

Aquatische Ökosysteme: Grundlagen für das GVO-Monitoring in Gewässerlebensräumen

Marcus Schulz, Thomas Knebelsberger,
Andrea Barco, Nicole Graumann und
Claus-Dieter Dürselen

BfN-Schriften

781

2026





Bundesamt für
Naturschutz

Aquatische Ökosysteme: Grundlagen für das GVO-Monitoring in Gewässerlebensräumen

Marcus Schulz
Thomas Knebelsberger
Andrea Barco
Nicole Graumann
Claus-Dieter Dürselen

Impressum

Titelbild: Probenahme mit einem Planktonnetz (©Foto: M. Schulz)

Adressen der Autorinnen und der Autoren:

Priv.-Doz. Dr. habil. Marcus Schulz	Steinkamp 19, 26125 Oldenburg E-Mail: schulz@aquaecology.de
Dr. Thomas Knebelsberger	Emsstraße 20, 26382 Wilhelmshaven E-Mail: knebelsberger@biome-id.com
Dr. Andrea Barco	abarco@biome-id.com
Nicole Graumann	ngraumann@biome-id.com
Dr. Claus-Dieter Dürselen	Steinkamp 19, 26125 Oldenburg E-Mail: dürselen@aquaecology.de

Fachbetreuung im BfN:

Christina Hünig	
Dr. Wiebke Züghart	Fachgebiet II 1.3 „Monitoring der terrestrischen Biodiversität“

Förderhinweis:

Gefördert durch das Bundesamt für Naturschutz (BfN) mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Klimaschutz, Naturschutz und nukleare Sicherheit (BMUKN) (FKZ:3522841100).

Diese Veröffentlichung wird aufgenommen in die Literaturdatenbank „DNL-online“ (www.dnl-online.de).

BfN-Schriften sind nicht im Buchhandel erhältlich. Eine pdf-Version dieser Ausgabe kann unter www.bfn.de/publikationen heruntergeladen werden.

Institutioneller Herausgeber: Bundesamt für Naturschutz
Konstantinstr. 110
53179 Bonn
URL: www.bfn.de

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



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

ISBN 978-3-89624-545-8

DOI 10.19217/skr781

Bonn 2026

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Abstract	10
1 Einleitung	13
2 Expositionspfade von nGVO in Süßwasserökosystemen	15
2.1 Methodik.....	15
2.1.1 Literaturrecherche	15
2.1.2 Modellierung.....	21
2.2 Allgemeines Literaturreview zu nGVO	21
2.2.1 Gentechnisch veränderte Mücken.....	21
2.2.1.1 Geschlechtsspezifische Genmanipulationen	22
2.2.1.2 Biologische Insektizide	24
2.2.1.3 Veränderungen des Geruchssinnes	27
2.2.1.4 Weitere morphologische Veränderungen	28
2.2.1.5 Modelle und Risiken.....	29
2.2.1.6 Auswahl der nGVO	31
2.2.1.7 Steckbrief <i>Anopheles gambiae</i>	32
2.2.2 Gentechnisch veränderte Bakterien	34
2.2.2.1 Produktion biologischer Pestizide.....	34
2.2.2.2 Natürliche Düngung	35
2.2.2.3 Bioremediation	35
2.2.2.4 Produktion von Kohlenwasserstoffen und von organischen Polymeren	36
2.2.2.5 Produktion von Arzneimitteln und Lebensmitteln	38
2.2.2.6 Bekämpfung von bakteriellen Infektionen	41
2.2.2.7 Auswahl nGVO Bakterien	42
2.2.2.8 Steckbrief von <i>Bacillus subtilis</i>	43
2.2.3 Gentechnisch veränderte Mikroalgen	46
2.2.3.1 Grundlagenforschung.....	46
2.2.3.2 Steigerung der Lipidproduktion	53
2.2.3.3 Steigerung der Pigmentproduktion	57
2.2.3.4 Zusammenfassung weiterer Anwendungen	58
2.2.3.5 Aufführung einiger Übersichtsartikel.....	60
2.2.3.6 Auswahl nGVO-Mikroalgen.....	61
2.2.3.7 Steckbrief von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	63

2.2.4	Gentechnisch veränderte Fische.....	64
2.2.4.1	Grundlagenforschung.....	64
2.2.4.2	Genetische Editierung der Keimzellen	67
2.2.4.3	Untersuchung und genetische Optimierung entwicklungsbezogener Aspekte	70
2.2.4.4	Untersuchung und genetische Optimierung des Lipidmetabolismus.....	72
2.2.4.5	Untersuchung und genetische Optimierung der Immunreaktion	74
2.2.4.6	Auswahl nGVO-Fische	82
2.2.4.7	Steckbrief von <i>Oncorhynchus mykiss</i>	83
2.3	Literaturreview zu kausalen populationsgenetischen Zusammenhängen und Expositionspfaden von nGVO.....	84
2.3.1	<i>Anopheles gambiae</i>	84
2.3.1.1	Fazit	86
2.3.2	<i>Bacillus subtilis</i>	86
2.3.2.1	Fazit	87
2.3.3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	87
2.3.3.1	Fazit	89
2.3.4	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	89
2.3.4.1	Fazit	90
2.4	Modelle kausaler populationsgenetischer und ökologischer Zusammenhänge	90
2.4.1	Wortmodelle und Wirkungsgraphen	91
2.4.1.1	<i>Anopheles gambiae</i>	93
2.4.1.2	<i>Bacillus subtilis</i>	95
2.4.1.3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	96
2.4.1.4	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	98
2.4.2	Differentialgleichungsmodelle	99
2.4.2.1	<i>Anopheles gambiae</i>	100
2.4.2.2	<i>Bacillus subtilis</i>	102
2.4.2.3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	103
2.4.2.4	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	104
2.4.3	Referenzszenarien.....	106
2.4.3.1	<i>Anopheles gambiae</i>	106
2.4.3.2	<i>Bacillus subtilis</i>	107
2.4.3.3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	108
2.4.3.4	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	109
2.4.4	Sensitivitätsanalysen	110

2.4.5	Szenarienanalysen.....	114
2.4.6	Schlussfolgerungen der Modellergebnisse für ein künftiges Monitoring von nGVO	120
3	Übersicht zu bestehenden Messsystemen	122
3.1	Methodik.....	122
3.1.1	Implementierte Monitoringprogramme in aquatischen Systemen.....	122
3.1.2	Relevanz bestehender Monitoringprogramme für ein nGVO-Monitoring.....	122
3.1.2.1	Repräsentativität.....	122
3.1.2.2	Sensitivität.....	122
3.1.2.3	Vergleichbarkeit	123
3.1.2.4	Kosteneffizienz	123
3.1.2.5	Umweltrelevanz	123
3.2	Ergebnisse	123
3.2.1	Internationale Vorgaben und Monitoringprogramme	123
3.2.2	Europäische Richtlinien.....	126
3.2.3	Nationale Monitoringprogramme.....	127
3.2.3.1	Bundesweit.....	128
3.2.3.2	Bundesländerübergreifend	129
3.2.3.3	Bundesländer	137
3.2.4	Relevanz bestehender Monitoringprogramme für ein nGVO-Monitoring.....	156
4	Einsatzmöglichkeiten neuer methodischer Entwicklungen.....	158
4.1	Methodik.....	158
4.2	Ergebnisse	163
4.2.1	Neuartige molekularbiologische Nachweismethoden.....	163
4.2.1.1	Barcoding.....	166
4.2.1.2	Metabarcoding.....	170
4.2.1.3	Multiplex-PCR.....	176
4.2.1.4	qPCR	180
4.2.1.5	dPCR	184
4.2.1.6	LAMP	188
4.2.1.7	RPA	191
4.2.1.8	MALDI-TOF MS	195
4.2.1.9	HRM.....	198
4.2.1.10	LFA.....	202
4.2.2	Fernerkundungsmethoden	205

4.2.2.1	Mücken.....	206
4.2.2.2	Mikroalgen	207
4.2.3	Kamerasysteme, akustische Systeme und automatische Bilderkennung	210
4.2.3.1	Mücken.....	211
4.2.3.2	Bakterien	212
4.2.3.3	Mikroalgen	214
4.2.3.4	Fische.....	216
4.2.4	Einbindung von Citizen Science.....	218
4.2.4.1	Mücken.....	219
4.2.4.2	Bakterien	223
4.2.4.3	Mikroalgen	224
4.2.4.4	Fische.....	224
5	Schlussfolgerungen und Empfehlungen für die Konzeption eines GVO-Monitorings in Binnengewässern	226
	Literaturverzeichnis	229
	Abbildungsverzeichnis	277
	Tabellenverzeichnis	278
	Abkürzungsverzeichnis.....	280
A	Anhang.....	282

Zusammenfassung

Die Freisetzung neuer gentechnisch veränderter Organismen (nGVO) erfordert nach aktuellem EU-Recht ein Monitoring, um mögliche schädliche Auswirkungen auf Natur, Umwelt und menschliche Gesundheit frühzeitig zu erfassen und rechtzeitig reagieren zu können. Ein solches nGVO-Monitoring dient als Frühwarnsystem und zur Überprüfung potenzieller kumulativer und langfristiger schädlicher Effekte auf die Umwelt. In diesem Projekt wurden die Grundlagen für ein Monitoring von (n)GVO für den aquatischen Bereich erarbeitet, die bisher noch nicht vorliegen.

In einem ersten Schritt wurde eine Literaturrecherche zu neuen molekularbiologischen Techniken zur Veränderung des Erbgutes in Anwendung bei Mücken, Bakterien, Mikroalgen und Fischen durchgeführt. Dies diente der Entwicklung von Vorschlägen für Beispielarten. Es erfolgte eine Beschränkung auf Veröffentlichungen aus den letzten sechs Jahren, da erst in der jüngsten Vergangenheit neue molekularbiologische Techniken zur Veränderung des Erbgutes verbreitet zur Anwendung gekommen sind (ausgehend vom Zeitpunkt der Recherche (2023)).

Für Mücken, Bakterien, Mikroalgen und Fische wurden so 130 bzw. 157, 140 und 542 referierte Publikationen recherchiert. In einem nächsten Schritt wurden die Referenzen zu den Publikationen in eine digitale Literaturdatenbank (Citavi) überführt. Auf Basis der Auswertung der Publikationen und der Zusammenfassung ihrer wesentlichen Ergebnisse in einem Literaturreview wurden nGV-Beispielarten ausgewählt, deren mögliche Auswirkungen auf die Umwelt im weiteren Projekt untersucht wurden:

Bei den Mücken wurde *Anopheles gambiae* als nGVO-Beispielart ausgewählt. Für diese Art wurden sehr viele Anwendungen moderner gentechnischer Methoden beschrieben, und sie ist ein Hauptvektor für pathogene Keime wie Plasmodium.

