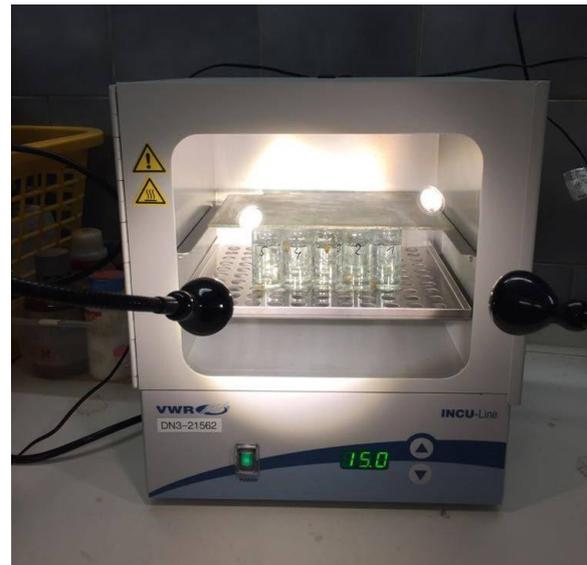


Abb. 5: Thermostat für Temperaturversuche

Ein zusätzlich in Wien durchgeführter Versuch sollte der Frage nachgehen, wie lange eine mit *T. szidati* infizierte adulte *Lymnaea stagnalis* (aus Rekawinkel, NÖ) Zerkarien ausscheidet. Diese war am 20. August 2020 gesammelt und ins Labor gebracht worden und wurde für die Versuche im Aquarium gehalten. Am 2. und 16. September und am 6. Oktober 2020 wurde das Tier in einem Glas in 250 ml Leitungswasser bei 22°C für 12 Stunden bei Tageslicht inkubiert, um die Ausscheidung von Zerkarien zu überprüfen.

3.8. Test auf Sensitivität des PCR-Nachweises

Das Aquariumwasser der oben erwähnten, mit *T. szidati* infizierten, adulten *Lymnaea stagnalis* (aus Rekawinkel, NÖ) wurde auch herangezogen, um der Frage nachzugehen, wie lange nach dem Schlüpfen von Zerkarien (und nach dem Absterben der Zerkarien) diese noch über eDNA nachweisbar sind (siehe Punkt 3.3). Für einen weiteren Versuch, in dem die kleinste nachweisbare Menge an DNA in einer Wasserprobe festgestellt werden sollte, wurden Verdünnungsreihen von DNA-Lösungen, deren Konzentration mittels Qubit Fluorometer (Invitrogen) gemessen wurde, hergestellt. Dazu

wurde (1) ein PCR-Produkt (*ZDOE-CO1-Fw + eDNA-szidati-rv/eDNA-franki-rv*, 142 bp Länge) von zwei Individuen hergestellt: eine Probe von *T. szidati* (Ls17-15-003-Ts, 7,98 ng/μl) und eine Probe von *T. franki* (Ra13-16-002-Tf, 8,93 ng/μl). (2) Weiters wurde genomische DNA von diesen zwei Individuen verwendet (Ls17-15-003-Ts, 0,0850 ng/μl; Ra13-16-002-Tf, 0,0830 ng/μl). Die Verdünnungsreihen bestanden aus 6 Verdünnungsschritten ($1/10 - 10^{-6}$). Von diesen insgesamt 7 DNA-Lösungen wurden jeweils 1 μl in der PCR (*ZDOE-CO1-Fw + eDNA-szidati-rv/eDNA-franki-rv*) eingesetzt. Die PCR mit genomischer DNA (jeweils 7 Reaktionen) wurde 1x mit 30 Wiederholungen und 1x mit 40 Wiederholungen durchgeführt. Die PCR der Verdünnungsreihe des PCR-Produkts (Reamplifikation) wurde mit 30 PCR-Wiederholungen durchgeführt.

3.9. Stammbaumerstellung

Zur besseren Darstellung und zum Vergleich der 2019 und 2020 bearbeiteten Proben wurde abschließend ein phylogenetischer Baum (mittels Neighbour-Joining-Methode) auf Basis der *COI*-Sequenzen berechnet (Abb. 8). Auch wenn ein *COI*-Stammbaum die Verwandtschaftsverhältnisse der beprobten Zerkarien nur annäherungsweise darstellt, bietet er einen guten Überblick und erlaubt eine kritische Beurteilung und eine erste Überprüfung der morphologischen Bestimmungen. Für eine umfassende phylogenetische Analyse wären mehr Sequenzdaten notwendig. Auch ist die Auswahl der Arten, da beschränkt auf die im Rahmen des Projekts gefundenen Taxa, für eine umfassende Verwandtschaftsstudie unzureichend.

4. Ergebnisse

4.1. DNA-Analyse – DNA-Barcodes und Sequenzvergleich

2020 wurden bei insgesamt neun Exkursionen (Abb. 6, 7) an sechs verschiedenen Standorten 255 Wassermollusken (zehn Arten) gesammelt (Appendix 1) – die Gesamtanzahl bearbeiteter Standorte (2019 und 2020) erhöhte sich auf 23 (Tab. 1). Aus 33 der gesammelten Individuen schlüpfen Zerkarien während der Schlüpfversuche. Insgesamt wurden 78 Zerkarien bearbeitet, die teilweise aus den eigenen Schlüpfversuchen (21 aus Oberösterreich, 4 aus Niederösterreich, 8 aus Wien) stammten, teilweise aus der Sammlung der Universität Prag (33) sowie des NHM Wien (12). Daraus konnte aus 32 Individuen eine *COI*-Sequenz und aus 21 eine *18S*-Sequenz erhalten werden. Von den erstellten *COI*-Sequenzen (Appendix 2) sind 21 vollständig und haben Barcode-Qualität (d.h.

ausreichende Abdeckung der Folmer-Region, die für standardisierte DNA-Barcodes verwendet wird). Elf Sequenzen waren in zum Teil unvollständig (wahrscheinlich teilweise aufgrund des Alters des Materials bzw. fehlender passender Primer). Bei einigen fehlte ein kurzes Stück in der Mitte, bei anderen konnte aufgrund schlecht lesbarer Sequenz am 5'-Ende keine Barcode-Qualität erreicht werden. Die unvollständigen *COI*-Sequenzen waren allerdings alle lang genug, um sie taxonomisch und phylogenetisch analysieren zu können. Die *18S*-Sequenzen wurden bei jenen beprobten Zerkarien erstellt, bei welchen mit den etablierten *COI*-Primern keine Ergebnisse erzielt wurden. Die geringe Variabilität des *18S*-Gens erlaubt zwar eine Zuordnung der DNA-Sequenzen auf höheren taxonomischen Ebenen, eine eindeutige Artbestimmung ist jedoch nur in Einzelfällen möglich. *COI* Sequenzen sind zwar generell besser für Artunterscheidung geeignet, eine Artbestimmung ist wegen mangelnder Artabdeckung aber zurzeit dennoch erst selten möglich. Fehlbestimmungen von GenBank-Einträgen erschweren die Interpretation zusätzlich. Daher wurden alle von uns über Sequenzvergleich vorgenommenen taxonomischen Zuordnungen mit großer Vorsicht durchgeführt.

Tab. 1: Übersicht der Standorte der Exkursionen/ Beprobungen/ Probennahmen von 2019 und 2020, die für die Bearbeitung der Zerkarien verwendet wurden.

Standort- Nummer	Standort	Koordinaten N/E
1	AT, NÖ, Rohrau, Unter kleinem Fischteich	48° 04' 04,47" / 16° 52' 02,85"
2	AT, NÖ, Fischamend, Donau	48° 07' 11,79" / 16° 40' 32,57"
3	AT, OÖ, Traun, Oedter See	48° 12' 41,04" / 14° 13' 17,82"
4	AT, OÖ, Unterer Inn, Reichersberger Au	48° 20' 20,71" / 13° 21' 35,47"
5	AT, NÖ, Orth, Kanal	48° 07' 47,22" / 16° 41' 55,97"
6	AT, OÖ, Franking, Holzöster See	48° 03' 29,60" / 12° 54' 00,90"
7	AT, NÖ, Leitha, Teich Jetski 2	48° 01' 44,30" / 16° 49' 27,20"
8	AT, OÖ, Unterer Inn, Hagenauer Bucht	48° 16' 31,96" / 13° 05' 33,58"
9	AT, OÖ, Unterer Inn, Mühlheimer Lacke	48° 17' 31,50" / 13° 13' 14,90"
10	AT, OÖ, Luftenberg, Ausee	48° 14' 53,39" / 14° 24' 58,47"
11	AT, OÖ, Eggelsberg, Seeleithensee	48° 03' 33,19" / 12° 58' 01,56"
12	AT, NÖ, Leitha, Teich Jetski 1	48° 01' 44,27" / 16° 49' 32,03"
13	AT, NÖ, Rekawinkel, Seerosenteich	48° 11' 02,90" / 16° 01' 56,50"
14	AT, OÖ, Linz, Pichlinger See	48° 14' 22,62" / 14° 23' 00,05"
15	CZ, Prague, Charles University (Laborzucht)	50° 05' 19,00" / 14° 25' 17,00"
16	CZ, Jetřichovice, natürlicher Schwimmteich	50° 50' 38,50" / 14° 23' 43,00"
17	CZ, Pilsen, Velký Bolevecký	49° 46' 26,96" / 13° 23' 50,47"
18	CZ, Hradec Králové, Opatovický Písník	50° 09' 53,81" / 15° 47' 44,67"
19	CZ, Pilsen, Malý Bolevecký	49° 46' 32,77" / 13° 24' 15,39"
20	AT, NÖ, Niederfellabrunn, Löschteich	48° 27' 40,70" / 16° 18' 42,50"
21	AT, OÖ, Linz, Pleschinger See	48° 19' 10,00" / 14° 19' 56,80"
22	AT, Wien, Mauer, Pappelteich	48° 08' 43,90" / 16° 14' 49,50"
23	AT, NÖ, Wildungsmauer, Altarm Donau	48° 06' 58,68" / 16° 48' 51,12"



Abb. 6: Exkursion zur Hagenauer Bucht am 07.07.2020, Probenentnahmestelle. © C. Hörweg



Abb. 7: Exkursion zum Pleschinger See am 07.08.2020, Probenentnahmestelle.
© H. Blatterer

Die erstellten *COI*- und *18S*-Sequenzen konnten den Familien Schistosomatidae, Strigeidae, Diplostomidae, Echinostomatidae, Plagiorchiidae, Paramphistomidae und Cyathocotylidae zugeordnet werden. Einige konnten auch Arten eindeutig zugeordnet werden. Die jeweilige morphologische Bestimmung sowie die taxonomische Zuordnung anhand des Vergleichs der erstellten Sequenzen mit verfügbaren DNA-Sequenzen in Gendatenbanken sind in Appendix 2 ersichtlich.