Für Bakterien wurde die molekulargenetisch veränderte Art *Bacillus subtilis* als nGVO ausgewählt, da sie sowohl terrestrisch als auch limnisch weitverbreitet ist und für sie zahlreiche Anwendungen als biologisches Pflanzenschutzmittel dokumentiert wurden.

Für Mikroalgen wurde die häufig bearbeitete Art *Chlamydomonas reinhardtii* als nGVO-Beispielart für limnische Systeme ausgewählt, da sie die am häufigsten geneditierte Mikroalgenart und am vielversprechendsten für eine Anwendung im Freiland ist.

Für die Gruppe der Fische wurde die Art *Oncorhynchus mykiss* ausgewählt, da sie häufig in heimischen limnischen Gewässern vorkommt und viele Studien zur Anwendung von neuen gentechnischen Methoden in dieser Art vorliegen.

Es wurden vier deterministische Modelle zur Populationsdynamik und Exposition von je einem nGVO in aquatischen Ökosystemen auf der Basis einer Literaturrecherche entwickelt und numerisch implementiert. Mit jedem Modell wurde zunächst je ein realistisches Referenzszenario gerechnet. Diese Szenarien liefern folgende Ergebnisse: *Anopheles gambiae* stirbt nach kurzfristiger Ausbreitung der nGVO-Variante gegenüber dem Wildtyp nahezu aus. Ihre Position im ökologischen System wird durch eine Konkurrenzart eingenommen, z. B. *Anopheles coluzzii*. Die nGVO-Variante von *Bacillus subtilis* etabliert sich sehr schnell gegenüber dem Wildtyp, der ausstirbt. Konkurrierende Arten werden durch Allelopathie und aufgrund geringerer Fitness im Vergleich zum nGVO von diesem zurückgedrängt, sterben aber nicht aus. Die nGVO-Variante von *Chlamydomonas reinhardtii* etabliert sich sehr schnell gegenüber dem Wildtyp, der ausstirbt. Konkurrierende Arten werden aufgrund geringerer Fitness im Vergleich

zum nGVO von diesem zurückgedrängt, sterben aber nicht aus. Die nGVO-Variante von *Oncorhynchus mykiss* etabliert sich sehr schnell gegenüber dem Wildtyp, der ausstirbt. Die konkurrierende Art, die Bachforelle, stirbt aufgrund geringerer Fitness im Vergleich zum nGVO ebenfalls sehr schnell aus.

Auf der Basis der Referenzszenarien wurden lokale Sensitivitätsanalysen und Szenarienanalysen mit den numerischen Modellen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen auf, dass sich ein künftiges nGVO-Monitoring nicht nur auf genetische Marker fokussieren sollte, sondern darüber hinaus physikochemische Parameter und andere Artengruppen aquatischer Biota umfassen sollte, die in ökologischer Wechselwirkung mit den Beispielsarten stehen.

Des Weiteren wurde eine Recherche zu bereits bestehenden Gewässermonitoringverfahren durchgeführt. Dabei wurden die zeitlichen und räumlichen Rahmenbedingungen, die verwendeten Methoden, die Beobachtungsparameter und die Datenverfügbarkeit dokumentiert. Insgesamt wurden 98 deutsche etablierte Monitoringprogramme gefunden, welche auf Bundes- und Länderebene sowie länderübergreifend etabliert sind. Aktuell beinhalten sehr wenige neuartige molekularbiologische Nachweismethoden.

Die Beurteilung der Eignung der Verfahren wurde anhand folgender Kriterien vorgenommen: Repräsentativität, Sensitivität, Genauigkeit, Vergleichbarkeit, Kosteneffizienz und Umweltrelevanz. Für die Einschätzung und Bewertung wurde ein Punktesystem herangezogen. Jedes Monitoringprogramm wurde anhand einer Skala von ein bis fünf Punkten bezüglich jedes Kriteriums bewertet. Diese Skala orientierte sich an der fünfstufigen Bewertung der Gewässergüte gemäß der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL). Monitoringprogramme, die im Rahmen europäischer Richtlinien umgesetzt werden und somit besonders repräsentativ und vergleichbar sind, erfüllten am besten die angelegten Kriterien. Besonders geeignet sind demnach die Monitoringprogramme der Bundesländer nach WRRL, wie zum Beispiel das Monitoring der Oberflächengewässerqualität Baden-Württemberg, das Monitoringprogramm Oberflächengewässerbeschaffenheit Bayern oder das Monitoringprogramm zur Überwachung der Beschaffenheit und Menge von Oberflächengewässer und des Grundwassers Mecklenburg-Vorpommern. Die Monitoringprogramme nach WRRL sind zwar am ehesten für ein nGVO-Monitoring geeignet, sie wären zur Erfassung von nGVO allerdings zu modifizieren. Für die Nutzung der Monitoringprogramme im Rahmen eines zukünftigen GVO-Monitorings in Gewässerlebensräumen ist die Anbindung neuartiger molekularbiologischer Nachweismethoden, welche eine Nachverfolgung von nGVO ermöglichen, zu empfehlen. Dafür sollten die etablierten Monitoringprogramme nach WRRL neben den aquatischen Biota auf Artniveau auch den jeweiligen Wildtyp von den nGVO unterscheiden können.

Abschließend wurden neuartige Nachweismethoden recherchiert, die für die Beobachtung der vier Beispielsarten verwendet werden könnten. Es wurde in erster Hinsicht unterschieden zwischen neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden und allen anderen innovativen nichtmolekularbiologischen Monitoringmethoden. Letztere wurden in einem nächsten Schritt unterteilt nach Fernerkundungsmethoden, optischen und akustischen Systemen in Zusammenhang mit automatischer Bilderkennung sowie der Einbindung von Bürgerwissenschaftler*innen in das Monitoring aquatischer Systeme.

Die identifizierten neuartigen molekularbiologischen Nachweisverfahren und die neuartigen nichtmolekularbiologischen Monitoringmethoden wurden kriterienbasiert (Repräsentativität, Sensitivität, Genauigkeit, Vergleichbarkeit, Nachverfolgung von nGVO, Messung der Umweltexposition, Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt, Kosteneffizienz und

Umweltrelevanz) nach einer fünfstufigen Punkteskala bewertet (vgl. etablierte Messprogramme). Die besten Bewertungen erzielten qPCR (Bakterien, Algen und Fische) und Barcoding (Mücken). Neuartige nichtmolekularbiologische Monitoringmethoden schnitten in der Regel schlechter ab als neuartige molekularbiologische Nachweismethoden, da erstere nGVO nicht vom Wildtyp unterscheiden können, wenn keine morphologischen Veränderungen des nGVO vorliegen. Aufgrund von zukünftigen Entwicklungen in Bezug auf die Anwendungshäufigkeit, ein Voranschreiten der Standardisierung oder eine Weiterentwicklung der Methoden kann eine Verschiebung in Hinblick auf die Relevanz der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden zudem nicht ausgeschlossen werden. Gerade die qPCR, das Barcoding, das Metabarcoding und die dPCR wurden für alle Organismengruppen ähnlich gut bewertet. Zudem ist es denkbar, dass isotherme Amplifikationsmethoden (wie LAMP oder RPA) in Zukunft an Relevanz zunehmen und im Bereich der Feldversuche bevorzugt werden könnten. Dabei gilt es zu beachten, dass keine dieser Nachweismethoden eine Untersuchung des gesamten Genoms auf unbekannte Mutationen erlaubt. Eine solche Analyse wäre zurzeit nur durch eine Genomsequenzierung möglich, welche sehr aufwendig und teuer ist und im Rahmen eines großrähmigen nGVO-Monitorings nicht umgesetzt werden kann.

Für ein nGVO-Monitoring sind molekularbiologische Methoden notwendig, wenn keine phänotypischen Veränderungen vorliegen. Aus den Modellergebnissen folgt, dass in einem künftigen Monitoring neben der Erfassung von nGVO eine Erfassung von Wildtyp und Konkurrenzarten wichtig ist. Darüber hinaus ist ein Monitoring von Nährstoffen wichtig, um die ökologische Kapazität zu untersuchen, welche in den Modellen eine hohe Sensitivität aufweist.

Die neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden werden immer weiterentwickelt, so dass in naher Zukunft mit noch höheren Genauigkeiten und höherer Kosteneffizienz zu rechnen ist. Auch eine Verschiebung in Hinblick auf die Relevanz der Methoden durch zukünftige Entwicklungen kann nicht ausgeschlossen werden. Anhand der Ergebnisse der Bewertung können die qPCR, das Barcoding, das Metabarcoding und die dPCR als die zurzeit relevantesten neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden herausgestellt werden. Von den nichtmolekularbiologischen Methoden eignet sich am ehesten die Einbindung von Citizen Science im Rahmen des „Mückenatlas“ als Ergänzung zu bestehenden Monitoringprogrammen und neuartigen molekularbiologischen Methoden. Eine Anbindung von neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden an etablierte Monitoringprogramme nach WRRRL ist möglich und wünschenswert, um den zusätzlichen logistischen und finanziellen Aufwand zu minimieren und die Vorteile der etablierten Monitoringprogramme nach WRRRL wie hohe Repräsentativität und Umweltrelevanz nutzen zu können.

Abstract

According to the present legislation of the EU, the release of novel genome-edited organisms (nGMO) requires monitoring of potential adverse effects, to enable detection of and response to such effects on nature, environment and human health, serving as an early warning system and for the evaluation of potential cumulative long-term adverse effects on ecosystems. In this project, such monitoring instruments for new genome editing methods have to be developed for aquatic systems, which until now has been lacking.

In a first step, a literature research on new molecular biology techniques for modifying the genome applied to fish, microalgae, mosquitoes, and bacteria was conducted, to derive proposals of key species for each of the groups of organisms. Publications from the recent six years only were scanned for this purpose, because new gene editing techniques started to be applied frequently in the most recent past.

130, 157, 140 and 542 refereed publications were researched for mosquitoes, bacteria, microalgae and fish, respectively. In a next step, the references to the publications were transferred to a digital literature database (Citavi). Based on the evaluation of the publications and the summary of their main results in a literature review, nGM example species were selected, whose possible effects on the environment were examined in the further project.

The mosquito species *Anopheles gambiae* was selected as nGMO. For this species, applications of new molecular biology techniques for modifying the genome were most abundantly reported, and it is a principal vector of Malaria.

In addition, *Bacillus subtilis* modified with new molecular biology techniques was selected as nGMO, because of its ubiquitous incidence in terrestrial and limnetic systems and its frequent application as biological herbicide.

For microalgae, the species *Chlamydomonas reinhardtii* was selected as nGMO for limnetic systems, because it is the most frequently genetically edited microalgae species and the most promising for field application.

For fish, the limnetic species *Oncorhynchus mykiss*, abundant in mid-European waters, was selected as appropriate nGMO, because numerous and diverse studies have applied new molecular biology techniques for modifying the genome on it.

Four deterministic models of population dynamics and exposure of one nGMO each in aquatic ecosystems were developed on the basis of a literature review. Subsequently, the models were implemented numerically. A realistic reference scenario was calculated with each model. These scenarios deliver the following results: After a short spread of the nGMO variant, *Anopheles gambiae* almost dies out compared to the wild type. Their positions in the ecological system are occupied by a competing species, e.g. *Anopheles coluzzii*. The nGMO variant of *Bacillus subtilis* establishes itself very quickly compared to the wild type, which is dying out. Competing species are pushed back by allelopathy and due to lower fitness compared to the nGMO, but do not die out. The nGMO variant of *Chlamydomonas reinhardtii* establishes itself very quickly compared to the wild type, which is dying out. Competing species are pushed back by the nGMO due to their lower fitness compared to the nGMO, but do not die out. The nGMO variant of *Oncorhynchus mykiss* establishes itself very quickly compared to the wild type, which is dying out. The competing species, the brown trout, is also dying out very quickly due to its lower fitness compared to the nGMO.

Based on the reference scenarios, subsequently, local sensitivity analyses und scenario analyses were conducted with the numerical models. Results of these analyses highlight the need for a comprehensive monitoring, which not only focusses on novel molecular genetic biological detection methods, but also relies on the monitoring of physicochemical parameters and species groups of aquatic biota, which ecologically interact with the example species.

A survey of existing methods applied in the monitoring of limnetic waters was conducted. Temporal and spatial parameters, the methods applied, survey parameters, and the availability of data were documented. The directives and projects presented in this report give an overview of a number of existing monitoring instruments. In total, 98 monitoring instruments were found, which consist of federal, regional, and above-regional concepts. Of these, very few include novel molecular genetic biological detection methods.

The following criteria served to judge the potential of the established procedures to detect nGMO within ecological contexts: Representativity, sensitivity, precision, comparability, cost efficiency and environmental relevance. For the assessment, a five-step rating system was employed. Each monitoring procedure was rated applying a scale ranging from one to five scores. This scale was inspired by the assessment of water quality according to the Water Framework Directive (WFD).

Those monitoring concepts, which have been conducted within the frameworks of European directives, were found to be most representative and comparable and therefore, they fulfil best the criteria employed. Therefore, the monitoring programs according to the WFD are particularly suitable, such as the Monitoring of Water Quality of Surface Waters of Baden-Württemberg, Monitoring Programme Water Quality of Surface Waters of Bavaria, Monitoring Programme for Surveillance of Quality and Amount of Surface Waters and Groundwater of Mecklenburg-Vorpommern. All these monitoring instruments according to WFD are most eligible for a future monitoring of nGMO. However, they do not detect nGMO as such. Therefore, it is recommendable to combine these established monitoring instruments according to the WFD with novel molecular biological detection methods, which allow for surveillance of nGMO.

Finally, a survey of new monitoring methods, potentially applicable to monitoring the four-example species, was carried out. In a first instance, it was differentiated between novel molecular biological detection methods and all other innovative monitoring methods. The latter were further subdivided into remote sensing, optical and acoustical systems in combination with automatic classification, as well as the involvement of citizen science in the monitoring of aquatic systems.

The assessment of identified new methods was done using the following criteria: representativity, sensitivity, precision, comparability, surveillance of nGMO, measuring environmental exposition, surveillance of the establishment of nGMO in their environments, cost efficiency and environmental relevance. Again, like for the established monitoring instruments, a five-step rating scale was employed.

The rating of the new monitoring methods gave best ratings for the following methods: qPCR (bacteria, algae and fish) and Barcoding (mosquitoes). Non-molecular methods were rated lower than novel molecular biological detection methods when there are no morphological changes of the nGMO. Due to future developments in terms of frequency of use, advances in standardization or further development of methods, a shift in the relevance of novel molecular biological methods cannot be ruled out. The ratings for qPCR, barcoding,

metabarcoding and dPCR are very close to each other for all groups of organisms. It is also conceivable that isothermal amplification methods (such as LAMP or RPA) will become more relevant in the future and could be preferred, especially in the field of field experiments. However, based on the results of the evaluation, qPCR, barcoding, metabarcoding and dPCR can be highlighted as the most relevant novel molecular biological detection methods at present. It is important to note that none of the novel molecular biological detection methods allow the entire genome to be examined for unknown mutations. Such an analysis would currently only be possible through genome sequencing, which is very complex and expensive and cannot be implemented as part of extensive monitoring.

Molecular biological methods are necessary for nGMO monitoring if there are no phenotypic changes. The model results show that in future monitoring, in addition to the detection of nGMOs, it is important to detect wild type and competitor species. In addition, monitoring nutrients is important in order to investigate the ecological capacity, which has a high sensitivity in the models. The novel molecular biological detection methods are constantly being developed further, so that even higher levels of accuracy and greater cost efficiency can be expected in the near future. A shift in the relevance of the methods due to future developments cannot be ruled out. Based on the results of the evaluation, qPCR, barcoding, metabarcoding and dPCR can be identified as the most relevant novel molecular biological detection methods at present. Of the non-molecular biological methods, the most suitable is the integration of citizen science within the framework of the "Mosquito Atlas" as a supplement to existing monitoring programs and novel molecular biological methods. A connection of novel molecular biological detection methods to established monitoring programs according to the WFD is possible and desirable in order to minimize the additional logistical and financial effort and to be able to use the advantages of the established monitoring programs according to the WFD, such as high representativeness and environmental relevance.

1 Einleitung

Neue gentechnisch veränderte Organismen (nGVO) gelangen beabsichtigt oder unabsichtlich in die Umwelt. Ein Monitoring der Umweltwirkungen von nGVO gemäß Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG und der Verordnung für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel 1829/2003 ist erforderlich, wenn ein nGVO für kommerzielle Nutzungen zugelassen wird. Ein solches nGVO-Monitoring dient der Überprüfung der Ergebnisse der Umweltrisikobewertung und der Erfassung unvorhergesehener sowie kumulativer und langfristiger schädlicher Effekte auf die Umwelt.

Neue Gentechniken unterscheiden sich von den klassischen Methoden dadurch, dass gezielte Änderungen im Genom durchgeführt werden, z.B. werden Transgene gezielt an bestimmte Orte im Genom eingebracht, oder es werden Veränderungen einzelner DNA Basenpaare (single nucleotide variants, SNV) vorgenommen. Solche Innovationen (CRISPR/Cas) vereinfachen u. a. die Entwicklung von synthetischen Gene Drive Systemen, welche transgene Sequenzen und Eigenschaften enthalten, die sich wiederum in Populationen durch überproportionale Vererbung ausbreiten können.

In der Vergangenheit wurden Monitoringkonzepte und -methoden für gentechnisch veränderte Kulturpflanzen wie gv-Raps und gv-Mais entwickelt und veröffentlicht. Für Organismengruppen und Ökosysteme außerhalb des Agrarraumes sind die vorhandenen Methoden und Konzepte jedoch nur bedingt anwendbar. GVO in aquatischen Lebensräumen wurden bisher durch bestehende Monitoringkonzepte nicht behandelt. Auch die mit neuen molekularbiologischen Techniken zur Veränderung des Erbgutes veränderte Organismen standen dabei nicht im Fokus. Das Monitoring von nGVO und ihren systemischen Wirkungen in aquatischen Lebensräumen bedarf grundlegender Informationen über ökosystemare Zusammenhänge und Wirkungspfade. Bestandsaufnahmen bestehender Monitoringverfahren sind notwendig, um ihre Eignung für ein nGVO-Monitoring zu testen.

Obwohl die Einbeziehung bestehender Biodiversitätsmonitoringprogramme in das GVO-Monitoring auf nationaler Ebene wichtig ist, sind zusätzliche Monitoringaktivitäten erforderlich. Anhand von Fallbeispielen verdeutlichen Dolezel et al. (2024), dass sich die Monitoringanforderungen für neuartige GVO-Anwendungen von denen für gentechnisch veränderte Nutzpflanzen unterscheiden. Bisher entwickelte GVO-Monitoringkonzepte und -methoden befassen sich hauptsächlich mit potenziellen Auswirkungen in Agrarökosystemen und sind kaum auf limnische Ökosysteme anwendbar. Diese Autor*innen kommen zu dem Schluss, dass die Überwachung von nGVO die in einer Risikobewertung formulierten spezifischen Risikohypothesen und unerwartete und langfristige Auswirkungen berücksichtigen sollte. Darüber hinaus gibt es keine Erfahrungen mit der Integration von Daten aus dem bestehenden Biodiversitätsmonitoring in Monitoringkonzepte für nGVO. Daher ist die Eignung solcher routinemäßigen Monitoringprogramme für die nGVO-Überwachung im Einzelfall zu prüfen. Es ist notwendig, die bestehenden Monitoringkonzepte, -methoden und -programme zu untersuchen, um ihre Anwendbarkeit zur Erkennung potenzieller nachteiliger Auswirkungen auf die Umwelt zu bestimmen. Darüber hinaus müssen die spezifischen Monitoringdesigns, Indikatoren, Parameter und Methoden auf die GVO-Anwendung im Hinblick auf die spezifischen Expositionswege und potenziell betroffenen Lebensräume und Arten abgestimmt sein. Das Monitoring von Insektenvektorarten oder das Monitoring der aquatischen Biodiversität sind neuartige Anforderungen. Daher sind zusätzliche Monitoringaktivitäten, die diese spezifischen Aspekte neuartiger GVO-Anwendungen berücksichtigen, obligatorisch. Die Fähigkeit langlebiger Organismen wie

gentechnisch veränderter Süßwasserfische, in freier Wildbahn zu migrieren und sich zu vermehren, erfordert nicht nur eine räumliche, sondern auch eine zeitliche Ausweitung des Monitoringzeitraums. Dolezel et al. (2024) weisen darauf hin, dass bestehende landesweite Biodiversitätsmonitoringprogramme durch neuartige Nachweismethoden ergänzt werden müssen, um das zukünftige nGVO-Monitoring zu optimieren. Der Mangel an Vorhersagbarkeit und die daraus resultierenden Unsicherheiten hinsichtlich Persistenz und Ausbreitung erfordern die Entwicklung und Integration völlig neuer Monitoringmethoden.