In den Proben aus Oberösterreich konnten zwei Arten der Gattung *Trichobilharzia* (Schistosomatidae) molekulargenetisch nachgewiesen werden, *T. franki* (siehe Reier et al. 2020) und *T. physellae*. Das Vorkommen einer dritten Art darf aufgrund der Zerkarienmorphologie und des Zwischenwirtes vermutet werden: *T. szidati*. Diese wurde allerdings bereits mehrmals für Niederösterreich nachgewiesen (Gaub et al. 2020). Alle drei Arten sind Erreger der Badedermatitis. Auch andere bei den Screenings festgestellte Trematoden sind aus human- und veterinärmedizinischer Sicht von potenzieller Bedeutung. Trematoden der Familie Diplostomidae parasitieren Vögel. Sie benutzen Fische als 2. Zwischenwirte.

Trematoden der Familie Echinostomatidae sind Parasiten von Vögeln und Säugern, also veterinärparasitologisch evident etwa in der Geflügelhaltung. Speziell von den Gattungen *Echinostoma*, *Echinoparyphium* und *Isthmiophora* sind Arten auch als Parasiten des Menschen gemeldet worden.

Bemerkenswert war der Nachweis von Zerkarien der Gattung *Trichobilharzia* aus *Physella acuta* aus dem Pleschinger See, die der Art *T. physellae* zugeordnet werden konnten und einen weiteren Neunachweis einer potenziell Dermatitis-erregenden Art für Österreich darstellt.

Aus dem vom Labor der Karls-Universität Prag erhaltenen Referenzmaterial von *T. szidati*, *T. regenti*, *T. franki* und *T. filiformis* konnten mit dem etablierten Primerset mehrere komplette *COI*-Referenzsequenzen hergestellt werden (Appendix 2). Die *COI*-Sequenz von *T. filiformis* ist die erste für diese Spezies erstellte Sequenz. Diese Referenzsequenzen waren für die Konstruktion und das Testen der eDNA-Primer von essenzieller Bedeutung.

4.2. Etablierung der eDNA-PCR-Primer

Mit Hilfe von bereits verfügbaren mitochondrialen Genomen und Sequenzen sowie in unserem Labor sequenzierten *COI*-Sequenzen von Trichobilharzien konnten für *T. franki*, *T. szidati*, *T. regenti* spezifische eDNA-Primer designt werden. Diese neu entwickelten Primerpaare liefern ein 142 bp langes PCR-Produkt, das auch bei stark degradiertem DNA dieser Arten in eDNA-Proben aus Wasser

noch amplifizierbar sein sollte. Die mit den eDNA-Primerpaaren durchgeführten Kreuztests mit eigenem Material und aus dem Labor in Prag erhaltenem Material zeigten eine eindeutige Artspezifität. Es konnten keine PCR-Produkte aus den jeweiligen anderen Arten erhalten werden.

Tab. 2: Liste der verwendeten *COI* und *18S* PCR-Primer. Die Position entspricht der Lage der Primer auf Basis der *COI*-Sequenz von *Trichobilharzia szidati* (NCBI: MG570047.1). Fwd = Forward-Primer, Rev = Reverse-Primer; neu = diese Studie

Gen	Primer Name	Ausrichtung	Taxa	Position	Quelle
<i>COI</i>	Tricho_tRNA_fw	Fwd	<i>Trichobilharzia</i>	-53 - -36	neu (2020)
<i>COI</i>	Cox1_schist_5_trich	Fwd	<i>Trichobilharzia</i>	24 - 47	neu (2020)
<i>COI</i>	Schisto-COI-5-Fw	Fwd	Schistosomatidae / Trematoda	31 - 47	Lockyer et al. (2003)
<i>COI</i>	Tricho_tRNA_rv_1	Rev	<i>Trichobilharzia</i>	133 - 155	neu (2020)
<i>COI</i>	Tricho_tRNA_rv_2	Rev	<i>Trichobilharzia</i>	321 - 408	neu (2020)
<i>COI</i>	Tricho_Fw2	Fwd	<i>Trichobilharzia</i>	475 - 497	neu (2020)
<i>COI</i>	Tricho_Fw2_fili	Fwd	<i>Trichobilharzia</i>	475 - 497	neu (2020)
<i>COI</i>	CO1560R_modif	Rev	<i>Trichobilharzia</i>	616 - 635	neu (2020)
<i>COI</i>	ZDOE-COI-fw	Fwd	<i>Trichobilharzia</i> / eDNA	800 - 824	Duda et al. (2019)
<i>COI</i>	Tricho_Rv2_1	Rev	<i>Trichobilharzia</i>	919 - 940	neu (2020)
<i>COI</i>	Tricho_Rv2_2	Rev	<i>Trichobilharzia</i>	947 - 965	neu (2020)
<i>COI</i>	Tricho_Rv2_2_fili	Rev	<i>Trichobilharzia</i>	947 - 965	neu (2020)
<i>COI</i>	eDNA-franki-rv	Rev	<i>Trichobilharzia franki</i> / eDNA	966 - 985	Duda et al. (2019)
<i>COI</i>	eDNA-regenti-rv	Rev	<i>Trichobilharzia regenti</i> / eDNA	966 - 985	Duda et al. (2019)
<i>COI</i>	eDNA-szidati-rv	Rev	<i>Trichobilharzia szidati</i> / eDNA	966 - 985	Duda et al. (2019)
<i>COI</i>	Schisto-COI-3-Rv	Rev	Schistosomatidae / Trematoda	1255 - 1274	Lockyer et al. (2003)
<i>COI</i>	Tricho_rev_20	Rev	<i>Trichobilharzia</i>	1264 - 1285	neu (2020)
<i>18S</i>	Trem-18S-f	Fwd	Schistosomatidae / Trematoda		Hohensee et al. (2016)
<i>18S</i>	Trem-18S-r	Rev	Schistosomatidae / Trematoda		Hohensee et al. (2016)

4.3. eDNA-Versuche – Freiland

Im Jahr 2020 konnten aus Freiland-Gewässern 14 eDNA-Proben gewonnen werden, neun davon wurden direkt im Freiland genommen ("Gewässer-Proben" in Tab. 3), vier wurden im Labor von vor Ort gesammelten Wasserproben gewonnen ("Wasser-Probe" in Tab. 3) und eine stammte von Transportwasser ("Transportwasser-Probe") mit einer lebenden *Lymnaea stagnalis* (die später *T. szidati* Zerkarien entließ). Von sieben bereits 2019 gewonnenen eDNA-Proben konnten heuer fünf erfolgreich extrahiert werden (bei zwei Proben zerbrach der Filterverschluss). Von all diesen Gewässer-Proben lieferten zwei (eDNA-7, eDNA-9) mit den artspezifischen Primerpaaren einen eindeutigen Nachweis auf *T. szidati*. Diese stammten von einem einzigen Gewässer (Rekawinkel, NÖ).

Ebenso lieferte das Transportwasser aus diesem Gewässer ein positives Ergebnis für *T. szidati*. Die PCR-Versuche mit den für die anderen beiden *Trichobilharzia*-Arten spezifischen Primern waren in allen Proben negativ.

Tab. 3: Liste der im Jahr 2020 getesteten eDNA-Proben: im Freiland genommene Gewässer-Proben, Aquarium- und Transportwasser-Proben (aus dem Labor) sowie aus dem Freiland mitgenommene und im Labor beprobte Wasser-Proben. „Aquarium-Test-Proben“ bezeichnen jene Proben, die für die Versuche mit Aquarium-Wasser als Positivkontrollen verwendet wurden. Ind-ID = Labornummer der Probe (des Individuums); Die Spalte „Sammeldatum“ gibt für Aquarium-Proben das Datum der Probennahme an. Die Spalte „COI-Test *T. szidati*“ gibt an, wie oft der artspezifische eDNA-Primer für die betroffene Art ein positives PCR-Ergebnis erbrachten. Der 18S PCR-Nachweis diente dem unspezifischen Nachweis von Trematoden-DNA (hier besteht die Gefahr von falsch-positiven Tests (wie der Nachweis eines Collembolen, *Sminthurides aquaticus*, zeigte).

Ind-ID	Fundort	Fundort Code	Sammel-datum	Probentyp	COI-Test <i>T. szidati</i>	18S PCR-Nachweis
Oberösterreich						
1-A-4	Reichersberger Au	4	04.06.19	Aquarium-Probe	0/3	Echinostomatidae
3-W-14	Pichlinger See	14	19.07.19	Gewässer-Probe	0/3	Plagiorchiida
eDNA-30	Mühlheimer Lacke	9	01.08.19	fehlgeschlagen, Filter zerbrochen	-	-
eDNA-31	Seeleithensee	11	01.08.19	Gewässer-Probe	0/3	neg.
eDNA-32	Oedter See	3	07.08.19	fehlgeschlagen, Filter zerbrochen	-	-
4-W-8	Hagenauer Bucht	8	19.08.19	Gewässer-Probe	0/3	Echinostomatidae
eDNA-1	Hagenauer Bucht	8	07.07.20	Gewässer-Probe	0/3	<i>Sminthurides aquaticus</i> (Collembola)
eDNA-2	Hagenauer Bucht	8	07.07.20	Gewässer-Probe	0/3	<i>Sminthurides aquaticus</i> (Collembola)
eDNA-25	Pleschinger See	21	24.09.20	Gewässer-Probe	0/3	+
eDNA-26	Pleschinger See	21	16.10.20	Wasser-Probe Standort 1	0/3	neg.
eDNA-27	Pleschinger See	21	16.10.20	Wasser-Probe Standort 1	0/3	neg.
eDNA-28	Pleschinger See	21	16.10.20	Wasser-Probe Standort 2	0/3	neg.
eDNA-29	Pleschinger See	21	16.10.20	Wasser-Probe Standort 2	0/3	neg.
Niederösterreich						
eDNA-3	Niederfellabrunn	20	17.07.20	Gewässer-Probe	0/3	<i>Skrjabinopsolus nudidorsalis</i> Deropristidae
eDNA-4	Niederfellabrunn	20	17.07.20	Gewässer-Probe	0/3	<i>Skrjabinopsolus nudidorsalis</i> Deropristidae
2-W-13	Rekawinkel	13	09.07.19	Gewässer-Probe	0/3	Strigeidae (Mischsequenz)
eDNA-7	Rekawinkel	13	24.08.20	Gewässer-Probe	1/3	-
eDNA-8	Rekawinkel	13	24.08.20	Gewässer-Probe	0/6	-
eDNA-9	Rekawinkel	13	24.08.20	Gewässer-Probe	2/3	-
eDNA-10	Rekawinkel	13	24.08.20	Gewässer-Probe	0/6	-

eDNA-11	Rekawinkel	13	24.08.20	Transportwasser-Probe (mit <i>L. stagnalis</i>)	3/3	-
eDNA-5	Rekawinkel	13	24.08.20	Aquarium-Probe (mit <i>L. stagnalis</i>)	3/3	-
eDNA-6	Rekawinkel	13	24.08.20	Aquarium-Probe (mit <i>L. stagnalis</i>)	3/3	-
eDNA-12	Rekawinkel	13	25.08.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 1	3/3	-
eDNA-13	Rekawinkel	13	26.08.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 2	3/3	-
eDNA-14	Rekawinkel	13	27.08.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 3	3/3	-
eDNA-15	Rekawinkel	13	28.08.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 4	3/3	-
eDNA-16	Rekawinkel	13	29.08.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 5	3/3	-
eDNA-17	Rekawinkel	13	30.08.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 6	3/3	-
eDNA-18	Rekawinkel	13	31.08.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 7	3/3	-
eDNA-20	Rekawinkel	13	09.09.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 8	0/6	-
eDNA-21	Rekawinkel	13	10.09.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 9	0/6	-
eDNA-22	Rekawinkel	13	15.09.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 10	0/6	-
eDNA-23	Rekawinkel	13	15.09.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 11	0/6	-
eDNA-24	Rekawinkel	13	07.10.20	Aquarium-Test-Probe Nr. 12	1/6	-