Die Ziele des hier vorgestellten Projektes sind daher:

- Identifizierung relevanter Expositionspfade von nGVO und der besonders exponierten aquatischen Systeme anhand ausgewählter Organismengruppen,
- Identifizierung relevanter Wirkungszusammenhänge und Ökosystemfunktionen,
- Schaffung der Grundlagen für künftige Monitoringkonzepte inklusive geeigneter Beobachtungsorte und Indikatoren,
- Recherche bereits bestehender Beobachtungs-, Mess-, bzw. Kontrollsysteme im aquatischen Bereich und deren Prüfung auf ihre Eignung für ein nGVO-Monitoring,
- Recherche neuer Methoden im aquatischen Bereich und Analyse ihres Potentials für ein nGVO-Monitoring.

Hierzu wurde in einem ersten Schritt eine Literatursuche zu neuen molekularbiologischen Techniken zur Veränderung des Erbgutes in Anwendung bei Mikroalgen, Mücken, Bakterien und Fischen durchgeführt, um daraus für jede Organismengruppe Vorschläge für je einen nGVO abzuleiten. Darauf aufbauend wurden für jede der ausgewählten Beispielarten Modi der Ausbreitung und Etablierung, der Vermehrung, Auskreuzung und Persistenz in den jeweiligen Lebensräumen recherchiert. Aufbauend auf den Expositionspfaden wurden für die ausgewählten nGVO-Effekte auf kausale Vorgänge in aquatischen Ökosystemen herausgearbeitet, die in mathematischen und numerischen Modellen beschrieben wurden. Anhand von Simulationen mit den numerischen Modellen konnten Beispielorganismen und -prozesse identifiziert werden.

2 Expositionspfade von nGVO in Süßwasserökosystemen

2.1 Methodik

2.1.1 Literaturrecherche

Die Literaturrecherche zu durch neue genom-editierende Techniken erzeugte Organismengruppen der Fische, Mikroalgen, Mücken und Bakterien erfolgte 2023, „Science Direct“ und „Google Scholar“ wurden als Suchmaschinen im Internet verwendet. Es erfolgte eine Beschränkung auf Veröffentlichungen aus den letzten sechs Jahren, da erst in der jüngsten Vergangenheit neue Gentechniken verbreitet zur Anwendung gekommen sind. Generell wurden Volltextsuchen durchgeführt. Bei der Literatursuche wurde eine Vorauswahl aus den von den Suchmaschinen vorgeschlagenen Publikationen vorgenommen, d. h. es wurden nur solche Publikationen weiter betrachtet, aus deren Titel eindeutig hervorging, dass sie sich mit der Editierung des Genoms einer Art aus den vier betrachteten Artengruppen beschäftigen. Publikationen, die sich z. B. nur mit Sequenzierung des jeweiligen Genoms, mit Arten aus anderen Artengruppen, oder mit anderen Fragestellungen z. B. epidemiologischer oder ökonomischer Art, etc. beschäftigen, wurden nicht weiter berücksichtigt.

Bei der Recherche kamen folgende Kombinationen von Suchbegriffen zum Einsatz:

- mosquito* + CRISPR + engineering,
- mosquito* + RNAi,
- mosquito* + ODM,
- mosquito* + ZFN,
- mosquito* + TALEN,
- mosquito* + CRISPR + ecolog*,
- mosquito* + gene drive,
- bacteria + CRISPR + engineering,
- bacteria + RNAi,
- bacteria + ODM,
- bacteria + ZFN,
- bacteria + TALEN,
- bacteria + CRISPR + ecolog*,
- bacteria + gen* editing,
- microalgae + gene editing,
- microalgae + CRISPR,
- microalgae + RNAi,
- microalgae + ZFN,
- microalgae + TALEN.

Die Auswahl der Themenfelder erfolgte nach Abschluss der Recherche und orientierte sich an den Inhalten der Publikationen. Die Fülle an Literatur zur Anwendung von gene editing-Techniken in Fischen stellte sich im Laufe der Recherchearbeit als immens heraus. Aufgrund dessen wurde hier abweichend zu den anderen Organismengruppen vorgegangen. Es wurde zuerst der Suchbegriff gene editing + fish verwendet und alle relevanten Publikationen zusammengetragen. Durch die Suche erhielten wir 406 Publikationen, die sich mit dem gene editing in Fischen beschäftigen (Tab. 1). Anschließend selektierten wir nach Arten, die in Deutschland vorkommen und somit relevant für die Auswahl einer Beispielart sind. Entsprechende Arten werden in der Tabelle als fettgedruckt dargestellt. Für diese Arten weiteten wir die Suche mit folgenden Suchbegriffen aus:

- CRISPR + Artenname
- TALEN + Artenname
- ZFN + Artenname
- RNAi + Artenname

Tab. 1: Suchergebnisse zu den Fischen vor und nach der detaillierten Suche. Arten, für die eine detaillierte Suche vorgenommen wurde, werden fettgedruckt dargestellt.

Art	Publikationen vor detaillierter Recherche	Publikationen nach detaillierter Recherche
<i>Acipenser ruthenus</i>	2	3
<i>Amphilophus sp.</i>	1	1
<i>Amphiprion ocellaris</i>	1	1
<i>Astatotilapia burtoni</i>	2	2
<i>Astatotilapia calliptera</i>	1	1
<i>Astyanax mexicanus</i>	8	8
<i>Betta splendens</i>	2	2
<i>Brienomyrus sp.</i>	1	1
<i>Carassius auratus cuvieri</i>	1	2
<i>Carassius gibelio</i>	2	4
<i>Channa maculata</i>	0	1
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	1	45
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	2	3
<i>Cyprinus carpio</i>	2	5
<i>Cyprinus carpio haematopterus</i>	0	1
<i>Cyprinus carpio var. color</i>	1	7
<i>Danio rerio</i>	161	164

Art	Publikationen vor detaillierter Recherche	Publikationen nach detaillierter Recherche
<i>Danionella translucida</i>	1	1
<i>Electrophorus electricus</i>	1	1
<i>Engraulis japonicus</i>	1	1
<i>Epinephelus coioides</i>	0	2
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	2	2
<i>Gobiocypris rarus</i>	1	3
<i>Ictalurus punctatus</i>	9	16
<i>Labeo rohita</i>	2	2
<i>Larimichthys crocea</i>	0	1
<i>Lateolabrax japonicus</i>	0	1
<i>Lutjanus guttatus</i>	0	1
<i>Megalobrama amblycephala</i>	1	1
<i>Miichthys miiuy</i>	2	2
<i>Monopterus albus</i>	2	2
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	3	12
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	3	3
<i>Oreochromis mossambicus</i>	2	4
<i>Oreochromis niloticus</i>	7	11
<i>Oryzias latipes</i>	31	40
<i>Oryzias melastigma</i>	1	1
<i>Oryzias woworae</i>	1	1
<i>Pagrus major</i>	4	5
<i>Paralichthys olivaceus</i>	5	6
<i>Paramisgurnus dabryanus</i>	1	1
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	3	5
<i>Pimephales promelas</i>	2	2
<i>Plecoglossus altivelis</i>	1	5
<i>Salmo salar</i>	9	13
<i>Salmo trutta</i>	0	1
<i>Tachysurus fulvidraco</i>	0	1

Art	Publikationen vor detaillierter Recherche	Publikationen nach detaillierter Recherche
<i>Takifugu alboplumbeus</i>	1	1
<i>Takifugu bimaculatus</i>	0	1
<i>Takifugu rubripes</i>	2	2
<i>Thunnus orientalis</i>	1	1
<i>Tilapia</i>	3	6
Reviews	116	133
Gesamt	406	542

Die Auswahl der Themenfelder für Fische erfolgte nach Abschluss der Recherche und orientierte sich an den Inhalten der Publikationen.

Für Mücken, Bakterien, Algen und Fische wurden 130 bzw. 157, 140 und 542 referierte Publikationen ausgewählt und aus dem Internet als pdf-Dateien heruntergeladen. In einem nächsten Schritt wurden die Referenzen zu den Publikationen in eine digitale Literaturdatenbank überführt. Anschließend erfolgten die Auswertung der Publikationen und die Zusammenfassung ihrer wesentlichen Ergebnisse in einem Literaturreview. Publikationen, die sich ausschließlich mit der Analyse des Genoms von nGVO und nicht mit dessen Editierung beschäftigen, wurden hierbei nicht berücksichtigt. Zahlreiche Review-Artikel wurden ebenfalls nicht berücksichtigt, da sie zum großen Teil sich wiederholende, redundante Informationen enthielten. Abb. 1 fasst die Vorgehensweise der Literatursuche zusammen.