Mit 14 Gewässer-Proben wurden zusätzlich Versuche mit den *18S*-Primern durchgeführt, um auf Vorhandensein von Trematoden-DNA zu testen. Sechs dieser Proben lieferten ein positives Ergebnis. Die so gewonnenen Sequenzen wurden mittels BLAST-Suche in GenBank und BOLD auf Ähnlichkeit mit dort vorhandenen Sequenzen geprüft. Die letzte Spalte in Tabelle 3 zeigt die tentative Zuordnung aufgrund dieser Sequenzvergleiche: Einige Zuordnungen konnten bis auf Artebene vorgenommen werden, während andere nur auf Gattungs- bzw. Familienebene möglich waren (siehe Diskussion). Weiters konnte die Sequenz einer der Proben aufgrund fehlender Daten in den öffentlichen Datenbanken nicht einmal auf Familienniveau bestimmt werden und wurde lediglich der Überordnung Plagiorchiida zugeordnet (Tab. 3). Außerdem wurde in einer der Proben *Sminthurides aquaticus* (eine Springschwanz-Art) nachgewiesen. Dies zeigt einen Nachteil der Verwendung von *18S*-Primern: Die Wahrscheinlichkeit Vertreter anderer taxonomischer Gruppen zu amplifizieren, ist durchaus gegeben. Alle anderen eDNA Proben lieferten keinen Nachweis auf Trematoden-eDNA.

4.4. eDNA-Versuche – Labor

Die zwischen 24. August und 7. Oktober 2020 entnommenen 14 eDNA-Proben aus Aquarium-Wasser, stammten aus dem Aquarium, in welchem ein Individuum von *Lymnaea stagnalis* von Fundort 13 Zerkarien von *T. szidati* entlassen hatte. Zwei dieser Proben (eDNA-5, eDNA-6 in Tab. 3 “Aquarium-Probe”) dienten in diesem Versuch als Positiv-Kontrollen, da zum Zeitpunkt der

Probennahme die Schnecke noch im Aquarium war. Für diese waren alle PCR-Reaktionen mit den Primern für *T. szidati* positiv, während die Primer für die anderen beiden Arten (erwartungsgemäß) keine PCR-Produkte lieferten.

Nach dem Entfernen der Wirtsschnecke wurden insgesamt 12 eDNA-Proben genommen (eDNA-12 – eDNA-24; “Aquarium-Test-Probe” in Tab. 3). Von diesen waren die sieben Proben aus der ersten Woche in allen drei Wiederholungen positiv (*T. szidati*). Von den danach gezogenen Proben war nur die letzte (vom 7.10.) in einer der drei PCR-Versuche positiv. Diese fünf Proben wurden weitere dreimal mit den *COI*-Primern für *T. szidati* getestet, keine dieser PCR-Reaktionen resultierte in PCR-Produkten. Alle Kontrollen mit den eDNA-Primern für die anderen *Trichobilharzia*-Arten waren negativ, was die hohe Spezifität der artspezifischen Primer bestätigt.

4.5. Schlüpfversuche

Der im Labor der Universität Prag durchgeführte Versuch zum Ausstoß von Zerkarien erbrachte keine eindeutigen Hinweise zur Temperaturpräferenz. Von den jeweils 20 Schnecken (*Radix lagotis*) schieden 6 Individuen bei 10°C Zerkarien von *T. regenti* aus, 3 bei 15°C, 7 bei 20°C und 6 bei 25°C. Die Anzahl der Zerkarien variierte bei 10°C von 7-370, bei 15°C von 17-60, bei 20°C von 3-148 und bei 25°C von 14-67 (Details dazu siehe Appendix 3 & 4).

Ein Grund für den fehlenden Nachweis einer Temperaturabhängigkeit des Schlupfs von Zerkarien könnte daran liegen, dass weniger die Temperatur, sondern vielmehr ein Lichtreiz der entscheidende Impuls für den Schlüpfvorgang ist. Möglicherweise waren jedoch auch die Abstände zwischen den Temperaturintervallen zu eng gewählt. Auch erwiesen sich im Endeffekt nicht alle Schnecken als infiziert, was auf die standardisierte Infektion mit nur einem Mirazidium zurückzuführen ist. Für weitere Versuche wurde geplant, die Versuche mit einer größeren Anzahl an Schnecken sowie größeren Abständen zwischen den gewählten Inkubationstemperaturen zu wiederholen. Leider standen auch beim zweiten Versuch nur insgesamt 24 Individuen zur Verfügung, bedingt durch eine höhere Mortalität der Schnecken im Winter. Von den jeweils 8 Schnecken (*R. lagotis*) schieden 3 Individuen bei 5°C Zerkarien von *T. regenti* aus, 0 bei 15°C, und 3 bei 25°C. Die Anzahl der Zerkarien variierte bei 5°C von 5-32, bei 15°C gab es keine Zerkarien, und bei 25°C von 44-98 (Details dazu siehe Appendix 5 & 6).

Die Versuche haben gezeigt, dass auch bei niedrigen Temperaturen Zerkarien ausgeschieden werden, wenn auch in deutlich geringerer Menge.

Im Zusammenhang mit der Schlüpftemperatur ist der sehr späte Fund (durch Hubert Blatterer) von *Trichobilharzia*-Zerkarien in *Physella acuta* im Pleschinger See vom 11. November interessant (Umgebungstemperatur 6°C, Wassertemperatur geschätzte 7-9°C). Der Schlupf der Zerkarien wurde zwar nach 3 Tagen im Labor (in nur in 1 von 30 Schnecken) bei Zimmertemperatur beobachtet, der Befund wirft jedoch die Fragen auf, ob (1) diese Zerkarien auch bei derartig niedrigen Temperaturen im Freiland noch aktiv schlüpfen können, und (2) ob sie in der Schnecke überwintern und im Frühjahr schlüpfen. Aus der einzigen, bei derselben Probennahme gesammelten *Radix auricularia* waren bei der Ankunft im Labor schon Zerkarien geschlüpft (gesammelt ca. 12:00 - mikroskopische Kontrolle um 17:30). Da dank des Transports der 2 Liter Standortwasser in einer Isolierbox kein nennenswerter Temperaturanstieg während des Transportes erfolgte, ist damit ein Schlupf bei niedrigen Temperaturen zumindest für diese Art belegt. Morphologisch konnten die Zerkarien als Echinostomatidae bestimmt werden, genetisch konnte mit keinem der Primerpaare ein Ergebnis erzielt werden. Ein Großteil der Zerkarien war bereits stark degradiert.

Bei den Schlüpfversuchen mit einer *Lymnaea stagnalis* (aus Rekawinkel, NÖ), die mit *T. szidati* infiziert war, zeigte sich, dass das Tier über sechs Wochen Zerkarien ausstieß. Das Überführen der Schnecke in ein Glas wurde durchgeführt, um den Zerkarien-Ausstoß zu beobachten, was im Aquarium nicht gut möglich war. Die Schnecke stieß jedes Mal beträchtliche Mengen von Zerkarien aus, die in 80 % EtOH fixiert wurden. Eine grobe Abschätzung der Zerkarienmenge wurde durch Zählungen an kleinen Volumina vorgenommen und hochgerechnet. Die so erhobenen Schätzwerte für in einem Zeitraum von 12 Stunden freigesetzte Zerkarien waren 14.000 (2.9.), 5000 (16.9.) und 900 (6.10.). Am 16. Oktober war das Tier verstorben.

4.6. Verdünnungsreihe

Die Ergebnisse der Verdünnungsreihen zeigen bei genomischer DNA in einer PCR mit 30 Zyklen, dass ein Nachweis noch bis zu einer Verdünnung von 10^{-2} positiv ist (errechnete minimal nachweisbare Konzentration von 0,85 pg/μl bei Ls17-15-003-Ts und 0,83 pg/μl bei Ra13-16-002-Tf). Bei der PCR mit 40 Zyklen konnte ein positiver Nachweis bis zu einer Verdünnung von 10^{-3} bestätigt werden (entspricht 0,085 pg/μl bei Ls17-15-003-Ts und 0,083 pg/μl bei Ra13-16-002-Tf). In der Reamplifikation (PCR mit 40 Zyklen) der PCR-Produktes, die aus den beiden verwendeten Proben generierte wurden, konnte ein Nachweis bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} , und damit in der

gesamten Verdünnungs-Reihe, erbracht werden (entspricht einer minimal nachweisbaren Konzentration von 0,008 pg/μl bei Ls17-15-003-Ts und von 0,009 pg/μl bei Ra13-16-002-Tf).

4.7. DNA-basierter Baum

Der Neighbour-Joining-Baum wurde mit den *COI*-Sequenzen aus den Projektjahren 2019 und 2020 erstellt. Die Sequenzen von Ls15-/-001-Ts, Ls15-/-002-Ts, Ls15-/-005-Ts, Gsp1-15-002-Tfil und Gsp1-15-004-Tfil wurden nicht für die Baumberechnung verwendet, da diese Sequenzen unvollständig waren (das mittlere DNA-Fragment konnte nicht sequenziert werden). Die Miteinbeziehung solcher unvollständiger Sequenzen könnte die Topologie des Baumes beeinflussen. Diese *COI*-Sequenzen sind jedoch, trotz etwas kürzerer Länge, eindeutig den jeweiligen Arten zuzuordnen (*T. szidati*, *T. physellae* bzw. *T. filiformis*; siehe Appendix 2). Pha2-21-002-Tph (November-Fund von *T. physellae*) ist noch nicht enthalten, weil eine ausreichend vollständige Sequenz bei Berichtlegung noch nicht zur Verfügung stand. Der bisher lesbare Bereich lässt jedoch eine eindeutige Zuordnung zu *T. physellae* zu. Die Sequenz ist mit den beiden vollständig vorhandenen Sequenzen von *T. physellae* aus dem Pleschinger See fast identisch.

Der Neighbour-Joining-Baum (Abb. 5) zeigt klare Artunterschiede innerhalb der Schistosomatidae. Alle fünf untersuchten Arten der Gattung *Trichobilharzia* (*T. filiformis*, *T. szidati*, *T. regenti*, *T. physellae*, *T. franki*) sind klar voneinander abgesetzt. Dies ist für die Artbestimmung mittels DNA-Barcoding essenziell.

Des Weiteren zeigt sich im Neighbour-Joining-Baum das genetische Auflösungsvermögen der *COI*-Sequenz in Trematoden, nicht nur für Arten, sondern auch für höhere taxonomische Ebenen. Eine klare Trennung zeigt sich zwischen Plagiorchiida und Diplostomida. Innerhalb der Diplostomida können die Schistosomatidae deutlich von Diplostomidae und Strigeidae abgegrenzt werden, wobei die Diplostomidae näher mit den Strigeidae clustern. Innerhalb der Plagiorchiida können dagegen die Echinostomatidae klar von Paramphistomidae und Plagiorchiidae unterschieden werden. Zwei kleinere Cluster innerhalb der Plagiorchiida konnten in unserer Studie noch keiner Familie eindeutig zugeordnet werden, da hier keine Vergleichssequenzen in den Genbanken existieren.

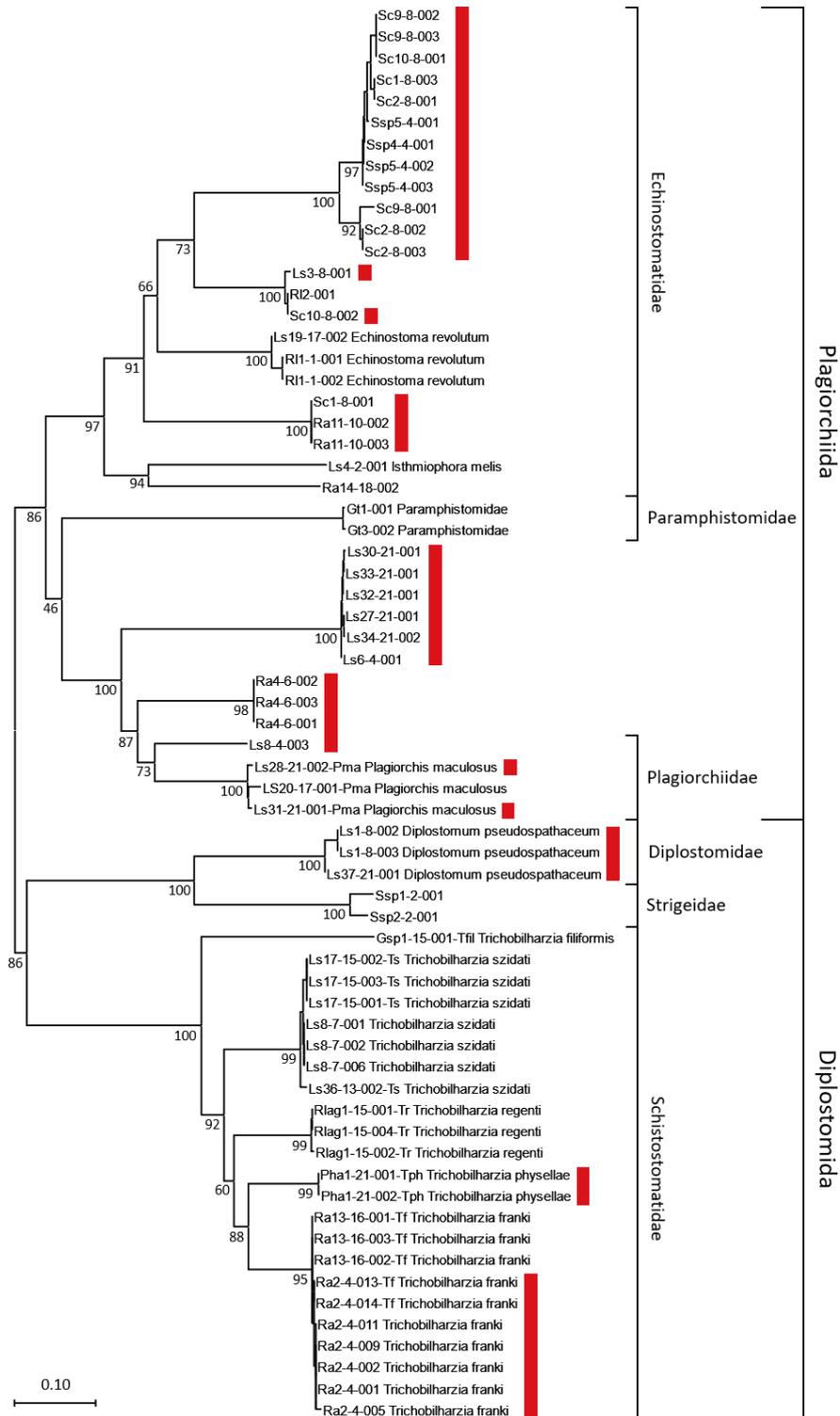


Abb. 8: Neighbour-Joining-Baum basierend auf vollständigen *COI*-Sequenzen der untersuchten Trematoden-Arten aus den Untersuchungs-Jahren 2019 und 2020. Ersichtlich wird das gute Auflösungsvermögen sowohl auf Artebene, als auch auf Ebene höherer taxonomischer Einheiten. Proben aus Oberösterreich wurden rot markiert. Zahlen an den Knotenpunkten entsprechen Bootstrap-Werten.

5. Diskussion

Ungeachtet der schwierigen Bedingungen im Projektjahr 2020 und der damit einhergehenden Behinderungen im geplanten Projektablauf (beschränkte Freilandsaison; fehlende Dermatitisfälle aufgrund von Ausgangsbeschränkungen) konnten eine Reihe der gesetzten Ziele erreicht werden: (1) Die Etablierung und Optimierung von PCR-Primern zum Nachweis von *Trichobilharzia*-Arten (*T. franki*, *T. regenti*, *T. szidati*), (2) deren Einsatz an Freilandproben (eDNA-Proben mit gesichertem Nachweis von Zerkarien sowie künstlich hergestellter Wasserproben). Dies beinhaltete auch das Aufarbeiten vorhandener eDNA-Proben aus dem Pilotprojekt. (3) Die Beurteilung der Sensitivität der Methode hinsichtlich Konzentration der Ziel-DNA sowie der Probennahme (zeitlich und räumlich) und die Beurteilung des Überdauerns von Zerkarien-DNA im Wasser. (4) Generierung von DNA-Barcodes von weiteren Trematoden-Arten, die im Zuge des Projekts gefunden wurden. (5) Die Laborversuche zur präferierten Schlüpftemperatur für *Trichobilharzia*-Arten konnten nur in sehr beschränktem Ausmaß durchgeführt werden. Mit dem Erstnachweis von *Trichobilharzia physellae* konnte ein weiteres Ziel, die Verbesserung des Kenntnisstandes über Trematoden in OÖ, erreicht werden. Besonders spannend ist der Nachweis dieser Art aus im November gesammelten Schnecken. Es ist allerdings nicht erwiesen, dass *T. physellae* auch im Freiland bei niedrigen Temperaturen schlüpft.

5.1. PCR-Primer zum Nachweis von *Trichobilharzia*-Arten

Die artspezifischen PCR-Primer erwiesen sich in allen Versuchen als selektiv. Dies betrifft die Testläufe bei der Etablierung sowie die negativ-Tests bei der Untersuchung der eDNA-Proben aus dem Aquarium. Die in der Mehrheit negativen Ergebnisse mit diesen Primern bei der Untersuchung der eDNA-Proben aus dem Freiland – nur in einem Gewässer gelang der Nachweis von *T. szidati* – sind in diesem Lichte zu sehen. Das Gewässer, welches einen positiven eDNA Nachweis von *T. szidati* lieferte (Weiher in Rekawinkel, NÖ), war auch jenes, in dem über Schlüpfversuche Zerkarien dieser Art nachgewiesen wurden. Eine Ausnahme bildet die eDNA-Probe aus dem Jahr 2019 (4-W-8) von der Hagenauer Bucht am unteren Inn (Fundort-Code 8): In diesem Gewässer waren *Trichobilharzia*-Zerkarien durch Schlüpfversuche nachgewiesen worden (die allerdings nicht mittels DNA-Analyse bestimmt werden konnten, vermutlich, weil die Fixierung des Materials fehlgeschlagen war). Die heuer (2020) durchgeführte Analyse der eDNA der damals zeitgleich genommenen Probe erbrachte jedoch keinen Nachweis. Grund könnte sein, dass sich eDNA-Proben (auch wenn bei -80°C

aufbewahrt) nur begrenzt halten. Dagegen spricht die Tatsache, dass bei vier Proben aus dem Jahr 2019 ein positives PCR-Produkt mit den *18S*-Primern erhalten wurde. Dies bedeutet, dass DNA vorhanden ist, jedoch nicht (oder nicht genügend) DNA einer der *Trichobilharzia*-Zielarten. Ein anderer möglicher Grund könnte in die Tatsache liegen, dass die eDNA-Probe damals an einer Stelle des Gewässers genommen wurde (im Uferbereich), die etliche Meter vom Fundort der Wirtsschnecke entfernt lag. Möglicherweise bräuchte es auch deutlich mehr Probeentnahmestellen, um eDNA der Zielart mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu finden. So zeigt eine eDNA Studie an Karpfen, dass dafür ein deutlich höherer Aufwand nötig ist und regelmäßige Testintervalle eingehalten werden müssen (Furlan et al. 2019).

Zusammenfassend lässt sich dennoch sagen, dass eine sehr gute Korrelation von Nachweisen von Zerkarien über Schlüpfversuche und positiven eDNA-Proben besteht: Wo keine Zerkarien von *Trichobilharzia*-Arten gefunden wurden, waren auch die entsprechenden eDNA-Untersuchungen negativ. Die Ergebnisse mit den Proben vom Pleschinger See, jenem Gewässer, wo über Schlüpfversuche *T. physellae* nachgewiesen werden konnte, stehen hierzu nicht im Widerspruch. Die Tatsache, dass hier die PCRs mit allen artspezifischen eDNA-Primerpaaren (designt für *T. franki*, *T. szidati* und *T. regenti*) negativ waren, kann als Bestätigung für deren Spezifität gelten. Ein nächster Schritt wäre das Design eines artspezifischen Primers für *T. physellae*.