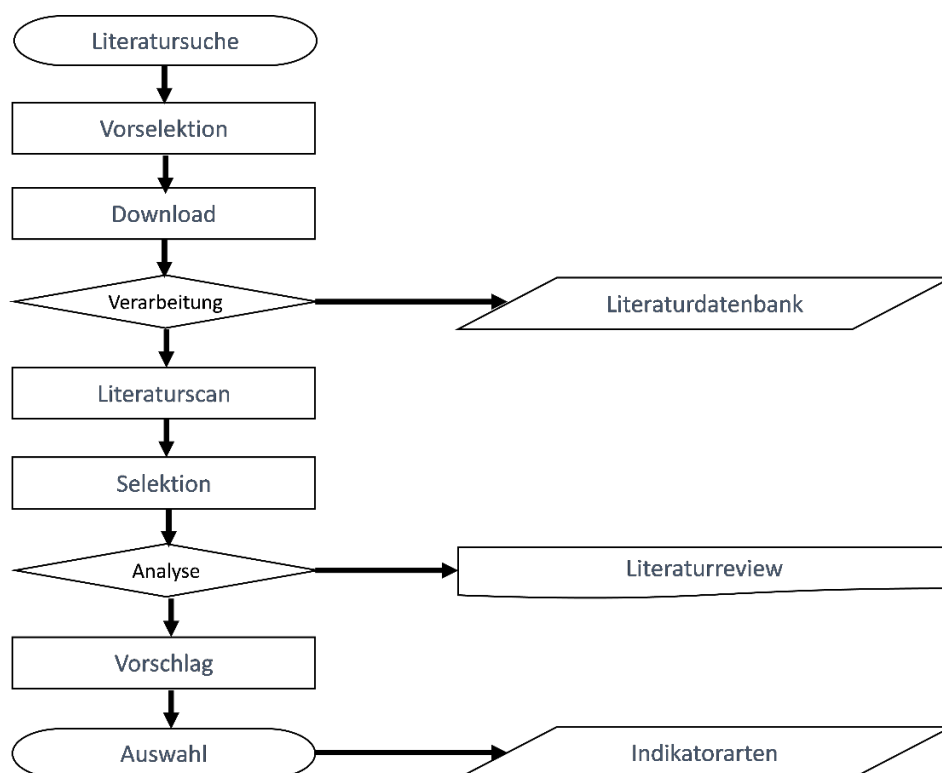


Abb. 1: Flussdiagramm zur Beschreibung der Vorgehensweise bei der Literaturrecherche.

Zur Eruierung der Ausbreitung, Etablierung, Vermehrung, Auskreuzung und Persistenz sowie der Populations- und Ausbreitungsdynamik der vier ausgewählten nGVO war es notwendig, eine weitere ergänzende Literaturrecherche durchzuführen. Es wurde dabei so vorgegangen wie bei der initialen Recherche (Abb. 1). Für den nGVO *Anopheles gambiae* wurden folgende Suchbegriffe verwendet:

- *Anopheles gambiae* + ecology,
- *Anopheles gambiae* + ecosystem,
- *Anopheles gambiae* + exposure,
- *Anopheles gambiae* + ecology + gene editing,
- *Anopheles gambiae* + ecology + genome editing,
- *Anopheles gambiae* + ecosystem + gene editing,
- *Anopheles gambiae* + ecosystem + genome editing,
- *Anopheles gambiae* + exposure + gene editing,
- *Anopheles gambiae* + exposure + genome editing,
- *Anopheles gambiae* + risk + gene editing,
- *Anopheles gambiae* + risk + genome editing,
- *Anopheles gambiae* + risk + ecology,
- *Anopheles gambiae* + risk + ecosystem.

Es wurden für *Bacillus subtilis* folgende Suchbegriffe verwendet:

- *Bacillus subtilis* + ecology,
- *Bacillus subtilis* + ecosystem,
- *Bacillus subtilis* + exposure,
- *Bacillus subtilis* + ecology + gene editing,
- *Bacillus subtilis* + ecology + genome editing,
- *Bacillus subtilis* + ecosystem + gene editing,
- *Bacillus subtilis* + ecosystem + genome editing,
- *Bacillus subtilis* + exposure + gene editing,
- *Bacillus subtilis* + exposure + genome editing,
- *Bacillus subtilis* + risk + gene editing,
- *Bacillus subtilis* + risk + genome editing,
- *Bacillus subtilis* + risk + ecology,
- *Bacillus subtilis* + risk + ecosystem.

Für *Chlamydomonas reinhardtii* wurden folgende Suchbegriffe verwendet:

- *Chlamydomonas reinhardtii* + ecology,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + ecosystem,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + exposure,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + ecology + gene editing,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + ecology + genome editing,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + ecosystem + gene editing,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + ecosystem + genome editing,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + exposure + gene editing,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + exposure + genome editing,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + risk + gene editing,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + risk + genome editing,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + risk + ecology,
- *Chlamydomonas reinhardtii* + risk + ecosystem.

Für *Oncorhynchus mykiss* wurden folgende Suchbegriffe verwendet:

- *Oncorhynchus mykiss* + ecology,
- *Oncorhynchus mykiss* + ecosystem,
- *Oncorhynchus mykiss* + exposure,
- *Oncorhynchus mykiss* + ecology + gene editing,
- *Oncorhynchus mykiss* + ecology + genome editing,
- *Oncorhynchus mykiss* + ecosystem + gene editing,
- *Oncorhynchus mykiss* + ecosystem + genome editing,
- *Oncorhynchus mykiss* + exposure + gene editing,
- *Oncorhynchus mykiss* + exposure + genome editing,
- *Oncorhynchus mykiss* + risk + gene editing,
- *Oncorhynchus mykiss* + risk + genome editing,
- *Oncorhynchus mykiss* + risk + ecology,
- *Oncorhynchus mykiss* + risk + ecosystem.

Für *Anopheles gambiae* wurden 76 Publikationen aus dem Internet heruntergeladen, für *Bacillus subtilis* 13 Publikationen, für *Chlamydomonas reinhardtii* 11 Publikationen und für *Oncorhynchus mykiss* 15 Publikationen. Nach weiterer Prüfung dieser Publikationen ergab sich, dass nur sehr wenige hiervon relevante Ergebnisse für die Ermittlung kausaler populationsgenetischer und ökologischer Zusammenhänge beinhalteten.

2.1.2 Modellierung

Auf der Basis der Literaturrecherche und von Expertenwissen wurde für jeden nGVO ein Wortmodell entwickelt. Die Wortmodelle dienten in einem nächsten Schritt der Entwicklung von Wirkungsgraphen. Auf der Basis der Wortmodelle und der Wirkungsgraphen wurde für jeden nGVO je ein mathematisches Differentialgleichungsmodell hergeleitet. Es war notwendig, unterschiedliche Modelle zu entwickeln, da die vier nGVO in den jeweiligen Nahrungsnetzen Positionen auf unterschiedlichen trophischen Ebenen einnehmen. Die sehr einfachen Modelle umfassten vier bis fünf gewöhnliche Differentialgleichungen und ebenso viele Zustandsgrößen. Eine Herleitung komplexerer Modelle hätte dazu geführt, dass es bezüglich der stabilen stationären Attraktoren nur jeweils eine triviale Lösung gegeben hätte, d. h. sämtliche Koordinaten der Attraktoren wären gleich Null gewesen. Numerische Simulationen, die auf solchen komplexen Modellen beruht hätten, wären demzufolge nicht realistisch gewesen, und weiterhin hätten sich Szenarien- und Sensitivitätsanalysen erübrigt.

Die vier mathematischen Modelle wurden numerisch mit der lizenzfreien Software Dynasys (Version 2.0.2, Hupfeld Software) mit dem numerischen Verfahren Runge-Kutta mit variabler Schrittweite implementiert. Abschließend erfolgten die Parametrisierungen für je ein realistisches Referenzszenario. Es wurde für jeden nGVO je ein Referenzszenario gerechnet.

Mit nachfolgenden Szenarienanalysen der numerischen Modelle werden verschiedene Varianten der Entwicklung der Zustandsgrößen herausgestellt. Abschließende lokale Sensitivitätsanalysen der implementierten Parameter und der Anfangsbedingungen werden der Quantifizierung der Unsicherheiten der Modelle dienen.

2.2 Allgemeines Literaturreview zu nGVO

2.2.1 Gentechnisch veränderte Mücken

Die Familie der Mücken (Culicidae) umfasst mehr als 3500 beschriebene Arten, die in zwei Hauptunterfamilien gruppiert sind, welche wiederum aus vielen verschiedenen Gattungen bestehen. Die Unterfamilie Anophelinae umfasst die Anopheles-Gattung, zu der viele Malaria-Vektoren, einschließlich *Anopheles gambiae*, gehören. Die Unterfamilie Culicinae umfasst andere medizinisch wichtige Gattungen wie *Aedes* und *Culex*. *Aedes aegypti* ist ein wichtiger arboviraler Vektor, während *Culex quinquefasciatus* ein Überträger von West-Nil- und anderen Enzephalitisviren sowie lymphatischen Viren ist. Das Darmmikrobiom von *Culex quinquefasciatus* reagiert dynamisch auf den Wechsel zwischen Nahrungsquellen. Dadurch werden wiederum ihre Makronährstoffspeicher und ihre Fortpflanzung beeinflusst (Telang und Skinner, 2019). Die häufigsten in Deutschland heimischen Mücken sind *Culex pipiens*, *Culiseta annulata* und *Aedes vexans*. Weiterhin gibt es in Deutschland ca. 190 heimische Gniten (Ceratopogonidae) und mehr als 50 Kriebelmückenarten (Simuliidae).

Die Brutstätten von Mückenarten umfassen vorwiegend permanente und temporäre stehende Gewässer. Es ist hierbei zu unterscheiden zwischen künstlichen Gewässern wie gestapelte (Alt)Reifen, Gräben und Ansammlungen von Wasser in künstlichen Hohlformen jeglicher Art einerseits und natürlichen Gewässern wie Sümpfen und Seen andererseits. Es reichen kleinste Wasseransammlungen. Die Arten unterscheiden sich bezüglich Brutverhalten, Beißverhalten, Flugreichweite, etc. Mücken legen bei Nacht im Allgemeinen 100-150 Eier zusammenhängend in einem einzigen Floß auf einer Wasseroberfläche ab. Die Eier haben eine charakteristische Zigarrenform und messen ca. 1 mm. Mückenlarven ernähren sich von Schwebstoffen im Wasser. Eine Larve durchläuft vier Stadien und ein Puppenstadium und entwickelt

sich innerhalb von 2 bis 4 Tagen zur erwachsenen Mücke. Der Körper der erwachsenen Mücke ist dünn, mit Haut bedeckt, länglich und hat Poren. Die Antennen der Männchen sind buschiger als die der Weibchen. Weibliche Mücken werden von Wirtstieren angezogen, indem sie Feuchtigkeit, Milchsäure, Kohlendioxid und Körperwärme oder ein Protein wahrnehmen. Meistens ernähren sich Mücken in der Morgen- und Abenddämmerung, während einige aggressive Mückenarten sich ganztags ernähren. Sie saugen Blut überstechende Mundwerkzeuge (Rüssel), die aus 6 verschiedenen Nadeln bestehen. Die ersten beiden Nadeln fungieren als Zähne, das zweite Paar fungiert als Klemmen und die letzten beiden Nadeln spritzen gerinnungshemmende Substanzen in Blutgefäße, um den Blutfluss anzuregen, während eine von diesen beiden Nadeln das Blut aus dem Körper saugt. Während dieses Prozesses überträgt die Mücke Viren und andere pathogene Keime. Die WHO definierte Mücken als für Menschen sehr gefährliche Tiere. Daher ist eine nachhaltige Mückenbekämpfung von großer Bedeutung, um Ausbrüche von Krankheiten zu verhindern (Hillary und Ceasar, 2021). Weiterhin wurde die Hybridisierung von verschiedenen Mückenarten beobachtet, wenn sich die Verbreitungsgebiete überschneiden (Caputo et al., 2022). Dadurch wird u.a. die genetische Plastizität von Mücken deutlich.