5.2. Haltbarkeit der DNA und Sensitivität des PCR-Nachweises

Unsere Laborversuche mit Aquariumwasser haben gezeigt, dass die Zerkarien auch noch nach einer Woche mit hoher Verlässlichkeit nachzuweisen waren. Es bleibt offen, ob bei der Probennahme auch ganze Zerkarien oder deren Reste mit in die Filter gesaugt wurden. Diese Frage stellt sich jedoch auch bei jeder eDNA-Probennahme aus Gewässern im Freiland. Die negativen Ergebnisse der Aquarium-Proben nach 2 Wochen und das einzelne positive Ergebnis der zuletzt genommenen Probe (nach 6 Wochen) lassen vermuten, dass ein Anspringen der PCR bei sehr geringen Konzentrationen einem starken Zufallsfaktor unterliegt. Da in den PCR-Versuchen mit den Verdünnungsreihen jedoch ein positives Ergebnis bei extrem geringen Konzentrationen erzielt wurde, könnte ein wesentlicher Faktor auch in negativen Einflüssen durch inhibierende Substanzen und DNA anderer Organismen liegen. Diese könnten aus dem eDNA-Filter (in unserem Fall aus der eDNA aus dem Aquarium-Wasser) mitextrahiert werden und kompetitiv oder hemmend in der PCR wirken. In diesem Sinne dürfen die PCR-Versuche mit den Verdünnungsreihen (die ein ideales System darstellen) nicht 1:1 auf

natürliche Gewässerproben umgelegt werden. Es hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass es sowohl in limnischen als auch in marinen aquatischen Lebensräumen sehr viele Einflussfaktoren auf die Rate der Degradation von eDNA geben kann, die allerdings bis jetzt noch nicht umfassend erforscht wurden. So gibt es Hinweise, dass es besser sein könnte, eDNA-Proben in Gewässern bei niedriger Temperatur zu nehmen, da hohe Temperaturen zu erhöhter Aktivität des Mikrobioms führt und damit zu einer stärkeren Degradations-Rate von sowohl mitochondrialer (z.B. *COI*) als auch nukleärer DNA (z.B. *18S*). Auch gibt es anscheinend zwischen Degradations-Rate und der allgemeinen Biomasse des untersuchten Gewässers einen Zusammenhang. So ist die Degradations-Rate höher, je mehr Biomasse sich im Gewässer befindet (Jo et al. 2019; Jo et al. 2020). Das könnte auch einen Einfluss auf die genommenen Proben gehabt haben, da vor allem in dem Weiher bei Rekawinkel und in der Hagenauer Bucht viele Schwebstoffe enthalten waren.

5.3. eDNA-Barcoding zur Detektion von *Trichobilharzia* in der Praxis

Zusammen mit der hohen Spezifität der Primer (PCR-Tests auf Arten, von denen keine Zerkarien nachgewiesen wurden, waren immer negativ) unterstreichen die Ergebnisse das Potenzial, das die Methode grundsätzlich hat. Allerdings scheinen Ort (und vielleicht auch Umstände) der Probennahme eine Rolle zu spielen, selbst wenn es sich um ein relativ kleines Gewässer handelt wie beim Fundort 11 (Seerosenteich in Rekawinkel, ca. 400 m²). Von den vier Probennahmestellen in diesem Gewässer waren nur zwei positiv (und hier nur jeweils 1 bzw. 2 von jeweils 3 PCR-Wiederholungen). Interessanterweise war eine der positiven Proben vom Ufer, die andere von der Mitte des Teiches. Alle PCR-Tests (jeweils sechs Wiederholungen) der beiden anderen Proben-Entnahmestellen (eine ebenfalls am Ufer, die andere in einem sumpfigen Bereich des Teiches) waren hingegen negativ. Die Probe im sumpfigen Bereich könnte möglicherweise durch die große Anzahl an Schwebstoffen beeinträchtigt gewesen sein. Damit zeigt sich, wenn auch mit einer kleinen Stichprobe, dass sowohl der Ort der Beprobung, als auch die Zahl der PCR-Wiederholungen das Ergebnis beeinflussen können. Die Tatsache, dass von allen PCR-Reaktionen der fünf Proben vom Pleschinger See (wo Zerkarien von *T. physellae* gefunden wurden) nur eine einzige ein positives PCR-Ergebnis mit den *18S*-Primern erbrachte, zeigt einmal mehr, dass der PCR-Nachweis eine hohe Stochastizität hat. Unsere Ergebnisse spiegeln hier rezente Erfahrungen unterschiedlicher Studien wider, die eine heterogene Verteilung von eDNA in natürlichen Gewässern melden (Beentjes et al. 2019; Troth et al. 2021). Dazu passt auch die Schilderung von vier Betroffenen, welche zeitgleich

Mitte September 2020 nebeneinander im Pleschinger See schwammen. Zwei Personen zeigten tags darauf heftige, eine Person leichte Hautreaktionen (gemäß den Schilderungen Zerkarien-Ausschlag), während die vierte Person symptomlos blieb. Das könnte auf unterschiedliche Sensitivität der Badenden gegenüber Dermatitis-Erregern hinweisen (Macháček et al. 2018). Allerdings ist auch anzunehmen, dass Zerkarien wie Wolken unregelmäßig in der Wassersäule verteilt sind, je nach Vorhandensein emittierender Schnecken. Somit werden Badende eher gemäß dem Zufallsprinzip erreicht, bzw. unterliegt das Erfassen von Zerkarien-DNA bei der Probennahme auch dem Zufall. Der Aufgrund dieser Meldung noch am selben Tag vorgenommene Lokalaugenschein durch ein Team-Mitglied (Hubert Blatterer) mit Aufenthalt im Wasser (ca. etwa eine Stunde lang barfuß) bestätigte diese Meldung. In den Tagen danach konnte eine Badedermatitis festgestellt werden: heftig juckende typische Badedermatitis-Pusteln, welche etwa noch 2 Wochen lang sichtbar blieben (Hubert Blatterer, pers. comm., Abb. 9).



Abb. 9: Badedermatitis, ausgelöst durch *T. physellae*, einem Neunachweis für Österreich aus dem Pleschinger See. © H. Blatterer

Die Symptome der neu nachgewiesenen Art, ähneln damit der, von anderen *Trichobilharzia*-Arten beschriebenen Dermatitis (Abb. 10).

Auch wenn die derzeit möglichen Schlussfolgerungen noch auf zu wenigen Proben und Daten basieren, was vor allem auf das Fehlen einer genügend großen Zahl an *Trichobilharzia*-Nachweisen beruht, erscheint sowohl ein Warn- als auch Entwarn-System (ohne immensen Aufwand der Probennahme)

aus derzeitiger Sicht nicht sinnvoll. Neben der Unsicherheit bezüglich des Ortes der Probennahme konnte die Haltbarkeit der DNA über mehrere Tage gezeigt werden. Dies könnte auch für Gewässer im Freiland zutreffen, was die Einsetzbarkeit für ein Monitoring und die Erfassung einer aktuellen Situation fragwürdig erscheinen lässt. Die Einzelbeobachtung der im Labor gehaltenen *L. stagnalis*, die über sechs Wochen Zerkarien in großen Mengen ausstieß, lässt die Vermutung zu, dass selbst wenn ein Gewässer nach einem negativen Befund wieder freigegeben wird, es sehr schnell wieder zu einer hohen Belastung mit Zerkarien kommen könnte. Zum Beispiel könnten warme Wetterbedingungen den Zerkarienausstoß wieder ankurbeln. Das bedeutet jedoch nicht, dass das entwickelte Instrumentarium nicht sinnvoll einsetzbar bzw. ausbaubar ist. So haben in den letzten Jahren Studien in verschiedenen Tiergruppen den wirkungsvollen Gebrauch von eDNA zur Detektion von schwer auffindbaren oder aufwendig kartierbaren Tieren/Artgruppen aufzeigen können (Balasingham et al. 2018; Dougherty et al. 2016; Ushio et al. 2018). Allerdings beschäftigt sich nur ein sehr geringer Anteil der Studien mit Organismen, die ähnlich klein wie Zerkarien sind. Deshalb wäre es sinnvoll, die Methode noch breiter zu testen, sobald die Bedingungen für Feldstudien wieder besser sind. Es hat sich erwiesen, dass eDNA beim Auftreten von Dermatitis-Fällen eingesetzt werden kann, um Zerkarien als mögliche Verursacher zu bestätigen.



Abb. 10: Badedermatitis im Selbstversuch, ausgelöst durch *T. szidati*. © H. Sattmann

5.4. Verbreitung von *Trichobilharzia*-Arten

Die im Projekt gesammelten Daten über das Vorkommen (und die Wirtsarten) der verschiedenen *Trichobilharzia*-Arten geben neue Einblicke zu deren Verbreitung in Österreich im Allgemeinen und in Oberösterreich im Speziellen. Die im Projekt erstellten DNA-Barcodesequenzen sind Grundlage für

zukünftige Artbestimmungen. Das in Abb. 8 gezeigte Dendrogramm illustriert die genetischen Distanzen zwischen den untersuchten *Trichobilharzia*-Arten und zeigt, dass eine eindeutige Zuordnung mittels der *COI*-Sequenz möglich ist. Auch weitere digene Trematoden konnten nachgewiesen werden, darunter Taxa denen human- und veterinärmedizinisch potenzielle Bedeutung zukommt.

Vertreter der Diplostomidae und Strigeidae sind für die Fischerei und Fischereiwirtschaft von Bedeutung, da Fische die zweiten Zwischenwirte stellen. Zerkarien von *Diplostomum pseudospathaceum* etwa dringen in deren Augen ein. Sie verursachen dadurch Veränderungen des Verhaltens und der Fitness der Fische (Gopko et al. 2017) und machen sie zur leichteren Beute von Prädatoren, die die Endwirte darstellen. Das hat signifikante Auswirkungen auf die Nahrungsnetze und den Fischbestand.

Echinostomatidae sind wichtige Parasiten von Vögeln und Säugern. Eine Art, *Isthmiophora melis*, konnte in dieser Studie auf Artniveau bestimmt werden. Sie ist vor allem vom Dachs und anderen carnivoren Säugetieren beschrieben. Auch menschliche Infektionen wurden vereinzelt bekannt (Toledo & Esteban 2016). Derartige Infektionen sind allerdings selten und in Mitteleuropa eher unwahrscheinlich (Taraschewski 2002), aber doch möglich. Angemerkt sei zudem, dass bei den Echinostomatiden aufgrund taxonomischer Unklarheiten die Artbestimmung und die Zuordnungen in den Gen-Datenbanken mit großen Unsicherheiten behaftet sind (“highly confused” laut Hildebrand et al. 2015) und Ergebnisse daher mit Vorsicht und Expertise interpretiert werden müssen.

Aus der Familie Plagiorchiidae wurden ebenfalls zwei Vertreter auf Artniveau zugeordnet, denen medizinisch und wirtschaftlich kaum Bedeutung zukommt. Als Modellorganismen könnten sie hilfreich sein, um ökologische Zusammenhänge in Biozöosen zu untersuchen (vgl. Selbach et al. 2020). Die Art *Plagiorchis maculosus* parasitiert in Vögeln (z.B. Schwalben), Zwischenwirte sind Wasserschnecken (Lymnaeidae), zweite Zwischenwirte Mücken. *Opisthioglyphae ranae* parasitiert in Amphibien (z.B. Wasserfröschen), erste Zwischenwirte sind Wasserschnecken (Lymnaeidae), während Amphibien und Mollusken als zweite Zwischenwirte fungieren.

Das Projekt hat klar aufgezeigt, dass die in Österreich vorkommenden Trematoden (selbst die medizinisch relevanten *Trichobilharzia*-Arten) noch sehr ungenügend erfasst sind. In jedem der beiden Projektjahre konnte eine neue *Trichobilharzia*-Art für Österreich nachgewiesen werden (Reier et al. 2020; Blatterer et al. in prep.). Ob diese Neuankömmlinge sind oder schon längst in Österreich heimisch sind, lässt sich derzeit nicht sagen (evtl. könnte hier altes Sammlungsmaterial Aufschluss geben). Die Verbreitungsdynamik ist wahrscheinlich weiträumiger und komplexer, als bisher

angenommen – interessanterweise kam es im selben Zeitraum zum ersten gesicherten Nachweis eines auf *T. franki* zurückzuführenden Dermatitisfalles in der Slowakei (Gulyás et al. 2020). Mithilfe der DNA-Barcode-Referenzsequenzen, die im Rahmen des Projektes etabliert wurden, wird zukünftig die Artbestimmung von Zerkarien auf DNA-Ebene leicht möglich sein. So könnte die klassische Methode der Schlüpfversuche aus gesammelten Mollusken zusammen mit dem DNA-Barcoding der geschlüpften Zerkarien mittelfristig zu einer dichten Datenlage zur Verbreitung der verschiedenen Arten in Österreich führen. Mit diesem Ansatz wurde in einem Flusssystem in Deutschland in sechs Schnecken-Arten 36 verschiedene Trematoden-Arten festgestellt (Selbach et al. 2020). In einer weiteren Studie aus Dänemark wurden 22 Trematoden-Arten in 10 verschiedenen Schnecken-Arten gefunden (Duan et al. 2021). Das zeigt, dass der geringe Wissensstand über die Verbreitung aquatischer Trematoden mit einer Kombination von konventionellen Methoden (Schlüpfversuche und morphologische Untersuchung) und DNA-Analysen effektiv verbessert werden kann.

6. Zusammenfassung

Die im Folgeprojekt 2020 gesteckten Ziele zur Optimierung der PCR-Primer für einen Artnachweis via DNA-Barcoding, insbesondere die Eignung eines eDNA-Barcoding-Ansatzes, wurden, wenngleich mit einigen Einschränkungen, erreicht. Die konstruierten eDNA-Primer wurden optimiert und an Proben (Zerkarien, eDNA aus Labor und Freiland) getestet. Der eDNA-Ansatz konnte im laufenden Projekt soweit etabliert werden, dass er beim Auftreten von Dermatitis-Fällen eingesetzt werden kann, um Zerkarien als mögliche Verursacher zu bestätigen.

Erschwerend für das Erreichen der Projektziele wirkte, dass wegen fehlender Dermatitisfälle und beschränkter Freilandsaison nur wenig Material zum Vergleich der methodischen Zugänge zur Verfügung stand. Es gab dennoch eine gute Übereinstimmung zwischen Nachweisen von *Trichobilharzia*-Zerkarien über Schlüpfversuche und positiven eDNA-Nachweisen. Auch der Nachweis von DNA anderer taxonomischer Gruppen digener Trematoden in den eDNA Proben, der mit den 18S-Primern gelang, unterstreicht das grundsätzliche Potenzial der Methode.

Die Methode erwies sich als hochsensitiv, da im Labor noch geringste Mengen der Ziel-DNA nachweisbar waren. Was die praktische Anwendung mittels eDNA-Analysen betrifft, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Probeentnahmestelle einen großen Einfluss auf den Erfolg hat. Ob dieser Einfluss grundsätzlich unvorhersagbaren Umständen unterliegt, oder ob durch größer angelegte Studien ein optimales Samplingverfahren erstellt werden kann, bleibt zu untersuchen. Ein einfaches Dermatitis-(Früh-)Warn- oder Entwarn-System mittels eDNA-Analysen ist jedoch

unrealistisch. Dazu gibt es zu viele unvorhersehbare Unsicherheiten, wie Wind, Strömungen, Absetzprozesse, Aufwirbelungen durch Badende und Verteilung und Häufigkeit der infizierten Schnecken. Die vermutete Abhängigkeit von den Umständen und Bedingungen bei der Probennahme würde eine sehr dichte Beprobung notwendig machen und einen beträchtlichen Aufwand für die Probengewinnung und -analyse bedeuten. Die überraschend lange Nachweisbarkeit von eDNA nach Absterben der Zerkarien im Aquarium-Versuch spricht zusätzlich gegen eine solche Anwendung.

Die Anwendbarkeit der Artbestimmung mittels DNA-Barcodesequenzen konnte jedoch klar bestätigt werden. Die nun vorhandenen Referenzsequenzen und die spezifischen PCR-Primer erlauben eine eindeutige Artbestimmung der für Oberösterreich erwarteten Arten. Für die neu nachgewiesene *T. physellae* wird an der Etablierung gearbeitet.

Mithilfe des DNA-Barcoding-Ansatzes könnte die Erfassung der tatsächlich vorhandenen Arten digener Trematoden, die zum Teil von medizinischer und wirtschaftlicher Bedeutung sind, in (Ober)Österreich fortgesetzt werden.

7. Literatur

- Auer, H. & H. Aspöck (2002): Vogelbilharziasis als Erreger einer Hautkrankheit: die Zerkarien-Dermatitis. In: Aspöck H. (Hrsg): Amöben, Bandwürmer, Zecken. Parasiten und parasitäre Erkrankungen des Menschen in Mitteleuropa. *Denisia* **6**: 321-331.
- Balasingham, K. D., R. P. Walter, N. E. Mandrak & Daniel D. Heath (2019): Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology* **27**(1): 112-127.
- Beentjes, K. K., A. G. C. L. Speksnijder, M. Schilthuizen, M. Hoogeveen & B. B. van der Hoorn (2019): The effects of spatial and temporal replicate sampling on eDNA metabarcoding. *PeerJ* **7**: e7335.
- Dougherty, M. M., E. R. Larson, M. A. Renshaw, C. A. Gantz, S. P. Egan, D. M. Erickson & D. M. Lodge (2016): Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *Journal of Applied Ecology* **53**(3): 722-732.
- Duan, Y., A. Al-Jubury, P. W. Kania & K. Buchmann (2021): Trematode diversity reflecting the community structure of Danish freshwater systems: molecular clues. *Parasites & Vectors* **14**(1): 43.
- Duda, M., E. Haring, C. Hörweg, L. Kruckenhauser, S. Reier, H. Sattmann & N. U. Szucsich (2019): Projektendbericht: Pilotstudie zum Nachweis von Zerkarien-Dermatitis-Erregern in OÖ Badeseen mittels DNA-Barcoding. Wien, Naturhistorisches Museum Wien: 29 pp.
- Dvořák J., Sattmann H., Horák P. & Konecny R. (1999): Bird schistosomes from freshwater snails in Austria, with some notes on current problems (Digenea, Schistosomatidae). *Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie* **21**: 69–76.

- Furlan, E. M., D. Gleeson, C. Wisniewski, J. Yick & R. P. Duncan (2019): eDNA surveys to detect species at very low densities: A case study of European carp eradication in Tasmania, Australia. *Journal of Applied Ecology* **56**(11): 2505-2517.
- Gaub, L., Sattmann, H., Hörweg, C. & Walochnik, J. (2020): Molecular validation of species determination of larval trematodes from freshwater snail hosts in Austria, with special emphasis on the genus *Trichobilharzia* Skrjabin & Zakharow, 1920. *ARIANTA* **8**: 13-19.
- Gopko, M., V. N. Mikheev & J. Taskinen (2017): Deterioration of basic components of the anti-predator behavior in fish harboring eye fluke larvae. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **71**(4): 68.
- Gulyás, K., M. Soldánová, M. Orosová & M. Oros (2020): Confirmation of the presence of zoonotic *Trichobilharzia franki* following a human cercarial dermatitis outbreak in recreational water in Slovakia. *Parasitology Research* **119**(8): 2531-2537.
- Harrison, J. B., J. M. Sunday & S. M. Rogers (2019): Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**(1915): 20191409.
- Hildebrand, J., M. Adamczyk, Z. Laskowski & G. Zalesny (2015): Host-dependent morphology of *Isthmiophora melis* (Schrank, 1788) Luhe, 1909 (Digenea, Echinostomatinae) – morphological variation vs. molecular stability." *Parasites & Vectors* **8**(1): 481.
- Hohensee, N. (2016): Digenean trematodes in freshwater snails in the surroundings of Vienna with a focus on species involved in human infections. Master thesis, University of Vienna; 104 pp.
- Jo, T., H. Murakami, S. Yamamoto, R. Masuda & T. Minamoto (2019): Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution* **9**(3): 1135-1146.
- Jo, T., M. Arimoto, H. Murakami, R. Masuda & T. Minamoto (2020): Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA* **2**(2): 140-151.
- Lockyer, A. E., P. D. Olson, P. Østergaard, D. Rollinson, S. W. Attwood, V. R. Southgate, P. Horak, S. D. Snyder, T. H. Le, T. Agatsuma, D. P. McManus, A. C. Carmichael, S. Naem & D. T. J. Littlewood (2003): The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858. *Parasitology*, **126**(3): 203–224.
- Macháček, T., L. Turjanicová, J. Bulantová, J. Hrdý, P. Horák & L. Mikeš (2018): Cercarial dermatitis: a systematic follow-up study of human cases with implications for diagnostics. *Parasitology Research*, **117**(12): 3881–3895.
- Pawlowski, J., L. Apothéoz-Perret-Gentil, E. Mächler & F. Altermatt (2020): Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen: Richtlinien. Bern, Bundesamt für Umwelt. 77 pp.
- Reier, S., E. Haring, F. Billinger, H. Blatterer, M. Duda, C. Gorofsky, H.-P. Grasser, W. Heinisch, C. Hörweg, L. Kruckenhauser, N. U. Szucsich, A. Wanka & H. Sattmann (2020): First confirmed record of *Trichobilharzia franki* Müller & Kimmig, 1994, from *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758) for Austria. *Parasitology Research* **119**: 4135-4141.