Alle bisher untersuchten Mücken haben drei Chromosomenpaare. Anopheles-Mücken enthalten zwei Paare von Autosomen und ein Paar gut differenzierter Geschlechtschromosomen, X und Y, wobei Männchen das heterogametische Geschlecht sind. *Aedes*- und *Culex*-Mücken haben ein Paar homomorphe geschlechtsbestimmende Chromosomen, die zytologisch nicht unterscheidbar sind. Bei Männchen, die ebenfalls das heterogametische Geschlecht sind, hat eines der Paare einen männlich bestimmenden Locus (der M-Locus), während das andere einen m-Locus hat. Ein dominanter männlicher Bestimmungsfaktor (M-Faktor), der sich entweder auf dem Y-Chromosom in Anophelinae-Mücken oder im M-Locus in Culicinae-Mücken befindet, ist der Hauptschalter für die Geschlechtsbestimmung (Kojin et al., 2022).

Gentechnische Veränderungen der Sexualchromosomen gehen oft einher mit morphologischen Veränderungen des Phänotyps. Hoy (2019a) beschreibt in einem Review-Artikel, wie Embryonen von *Aedes aegypti* mit einem TALEN-Konstrukt behandelt wurden, das auf ein Gen für die Augenpigmentierung abzielte. Überlebende der Injektion hatten zu einem großen Teil (20-40 %) weiße Augen. Da die Augenfarbe als Selektionsmechanismus genutzt wird, hat diese Arbeit sowohl geschlechtsspezifische als auch morphologische Aspekte. Daher können häufig Publikationen nicht eindeutig einem Themenschwerpunkt zugeordnet werden. In den folgenden Kapiteln wird gleichwohl eine Gliederung nach Themen vorgenommen. Die Themen ergeben sich aus den Publikationen und somit aus dem aktuellen Stand der Forschung. Es wird unterschieden nach Geschlechtsmanipulationen, gentechnischen Veränderungen, die wie biologische Insektizide wirken, Änderungen des Geruchssinns und weiteren morphologischen Veränderungen. Ein letztes Unterkapitel beschäftigt sich mit Modellen und Risiken.

2.2.1.1 Geschlechtsspezifische Genmanipulationen

Aedes aegypti ist ein Hauptvektor für mehrere Viren, einschließlich des Dengue-Virus, des Chikungunya-Virus und des Zika-Virus. Wirtschaftliche Schäden durch Stechmücken entstanden durch die übertragenen Krankheiten, ein Versagen traditioneller Bekämpfungsstrategien und Resistenzentwicklungen gegen Insektizide. In den letzten Jahren wurden genetische Manipulationen von *Aedes aegypti* und anderen Mückenarten eingesetzt, um die übertragenen Krankheiten zu bekämpfen. Ein Schlüsselpunkt ist hierbei das Doublesex-Gen *Aedsex*, das die Geschlechtsdifferenzierung reguliert. Männliche und weibliche Mücken besitzen spezifische Transkripte (*AedsexM* und *AedsexF*). Bei genetischen Manipulationen kam die CRISPR/Cas9-

Technik zum Einsatz. Als Ergebnisse traten in der Entwicklungsphase phänotypische Anomalien erwachsener Weibchen auf. Diese Befunde korrelierten mit einer reduzierten Fruchtbarkeitsrate von nGV-Weibchen, wobei die AedsxF1- und AedsxF2-Gruppen um 23–31 % abnahmen. Darüber hinaus wurde auch bei der G1-Generation eine Schlupfhemmungsrate von 28 bis 36 % im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass die Störung von AedsxF zu einer Reduktion weiblicher Merkmale, einschließlich einer verringerten Fruchtbarkeit der Weibchen führte (Ranian et al., 2022).

Hammond et al. (2021) berichteten über die unterdrückende Aktivität des Gene-Drive in altersstrukturierten *Anopheles gambiae* -Populationen in großen Innenkäfigen, die ein komplexes Fress- und Fortpflanzungsverhalten ermöglichen. Das Gene-Drive-Element breitete sich schnell durch die Populationen aus, unterdrückte die Population innerhalb eines Jahres vollständig ohne Selektion auf Resistenz gegen das Gene-Drive. Eine Bayes'sche Berechnung ermöglichte die retrospektive Ableitung von lebensgeschichtlichen Parametern und eine genaue Vorhersage des Gene-Drive-Verhaltens unter ökologisch relevanteren Bedingungen.

Adolfi et al. (2020) entwickelten ein umcodiertes Gene-Drive-Rescue-System zur Populationsmodifikation des Malaria-Vektors *Anopheles stephensi*. Nicht-funktionale resistente Allele wurden über einen dominant wirkenden maternalen Effekt in Kombination mit einer langsamer wirkenden Standard-Negativselektion eliminiert. Versuche in kleinen Käfigen zeigten, dass einzelne Freisetzungen von Gene-Drive-Männchen zu einer effizienten Populationsmodifikation führen, wobei ≥ 95 % der Moskitos das Gene Drive innerhalb von 5-11 Generationen tragen.

Hörmann et al. (2022) erweiterten ein Mitteldarm-Gen der Malariamücke *Anopheles gambiae*, um zwei exogene antimikrobielle Peptide, Magainin 2 und Melittin, zu sezernieren. Diese kleine genetische Modifikation, die zu einem effizienten nichtautonomen Gene Drive fähig ist, behinderte die Oozystenentwicklung sowohl bei *Plasmodium falciparum* als auch bei *Plasmodium berghei*. Es verzögerte die Freisetzung infektiöser Sporozoiten, während es gleichzeitig die Lebensdauer von homozygoten weiblichen transgenen Mücken verkürzte.

Das anfängliche Signal, das die Geschlechtsentwicklung bestimmt, ist bei Insekten sehr unterschiedlich. Ein Homolog von Nix, dem männlichen bestimmenden Faktor in *Aedes aegypti*, wurde zuvor in der asiatischen Tigermücke *Aedes albopictus* gefunden. CRISPR/Cas9-vermittelte Knockouts von Nix-Genen führten zu einer Feminisierung und zu Missbildungen bei *Aedes albopictus*-Männchen (P. Liu et al., 2020b).

Kistler et al. (2015) beschreiben die Verwendung des CRISPR/Cas9 zur Generierung ortsspezifischer Mutationen in Geschlechtsgenen von *Aedes aegypti*. Diese Autor*innen untersuchten die Effizienz von verschiedenen Zusammensetzungen von Injektionsmischungen. Sie berichten von stabilen Keimbahn-Mutationen in mehreren genomischen Loci.

Li et al. (2021a) entwickelten ein Protokoll zur Genmanipulation bei *Aedes aegypti* mit Fluoreszenz-Markierungsinsertion, welches die Generierung und das Screening von mutierten Mücken erleichtert. Diese Autor*innen beschreiben optimierte Methoden für die Single-RNA-Plasmid-Präparation, die homologe Rekombinations-Donor-Plasmid-Konstruktion, die Embryo-Mikroinjektion und eine präzise Gen-Knock-in-Bestätigung. Sie geben eine allgemeine Anleitung für die Etablierung mutanter Mückenlinien.

RNAi-vermitteltes Ausschalten von Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (GGT) und Methylthioribulose1-Phosphat-Dehydratase (MtnB) führten zu signifikant erhöhter Sterblichkeit

weiblicher *Aedes*-Mücken und hatten außerdem Auswirkungen auf das Überleben und die Fitness männlicher Individuen (Kojin et al., 2022). Die verwendete CRISPR/Cas9-Methode war erfolgreich, weibliche Individuen zu sterilisieren und zu töten.

Die Entwicklung von *Plasmodium falciparum* ist eng, aber nicht konkurrierend mit der Reproduktion von *Anopheles gambiae* verbunden. Genmanipulationen an den Parasiten zeigten, dass *P. falciparum* eine evolutionäre Ressourcenstrategie entwickelt hat, welche die eigene Vermehrung optimiert bei gleichzeitiger Minimierung der Fitnesskosten für seinen Mückenvektor (Werling et al., 2019).

RNAi-Manipulationen am Genom der Mücke *Culex pipiens* ergaben, dass die Genese von Oxidoreductin, einem Protein, das die Diapause reguliert, bei Weibchen in der Diapause mehr als doppelt so hoch war als bei aktiven Mücken (King, 2020). Bei einem Knock-out des Gens, das ein Oxidoreductin-ähnliches Protein kodiert, nahm der Anteil degenerierter Follikel bei erwachsenen Weibchen im Frühstadium der Diapause signifikant zu.

2.2.1.2 Biologische Insektizide

Gentechnische Veränderungen als metabolische Insektizide gegen Mückenpopulationen haben in den letzten fünf bis zehn Jahren durch neue Methoden wie CRISPR/Cas große Fortschritte gemacht (Vontas et al., 2020). Dabei bleibt ein möglicher Einsatz nicht auf tropische Gebiete beschränkt (Porretta et al., 2019) und kann auch zum Schutz seltener Tierarten erfolgen (Samuel et al., 2020). Dabei wurde in der jüngsten Vergangenheit die Wolbachia-Moskito-Beziehung zur Kontrolle der Übertragung von Arboviren ausgenutzt (Caragata et al., 2021).

Es werden bestimmte Virengruppen wie Densoviren (Johnson und Rasgon, 2018) als Vektoren für gezielte Genmanipulationen in Mücken diskutiert (Patterson et al., 2020). Symbiontische Beziehungen zwischen Bakterien und Mücken können im Kontext der Bekämpfung von Mückenpopulationen mit neuen gentechnischen Methoden genutzt werden (Elston et al., 2022). In der jüngsten Vergangenheit hat sich die Verwendung von Endonukleasen bei gezielten Mutationen etabliert (Gantz und Akbari, 2018).