- Sattmann, H. & C. Hörweg (2019): Schnecken als Zwischenwirte von parasitischen Würmern. *Denisia* **42**: 555-566.
- Sattmann, H., C. Hörweg & R. Konecny (2004): Zerkariendermatitis in Österreich - Rückblick und Perspektiven. *Denisia* **13**: 457-461.
- Selbach, C., M. Soldánová, C. K. Feld, A. Kostadinova & B. Sures (2020): Hidden parasite diversity in a European freshwater system. *Scientific Reports* **10**: 2694.
- Strickler, K. M., A. K. Fremier & C. S. Goldberg (2015): Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation* **183**: 85-92.
- Taberlet, P., A. Bonin, L. Zinger & E. Coissac (2018): *Environmental DNA For Biodiversity Research and Monitoring*, Oxford University Press, Oxford.
- Taraschewski H. (2002): Darmtrematoden – mögliche seltene Parasiten des Menschen in Mitteleuropa. In: Aspöck H. (Hrsg): *Amöben, Bandwürmer, Zecken. Parasiten und parasitäre Erkrankungen des Menschen in Mitteleuropa*. *Denisia* **6**: 317-320.
- Toledo, R. & J. G. Esteban (2016): An update on human echinostomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **110**(1): 37-45.
- Troth, C. R., M. J. Sweet, J. Nightingale & A. Burian (2021): Seasonality, DNA degradation and spatial heterogeneity as drivers of eDNA detection dynamics. *Science of the Total Environment* **768**: 144466.
- Ushio, M., K. Murata, T. Sado, I. Nishiumi, M. Takeshita, W. Iwasaki & M. Miya (2018): Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports* **8**(1): 4493.
- van Bochove, K., F. T. Bakker, K. K. Beentjes, L. Hemerik, R. A. Vos & B. Gravendeel (2020): Organic matter reduces the amount of detectable environmental DNA in freshwater. *Ecology and Evolution* **10**(8): 3647-3654.

Appendix – Tabellen

Appendix 1: Übersicht der gesammelten und untersuchten Schnecken der Exkursionen im Jahr 2020. n = Anzahl der gesammelten Schnecken; inf. = Anzahl der infizierten Schnecken; - = keine Zerkarienschlüpfversuche durchgeführt.

Exkursionsdatum	26.05.20		26.05.20		07.07.20		17.07.20		07.08.20		20.08.20		24.08.20		16.09.20		24.09.20		11.11.20	
Standort Nr.	[22]		[23]		[8]		[20]		[21]		[13]		[13]		[21]		[21]		[21]	
Schnecken (Gastropoda)	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.	n	inf.
<i>Bithynia tentaculata</i>																			7	0
<i>Galba truncatula</i>					1	-														
<i>Lymnaea stagnalis</i>	11	8	9	0	3	2			5	0	9	3	12	1	25	12	20	4		
<i>Physella acuta</i>					6	0									6	1	15	0	30	1
<i>Planorbarius corneus</i>	11	0	1	0			13	0					3	0						
<i>Planorbis planorbis</i>					1	0							9	0						
<i>Radix auricularia</i>																			1	1
<i>Radix cf balthica</i>			1	0																
<i>Stagnicola sp.</i>	10	0			44	1	1	0												
<i>Viviparus contectus</i>													1	-						
Summe	32	8	11	0	55	3	14	0	5	0	9	3	25	1	31	13	35	4	38	2
n gesamt / inf. gesamt	255	34	= Prävalenz von 13,33%																	

Appendix 2: Liste der neu erstellten Gensequenzen aus den Proben des Jahres 2020 sowie der in diesem Bericht nochmals erwähnten Proben aus 2019. Die Proben wurden sowohl morphologisch bestimmt als auch durch Vergleiche mit publizierten Gensequenzen genauer taxonomisch zugeordnet. § = Zuordnung bis auf Artebene wurde aufgrund von 18S-Sequenzen nur dann vorgenommen, wenn eine 100%ige Übereinstimmung mit Vergleichs-Sequenzen aus GenBank vorlag. *COI** = Sequenzen in Barcode-Qualität; *COI†* = unvollständige Gensequenzen; FS = Freiland-Sammlung.

2020							
Protokoll-ID	Morphologische Zuordnung	Taxonomische Zuordnung (DNA-Vergleiche)	Fundort	FO-nr	Sammel-Datum	Gen	Kommentar
Ra2-4-013-Tf	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	OÖ, Reichersberger Au	4	-	<i>COI*</i>	Schlüpfversuch - 30.05.19 12:00
Ra2-4-014-Tf	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	OÖ, Reichersberger Au	4	-	<i>COI*</i>	Schlüpfversuch - 30.05.19 12:00
Ls15-/001-Ts	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	NÖ, Rekawinkel	13	02.07.11	<i>COI†</i>	Sammlung NHM, in <i>L. stagnalis</i>
Ls15-/002-Ts	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	NÖ, Rekawinkel	13	02.07.11	<i>COI†</i>	Sammlung NHM, in <i>L. stagnalis</i>
Ls15-/005-Ts	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	NÖ, Rekawinkel	13	02.07.11	<i>COI†</i>	Sammlung NHM, in <i>L. stagnalis</i>
Rlag1-15-001-Tr	<i>Trichobilharzia regenti</i>	<i>Trichobilharzia regenti</i>	CZ, Prag, Karls-Universität	15	-	<i>COI*</i>	Laborzucht, in <i>R. lagotis</i>
Rlag1-15-002-Tr	<i>Trichobilharzia regenti</i>	<i>Trichobilharzia regenti</i>	CZ, Prag, Karls-Universität	15	-	<i>COI*</i>	Laborzucht, in <i>R. lagotis</i>
Rlag1-15-004-Tr	<i>Trichobilharzia regenti</i>	<i>Trichobilharzia regenti</i>	CZ, Prag, Karls-Universität	15	-	<i>COI*</i>	Laborzucht, in <i>R. lagotis</i>
Ls17-15-001-Ts	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	CZ, Prag, Karls-Universität	15	-	<i>COI*</i>	Laborzucht, in <i>L. stagnalis</i>
Ls17-15-002-Ts	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	CZ, Prag, Karls-Universität	15	-	<i>COI*</i>	Laborzucht, in <i>L. stagnalis</i>
Ls17-15-003-Ts	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	CZ, Prag, Karls-Universität	15	-	<i>COI*</i>	Laborzucht, in <i>L. stagnalis</i>
Ra13-16-001-Tf	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	CZ, Jetřichovice, Badeteich	16	28.06.19	<i>COI*</i>	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra13-16-002-Tf	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	CZ, Jetřichovice, Badeteich	16	28.06.19	<i>COI*</i>	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra13-16-003-Tf	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	CZ, Jetřichovice, Badeteich	16	28.06.19	<i>COI*</i>	FS, in <i>R. auricularia</i>
Gsp1-15-001-Tfil	<i>Trichobilharzia filiformis</i>	<i>Trichobilharzia</i> sp.	CZ, Prag, Karls-Universität	15	-	<i>COI*</i>	Laborinfektion, in <i>Gyraulus</i> sp.
Gsp1-15-002-Tfil	<i>Trichobilharzia filiformis</i>	<i>Trichobilharzia</i> sp.	CZ, Prag, Karls-Universität	15	-	<i>COI†</i>	Laborinfektion, in <i>Gyraulus</i> sp.
Gsp1-15-004-Tfil	<i>Trichobilharzia filiformis</i>	<i>Trichobilharzia</i> sp.	CZ, Prag, Karls-Universität	15	-	<i>COI†</i>	Laborinfektion, in <i>Gyraulus</i> sp.
Ls19-17-002	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	CZ, Pilsen, Velký Bolevecký	17	19.09.19	<i>COI*</i>	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Ra14-18-002	Echinostomatidae	Echinostomatidae	CZ, Hradec Králové	18	21.08.18	<i>COI</i>	FS, in <i>R. auricularia</i>
LS20-17-001-Pma	Xiphidiocercariae	<i>Plagiorchis maculosus</i>	CZ, Pilsen, Velký Bolevecký	17	19.09.19	<i>COI</i>	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Plc1-19-001	Xiphidiocercariae	Plagiorchiida	CZ, Pilsen, Malý Bolevecký	19	19.09.19	18S	FS, in <i>P. corneus</i>

Plc1-19-002	Xiphidiocercariae	Plagiorchiida	CZ, Pilsen, Malý Bolevecký	19	19.09.19	18S	FS, in <i>P. corneus</i>
Plc1-19-003	Xiphidiocercariae	Plagiorchiida	CZ, Pilsen, Malý Bolevecký	19	19.09.19	18S	FS, in <i>P. corneus</i>
Ls21-17-001	Diplostomidae	<i>Diplostomum pseudopathaceum</i> [§]	CZ, Pilsen, Velký Bolevecký	17	19.09.19	18S	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Ls21-17-002	Diplostomidae	<i>Diplostomum pseudopathaceum</i> [§]	CZ, Pilsen, Velký Bolevecký	17	19.09.19	18S	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Ls21-17-003	Diplostomidae	<i>Diplostomum pseudopathaceum</i> [§]	CZ, Pilsen, Velký Bolevecký	17	19.09.19	18S	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Plc2-17-002	Furcocercariae	Strigeidae	CZ, Pilsen, Velký Bolevecký	17	09.08.18	18S	FS, in <i>P. corneus</i>
Plc2-17-003	Furcocercariae	Strigeidae	CZ, Pilsen, Velký Bolevecký	17	09.08.18	18S	FS, in <i>P. corneus</i>
Ra15-17-002	Furcocercariae	Strigeidae	CZ, Pilsen, Velký Bolevecký	17	20.06.19	18S	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ssp9-18-001	Diplostomidae	<i>Diplostomum pseudopathaceum</i> [§]	CZ, Hradec Králové	18	21.08.18	18S	FS, in <i>Stagnicola</i> sp.
Ssp9-18-002	Diplostomidae	<i>Diplostomum pseudopathaceum</i> [§]	CZ, Hradec Králové	18	21.08.18	18S	FS, in <i>Stagnicola</i> sp.
Ssp9-18-003	Diplostomidae	<i>Diplostomum pseudopathaceum</i> [§]	CZ, Hradec Králové	18	21.08.18	18S	FS, in <i>Stagnicola</i> sp.
Bsp1-19-001	Furcocercariae	Cyathocotylidae	CZ, Pilsen, Malý Bolevecký	19	20.06.19	18S	FS, in <i>Bithynia</i> sp.
Bsp1-19-002	Furcocercariae	Cyathocotylidae	CZ, Pilsen, Malý Bolevecký	19	20.06.19	18S	FS, in <i>Bithynia</i> sp.
Bsp1-19-003	Furcocercariae	Cyathocotylidae	CZ, Pilsen, Malý Bolevecký	19	20.06.19	18S	FS, in <i>Bithynia</i> sp.
Ls22-22-001	Xiphidiocercariae	<i>Opisthioglyphe ranae</i> [§]	Wien, Pappelteich	22	26.05.20	18S	FS, in <i>L. stagnalis</i> 1
Ls22-22-002	Xiphidiocercariae	<i>Opisthioglyphe ranae</i> [§]	Wien, Pappelteich	22	26.05.20	18S	FS, in <i>L. stagnalis</i> 1
Ls24-8-002	Xiphidiocercariae	Plagiorchiidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	07.07.20	18S	FS, in <i>L. stagnalis</i> , Standort 1
Ssp10-8-001	Xiphidiocercariae	Plagiorchiidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	07.07.20	18S	FS, in <i>Stagnicola</i> sp., Standort 1
Ssp10-8-002	Xiphidiocercariae	Plagiorchiidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	07.07.20	18S	FS, in <i>Stagnicola</i> sp., Standort 1
Ls25-8-002	Diplostomidae	<i>Diplostomum pseudopathaceum</i> [§]	OÖ, Hagenauer Bucht	8	07.07.20	18S	FS, in <i>L. stagnalis</i> , Standort 2
Ls27-21-001	Xiphidiocercariae	Plagiorchiida	OÖ, Pleschinger See	21	16.09.20	COI*	FS, in <i>L. stagnalis</i> 1
Ls28-21-002-Pma	<i>Plagiorchis</i> sp.	<i>Plagiorchis maculosus</i>	OÖ, Pleschinger See	21	16.09.20	COI	FS, in <i>L. stagnalis</i> 2
Ls30-21-001	Xiphidiocercariae	Plagiorchiida	OÖ, Pleschinger See	21	16.09.20	COI*	FS, in <i>L. stagnalis</i> 4
Ls31-21-001-Pma	<i>Plagiorchis</i> sp.	<i>Plagiorchis maculosus</i>	OÖ, Pleschinger See	21	16.09.20	COI	FS, in <i>L. stagnalis</i> 5
Ls37-21-001-Dps	Diplostomidae	<i>Diplostomum pseudopathaceum</i>	OÖ, Pleschinger See	21	16.09.20	COI*	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Pha1-21-001-Tph	<i>Trichobilharzia physellae</i>	<i>Trichobilharzia physellae</i>	OÖ, Pleschinger See	21	16.09.20	COI*	FS, in <i>P. acuta</i>
Pha1-21-002-Tph	<i>Trichobilharzia physellae</i>	<i>Trichobilharzia physellae</i>	OÖ, Pleschinger See	21	16.09.20	COI*	FS, in <i>P. acuta</i>

Ls32-21-001	Xiphidiocercariae	Plagiorchiida	OÖ, Pleschinger See	21	24.09.20	COI*	FS, in <i>L. stagnalis</i> 1
Ls33-21-001	Xiphidiocercariae	Plagiorchiida	OÖ, Pleschinger See	21	24.09.20	COI*	FS, in <i>L. stagnalis</i> 2
Ls34-21-002	Xiphidiocercariae	Plagiorchiida	OÖ, Pleschinger See	21	24.09.20	COI*	FS, in <i>L. stagnalis</i> 3
Ls36-13-002-Ts	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	NÖ, Rekawinkel	13	16.09.20	COI	Schlüpfversuch, in <i>L. stagnalis</i>
Pha2-21-002-Tph	<i>Trichobilharzia</i> sp.	<i>Trichobilharzia physellae</i>	OÖ, Pleschinger See	21	11.11.20	COI†	FS, in <i>P. acuta</i>
2019							
Protokoll-ID	Morphologische Zuordnung	Taxonomische Zuordnung (DNA-Vergleiche)	Fundort	FO-nr.	Sammel-Datum	Gen	Kommentar
Gt1-001	Paramphistomidae	Paramphistomidae	-	-	-	COI	Sammlung NHM, in <i>G. trunculata</i>
Gt3-002	Paramphistomidae	Paramphistomidae	-	-	-	COI	Sammlung NHM, in <i>G. trunculata</i>
Ls1-8-002	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Diplostomum pseudospathaceum</i>	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Ls1-8-003	<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Diplostomum pseudospathaceum</i>	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Ls3-8-001	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Ls4-2-001	Echinostomatidae	<i>Isthmiophora melis</i>	NÖ, Fischamend, Donau	2	-	COI	Sammlung NHM, in <i>L. stagnalis</i>
Ls6-4-001	Plagiorchiida	Plagiorchiida	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Ls8-4-003	Plagiorchiida	Plagiorchiida	OÖ, Reichersberger Au	4	27.03.19	COI	FS, in <i>L. stagnalis</i>
Ls8-7-001	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	NÖ, Bruck/Leitha	7	-	COI	Sammlung NHM, in <i>L. stagnalis</i>
Ls8-7-002	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	NÖ, Bruck/Leitha	7	-	COI	Sammlung NHM, in <i>L. stagnalis</i>
Ls8-7-006	<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	NÖ, Bruck/Leitha	7	-	COI	Sammlung NHM, in <i>L. stagnalis</i>
Ra2-4-001	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra2-4-002	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra2-4-005	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra2-4-009	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra2-4-011	<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra4-6-001	Plagiorchiida	Plagiorchiida	OÖ, Holzöster See	6	04.06.19	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra4-6-002	Plagiorchiida	Plagiorchiida	OÖ, Holzöster See	6	04.06.19	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra4-6-003	Plagiorchiida	Plagiorchiida	OÖ, Holzöster See	6	04.06.19	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>

Ra11-10-002	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Ausee	10	-	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>
Ra11-10-003	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Ausee	10	-	COI	FS, in <i>R. auricularia</i>
Rl1-1-001	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	NÖ, Rohrau	1	-	COI	Sammlung NHM, in <i>R. labiata</i>
Rl1-1-002	Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	NÖ, Rohrau	1	-	COI	Sammlung NHM, in <i>R. labiata</i>
Rl2-001	Echinostomatidae	Echinostomatidae	NÖ, Rohrau	1	-	COI	Sammlung NHM, in <i>R. labiata</i>
Sc1-8-001	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Sc1-8-003	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Sc2-8-001	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Sc2-8-002	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Sc2-8-003	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Sc9-8-001	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Sc9-8-002	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Sc9-8-003	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Sc10-8-001	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Sc10-8-002	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Hagenauer Bucht	8	19.08.19	COI	FS, in <i>S. corvus</i>
Ssp1-2-001	Strigeidae	Strigeidae	NÖ, Fischamend, Donau	2	-	COI	Sammlung NHM, in <i>Stagnicola</i> sp.
Ssp2-2-001	Strigeidae	Strigeidae	NÖ, Fischamend, Donau	2	-	COI	Sammlung NHM, in <i>Stagnicola</i> sp.
Ssp4-4-001	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>Stagnicola</i> sp
Ssp5-4-001	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>Stagnicola</i> sp
Ssp5-4-002	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>Stagnicola</i> sp
Ssp5-4-003	Echinostomatidae	Echinostomatidae	OÖ, Reichersberger Au	4	27.05.19	COI	FS, in <i>Stagnicola</i> sp

Appendix 3: Temperaturabhängige Zerkarienschlüpfversuche im Labor in Prag. Ind. Nr. = Individuumsnummer; Größe = Größe der Schnecke = *Radix lagotis* (mm); n = Anzahl der Zerkarien = *Trichobilharzia regenti*.

Ind. Nr.	10°C		15°C		20°C		25°C	
	Größe	n	Größe	n	Größe	n	Größe	n
1	6	38	6	22	7	111	9	57
2	8	7	5	17	6	10	5	51
3	5	36	5	60	6	107	6	58
4	7	77	11	0	5	61	6	50
5	9	370	9	0	12	34	6	67
6	5	71	6	0	7	3	5	14
7	9	0	7	0	10	148	6	0
8	6	0	10	0	9	0	9	0
9	10	0	7	0	11	0	9	0
10	9	0	6	0	8	0	6	0
11	9	0	10	0	9	0	10	0
12	12	0	8	0	10	0	6	0
13	8	0	8	0	7	0	7	0
14	8	0	9	0	8	0	11	0
15	10	0	9	0	6	0	10	0
16	11	0	7	0	9	0	5	0
17	6	0	7	0	7	0	5	0
18	9	0	5	0	9	0	10	0
19	7	0	11	0	12	0	7	0
20	12	0	7	0	7	0	9	0
MW	8,3	29,95	7,65	4,95	8,25	23,7	7,35	14,85

Appendix 4: Durchschnittliche Anzahl geschlüpfter Zerkarien bei verschiedenen Temperaturen sowie Größe der infizierten Schnecken (*Radix lagotis*). In Klammer jeweils die Bandbreite angeführt.

	Zerkarien	Schneckengröße in mm	Zahl der Zerkarien / mm Schnecke
10°C	99,8 (7-370)	6,67 (5-9)	14,97
15°C	33,0 (17-60)	5,33 (5-6)	6,19
20°C	67,7 (3-148)	7,57 (5-12)	8,94
25°C	49,5 (14-67)	6,17 (5-9)	8,03

Appendix 5: Temperaturabhängige Zerkarienschlüpfversuche im Labor in Prag, 2. Versuch.
Ind. Nr = Individuumsnummer; Größe = Größe der Schnecke = *Radix lagotis* (mm); n =
Anzahl der Zerkarien (*Trichobilharzia regenti*). MW = Mittelwert.

Ind. Nr.	5°C		15°C		25°C	
	Größe	n	Größe	n	Größe	n
1	13	32	13	0	13	78
2	11	5	10	0	13	98
3	14	8	14	0	9	44
4	10	0	10	0	12	0
5	11	0	11	0	10	0
6	12	0	9	0	12	0
7	13	0	12	0	12	0
8	10	0	10	0	8	0
MW	11,75	5,63	11,13	0	11,13	27,5

Appendix 6: Durchschnittliche Anzahl geschlüpfter Zerkarien (*Trichobilharzia regenti*) bei verschiedenen Temperaturen sowie Größe der infizierten Schnecken (*Radix lagotis*), 2. Versuch.
In Klammer jeweils die Bandbreite angeführt.

	Zerkarien	Schnecken- größe in mm	Zahl der Zerkarien/ mm Schnecke
5°C	15,0 (5-32)	12,67 (11-14)	1,18
15°C	-	-	-
25°C	73,3 (44-98)	11,67 (9-13)	6,28