Aryan et al. (2014) stellen neue Entwicklungen von TALENs-Methoden vor, welche die Veränderung der Genfunktionen von Mücken zum Ziel haben: Diese Autor*innen beschreiben die Zielortauswahl, transiente Embryo-basierte Assays zur schnellen Beurteilung der TALEN-Aktivität, embryonale Mikroinjektion und nachgelagerte Screening-Schritte zur Identifizierung von Mutationen an der Zielstelle.

Wiltshire und Duman-Scheel (2020) geben einen Überblick über Fortschritte bei der oralen Verabreichung mikrobieller Systeme bei Mücken. Orale RNAi-basierte Insektizide stellen eine neue Klasse von Pestiziden dar, welche artspezifisch wirken. Nachteilig könnte bei dem Einsatz neuartiger Methoden, die mitunter auf CRISPR/Cas beruhen, die Entwicklung von Resistenzen sein.

Ein neuer Ansatz zur Bekämpfung von Mücken als Krankheitsvektoren (ReMOT Control = Receptor-mediated Ovary Transduction of Cargo) stellt eine Technologie dar, die den Transport des Cas9-Proteinkomplexes in die Eierstöcke der erwachsenen Mücke ermöglicht und die gezielte und vererbare Mutationen in *Anopheles stephensi* ohne Embryoinjektion generiert (Nweke und Thimiri Govinda Raj, 2021).

In einer Laborstudie untersuchten Bottino-Rojas et al. (2022) die Augenpigmentierung von *Aedes*-Mücken in Zusammenhang mit der Synthese von Tryptophan. Gezielte Mutationen

wiesen über Änderungen in der Tryptophan-Synthese eine Schwächung des Immunsystems auf, worauf eine gezielte Bekämpfung von Mücken als Krankheitsvektoren aufbauen könnte.

Bish et al. (2021) untersuchten Möglichkeiten, Sandmücken als Vektoren von Leishmaniose zu bekämpfen. Diese Autor*innen etablierten ein Verfahren zur Mikroinjektion in Eier der Sandmücke *L. longipalpis*, das die Möglichkeit bietet, gentechnisch veränderte Mücken mit CRISPR-Cas9 zu erzeugen. Andere Pfade der gezielten Genübertragung sind die Injektion von sgRNA/Cas-Riboprotein-Komplexen in den Unterleib weiblicher Mücken (Gudmunds et al., 2022).

Saurabh und Prasad (2021) heben die Möglichkeiten von RNAi-Werkzeugen zur Bekämpfung von Mückenpopulationen hervor. Es werden in dieser Publikation RNAi-Verfahren diskutiert, die verschiedene Entwicklungsstadien von Insekten zum Ziel haben. In diesem Zusammenhang weisen Le Roux (2022) und Schowalter (2022) auf die Möglichkeiten von RNSi-Methoden hin, invasive Arten zu bekämpfen.

Hapairai et al. (2020) stellen die Charakterisierung eines interferierenden RNA-Pestizids vor, das auf das in Mückengenomen kodierte Dopamin 1 abzielt. Eine kleine interferierende RNA tötete *Aedes aegypti* sowohl im Erwachsenen- als auch im Larvenstadium. Die Gen-Sequenz, auf die dieses Pestizid abzielt, ist in mehreren Mückenarten enthalten.

Li et al. (2020a) entwickelten mit CRISPR/Cas9 einen Mutanten von *Aedes aegypti* zur Untersuchung der Immunantworten auf arbovirale Infektionen und der Fortpflanzung. Die Mutanten zeigten eine signifikant reduzierte Infektionsrate. Sie hatten andererseits eine deutlich kürzere Lebensdauer als Kontrolltiere und legten weniger Eier.

Moskito-Hämozyten können auch durch von Arthropoden übertragene Viren infiziert werden. Pondeville et al. (2020) untersuchten die Pathogeninfektion bei *Anopheles gambiae*, den spezifischen Beitrag von Hämozyten zu Immunantworten und die Hämozyten-spezifischen Funktionen von Immunogenen und Signalwegen.

Bakterielle insektizide Proteine, die gentechnisch produziert werden, könnten umfassend zur Bekämpfung insektizidresistenter Mücken verwendet werden. Eine Studie von Riaz et al. (2020) zielte auf die Identifizierung von Mückenzellproteinen ab, welche das Bin-Toxin binden. Die Ergebnisse zeigten, dass gereinigtes Toxin für Larven von *Anopheles gambiae* toxisch war.

Jedoch ist die transgene In-vivo-Analyse in *Anopheles gambiae* durch das Fehlen von Promotoren begrenzt. Um dieses Problem anzugehen, verwendeten Adolphi et al. (2018) das GAL4/UAS-System, um den Promotor des Polyubiquitin-c (PUBc)-Gens in *Anopheles gambiae* zu untersuchen. Es konnte die Fähigkeit des Promoters demonstriert werden, die Expression in Mückenzellkulturen voranzutreiben.

Eine mögliche Anwendung zur Bekämpfung der Übertragung von Malaria durch *Anopheles*-Mücken ist, ein Gen zu implementieren, das Resistenz gegen Malariaparasiten verleiht. Macias et al. (2017) haben solche synthetischen Genkonstrukte entwickelt, jedoch bewerteten sie die Aussichten, Immunität in einer Wildpopulation langfristig zu etablieren, als gering.

Endogene virale Elemente (EVEs) sind virale Sequenzen, die in Wirtsgenome integriert sind. Eine große Anzahl von nichtretroviralen EVEs wurde kürzlich in *Aedes*-Mückengenomen nachgewiesen, was zu der Hypothese führte, dass Mücken exogene Infektionen durch eng verwandte Viren kontrollieren können. Suzuki et al. (2020) haben das experimentell untersucht: Mithilfe von CRISPR-Cas9-Genombearbeitung wurde eine *Aedes aegypti*-Linie erstellt, welcher

ein bestimmtes EVE fehlte. Das Fehlen des EVE führte zu einer erhöhten CFAV (Cell-Fusing-Agent-Virus)-Replikation in den Eierstöcken.

Nach der Blutmahlzeit wird bei weiblichen Individuen von *Aedes aegypti* die starke Anziehung zum Menschen tagelang unterdrückt. Duvall et al. (2019) untersuchten die Wirkungsweise von sechs Substanzen, welche die Anziehungskraft bei Mücken hemmen. CRISPR-Cas9-veränderte Nullmutanten waren resistent gegen diese Substanzen, wodurch ein weiterer Weg aufgezeigt wird, wie das Stechverhalten von Mücken beeinflusst werden kann.

Yan et al. (2020) untersuchten die Aufnahme von Insektiziden der Klasse der Pyrethroide durch gezielte mehrfache Mutationen bei *Aedes aegypti*, welche die Aufnahme der Insektizide über Natrium-Kanäle veränderten. Die Sensitivitäten gegenüber dem Insektizid variierten zwischen den verschiedenen Mutationen erheblich. Die Ergebnisse dieser Studie helfen bei der Entwicklung molekularer Marker zur Überwachung der Resistenz von Mücken gegenüber Pyrethroiden.

Merkling et al. (2020) schalteten ein Tudor-Gen in *Aedes aegypti* aus, das die Immunantwort auf virale Infektionen regelt. Sie beobachteten eine Reduktion der Replikation des Dengue-Virus in *Aedes aegypti*-Weibchen. Die Ergebnisse dieser Autor*innen zeigen die provirale Rolle des Gens in der frühen Phase einer Dengue-Virusinfektion von *Aedes aegypti*.

Schwermetallresistenzen bei Mücken der Art *Anopheles gambiae* gehen zu Lasten der allgemeinen Fitness der angepassten Individuen (Rono et al., 2019). Diese Autor*innen diskutieren hierbei die Rolle der Induktion spezifischer Schwermetall-responsiver Transkripte und Proteine, welche potentielle Angriffspunkte von gezielten Mutationen sein können.

Mit Hilfe einer RNAi-Methode untersuchten Rozen-Gagnon et al. (2021) die Rolle kleiner RNA-Netzwerke im Genom von *Aedes aegypti*, worin endogene virale RNA enthalten war. Die Unterdrückung der Expression dieser Gensequenzen durch bestimmte Proteine war nicht ortsspezifisch. Die Entwicklung antiviraler Wirkstoffe kann von diesen Ergebnissen profitieren.

Wamba et al. (2021) fanden, dass das Cytochrom CYP325A in Pyrethroid-resistenten Stämmen von *Anopheles funestus* stark überexprimiert wird. Ein Stamm von *Anopheles funestus* aus Kamerun wurde hierbei verglichen mit einem Kontrollstamm und Mücken, die keiner Insektizid-Behandlung unterworfen waren. Die Ergebnisse dieser Autor*innen deuten auf eine Cytochrom-basierte metabolische Resistenz gegen Pyrethroide hin.

Huang et al. (2020) sequenzierten das *Wolbachia*-Genom und analysierten mitochondriale DNA-Marker von *Aedes aegypti*, die aus Mückenstämmen zwei bis acht Jahre nach ihrer Freisetzung isoliert wurden. Beim *Wolbachia*-Genom wurden nur wenige Veränderungen festgestellt. Mitochondriale Varianten, die mit dem anfänglichen *Wolbachia*-Genom assoziiert waren, waren die einzigen Varianten, die noch zu finden waren. Die Autor*innen erklären diese Befunde mit fehlender Migration von Mücken aus anderen Gebieten.

Ahmed et al. (2022) entwickelten eine neue Technik (Rekombinase-Polymerase-Amplifikation gekoppelt mit Lateral Flow Dipstick (RPA-LFD)-Detektion), die mit geringem Aufwand die Detektion gezielter Mutationen ermöglicht. Die neue Methode wurde an *Aedes aegypti* getestet. Darauf aufbauend wurde ein Schnelltest für Mutationen einzelner Basenpaare entwickelt, der innerhalb von 15 Minuten zu sicheren Ergebnissen führt.

Die Analpapillen von Mückenlarven sind regulatorische Organe, die aktiv Ionen binden und Wasser aufnehmen. Mit Gensequenzierung und experimentellen Untersuchungen identifizierten Durant et al. (2021) eine Reihe von Ionen- und Wassertransportproteinen, Ammoniak

entgiftende Enzyme, xenobiotische entgiftende Enzyme und Transporter sowie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spezifischer Hormone, welche am osmotischen Ausgleich beteiligt sind.

Langkettige Kohlenwasserstoffe auf der Cuticula von *Anopheles gambiae* regulieren u.a. die Aufnahme von Insektiziden. Ein Vergleich von einem Stamm, an dem CYP4G-Enzyme kodierende Gene verändert wurden, mit dem Wildtyp ergab, dass diese Enzyme zum einzigartigen Profil von kutikulären Kohlenwasserstoffen von *Anopheles*-Mücken beitragen (Kefi et al., 2019).

Das Immunsystem und das Kreislaufsystem der Mücken sind funktionell integriert. Thioester-enthaltende Proteine sind positive Regulatoren der periostialen Hämozytenaggregation in der afrikanischen Malaria-Mücke *Anopheles gambiae*. Ein RNAi-basiertes Knockdown dieser Proteine führte zu weniger periostialen Hämozyten nach einer Infektion mit *Escherichia coli* (Yan und Hillyer, 2019).

Zu den Dengue-Symptomen gehören eine Veränderung der Blutgerinnung und eine Fibrinolyse, was zu schweren Blutungen führt. Ramesh et al. (2019) wiesen mit einem RNAi-Knockdown nach, dass eine höhere Konzentration von Plasmin, dem humanen Fibrinolytikum-Faktor, in Blut die Infektion mit dem Dengue-Virus im Mückenmitteldarm und die Verbreitung in Mücken verstärkt.

An Zellkultursystemen fanden Schultz et al. (2018) heraus, dass das Wachstum des Zika-Virus in *Aedes albopictus*-Zellen konsistent war, aber hypervariabel in *Aedes aegypti*-Zelllinien. Als mögliche Erklärung für diese Variabilität wurde die Hypothese verifiziert, dass die Zellen opportunistische Viren beherbergten. Die Infektion von Zelllinien mit insektenspezifischen Viren kann Auswirkungen haben auf das Arbovirus-Wachstum und auf die Zellpermissivität gegenüber einer Arbovirus-Infektion.

Oxidativer Stress bei Infektionen von Mücken mit Dengue-Viren wird gelindert, indem eine antioxidative Abwehr ausgelöst wird, was wiederum zu einem Schutz der Mückenzellen vor der Infektion führt. Mit einer Gen-Knockdown-Technik wurde gezeigt, dass in *Aedes*-Mücken eine Katalase transkribiert wird, die eine entscheidende Rolle bei der Verringerung der Akkumulation von reaktivem Sauerstoff spielt (T.-H. Chen et al., 2018c). Ökologisch gesehen ist eine höhere Überlebensrate von Mücken eine Voraussetzung für die Produktion viraler Nachkommen.

Bottino-Rojas et al. (2022) beobachteten bei *Aedes aegypti*, dass der Knock-out eines Antioxidans-Hormons den Spiegel von reaktivem Sauerstoff erhöht und die Proliferation von Darmstammzellen stimuliert. Eine Abnahme des Hormons führte zu einem reduzierten Mikrobiota-Wachstum im Darm und zu einer Reduktion der Infektionen mit dem Zika-Virus. Darüber hinaus steuert das Hormon auch die Transkriptionsanpassung von *Aedes aegypti* an Insektizide.

2.2.1.3 Veränderungen des Geruchssinnes

Mücken sind dazu in der Lage, den Duft von bestimmten Menschen und einzelne Geruchsstoffe zu lernen (Vinauger et al., 2018). Mit dem Einsatz von RNAi- und CRISPR-Geneditierung haben diese Autor*innen eine Stoffwechsel-Variante gefunden, die das Lernen verhindert. Wesentlich war hierbei die Funktion von Dopamin. Daraus ergeben sich weiterhin Möglichkeiten, das Stechen von Mücken bei Menschen zu unterdrücken.

Raji et al. (2019) untersuchten Geruchsrezeptoren von *Aedes aegypti*. Sie diskutieren ionotrope Geruchsrezeptoren im Zusammenhang mit der Wirtserkennung. Um dies zu testen, störten sie mit Hilfe von CRISPR/Cas9 einen ionotropen Rezeptor. Die GOV-Mückenweibchen

wurden nicht von Milchsäure angezogen. Der Verlust des Rezeptors verringerte die Anziehungskraft von Menschen auf Mücken signifikant.

Ye et al. (2021) untersuchten bei *Anopheles coluzzii* Ammoniumtransporter im Geruchssystem unter Verwendung von CRISPR/Cas9. Die Mutanten zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mücken eine Reihe neuer Phänotypen einschließlich deutlich niedrigerer Besamungsraten während der Paarung und erhöhter Sterblichkeit während des Schlüpfens. Darüber hinaus zeigten GVO-Männchen einen signifikant geringeren Zuckerverbrauch, während GVO-Weibchen und -Puppen erst auf deutlich höhere Ammoniakwerte als ihre Wildtyp-Pendants reagierten.

Zur Erforschung des Geruchssinnes bei *Anopheles coluzzii* haben Liu et al. (2020a) eine CRISPR/Cas9-basierte Genbearbeitungstechnik in Kombination mit elektrophysiologischen In-vivo-Aufnahmen verwendet. Die Mutanten konnten jedoch immer noch auf CO₂-Stimuli reagieren, wenn auch mit deutlich schwächerer Empfindlichkeit.

Zu den chemosensorischen Prozessen von *Anopheles coluzzii* haben Sun et al. (2020a) CRISPR/Cas9-Geneditierung verwendet, um funktionelle Beiträge von Orco/OR-Komplexen auszuschalten. Sowohl im Erwachsenen- als auch im Larvenstadium transgener Mücken fehlten fast alle geruchsbedingten Reaktionen. Erwachsene transgene Weibchen wiesen eine stark reduzierte Anziehungskraft von Menschen und nicht von Menschen stammenden Gerüche auf.

In einer experimentellen Studie untersuchten Zhao et al. (2021) panneuronale Expressionstreiber – ein Schlüsselwerkzeug, das genetischen Zugang zu allen Neuronen bietet. Hierbei kam CRISPR/Cas9 an neuronalen Genen zum Einsatz. Die Auswirkungen auf das Verhalten zweier GVO-Stämme von *Aedes aegypti* waren jedoch begrenzt.

Ye et al. (2020) untersuchten mit neuen gentechnischen Methoden die Rolle von Ammonium-Transportern für die Geruchserkennung erwachsener und larvaler *Anopheles gambiae*-Mücken. Das Gen, welches den Ammonium-Transporter kodiert, spielt unterschiedliche Rollen im chemosensorischen Apparat von Adulten und Larven, wodurch sich neue mögliche Anwendungsfelder in der Malariabekämpfung ergeben.

Afify et al. (2019) manipulierten im Genom von *Anopheles coluzzii* das binäre Q-System, um die Aktivität olfaktorischer Neuronen zu untersuchen. Diese Autor*innen konnten zeigen, dass synthetische Repellents das Profil von Wirtsgeruchssignaturen auf der Hautoberfläche so verändern, dass Menschen für *Anopheles*-Mücken unsichtbar werden.

2.2.1.4 Weitere morphologische Veränderungen

Chae et al. (2021) identifizierten sechs Gene mit einer auf die Puppe von *Aedes aegypti* beschränkten Expression. Der vererbte CRISPR/Cas9-vermittelte Gen-Knockout einiger Gene zeigte keine Defekte in der Puppenentwicklung. Einige Mutationen führten jedoch zu flugunfähigen Mücken mit der Anomalie einer offenen Flügelhaltung. Die Unfähigkeit der erwachsenen GVO-Mücken zu fliegen schränkte ihre Flucht aus dem Wasser ein.

Arnoldi et al. (2022) beschreiben mit Hilfe von CRISPR-Cas den anfänglichen Auslöser eines Rückkopplungssignals in *Aedes*-Mücken, der das Fressverhalten beeinflusst. Die Autor*innen identifizierten Proteine im Speichel von *Aedes*-Mücken, die die Nahrungsaufnahme in der Wirbeltierhaut fördern. Diese Studie identifiziert eine zusätzliche Rolle des Mückenspeichels und unterstreicht, dass die äußere Kutikula ein möglicher Ort wichtiger molekularer Wechselwirkungen ist.

2.2.1.5 Modelle und Risiken

Durch die Anwendung neuer gentechnischer Methoden bei Mücken entstehen unbekannte Risiken für andere Arten und für Ökosystemdienstleistungen (Romeis et al., 2020). Obwohl CRISPR-Cas als eines der präzisesten Gen-Editing-Tools gilt, kann es sich auf DNA-Sequenzen an anderer Stelle im Genom auswirken. Dies ist ein großes Problem für die Modifikation von tierischen Zellen und kann zur Bildung von Doppelstrangbrüchen an unerwünschten Stellen führen, was möglicherweise unvorhergesehene genomische Umlagerungen hervorruft (Brad-dick und Ramarohetra, 2020).

Rycroft et al. (2019) schlagen für die Risikobewertung von GVO-Organismen eine neue quantitative Methode vor, die spezifische Risikofaktoren der synthetischen Biologie berücksichtigt. Diese Autor*innen erstellten einen neuen Bewertungsrahmen mit einem inkrementellen Aufbau, der auf etablierten Methoden zur Risikobewertung basiert.

Sun et al. (2022b) fassen den technischen Fortschritt der Synthetischen Biologie in den letzten Jahren und die damit verbundenen Risiken zusammen. Sie beschreiben aktuelle internationale Abkommen, Leitfäden, und nationale ordnungspolitische Maßnahmen zur Bewältigung potenzieller Schäden, die aus der synthetischen Biologie resultieren können. Schließlich werden Empfehlungen für eine bessere Praxis in der Forschung, der Biosicherheit und regulierender politischer Systeme gegeben.

Hoy (2019b) beleuchtet weitere Faktoren, welche bei der Freisetzung von GV-Mücken zu beachten sind. Dazu gehören u. a. die ökologischen Zusammenhänge, Monitoring-Verfahren, die Persistenz der veränderten Merkmale in Tochtergenerationen, der Genaustausch mit anderen Populationen, Kontrollmöglichkeiten und die Auswirkungen auf andere gefährdete Arten.

Mögliche Probleme durch die Ausbringung von GV-Mücken entstehen auch in der Zusammenarbeit zwischen Forschenden und der ansässigen Bevölkerung (Hartley et al., 2021). In einer qualitativen Analyse von 34 Interviews, ergänzt durch Beobachtungen und dokumentarische Recherchen, identifizierten diese Autor*innen mögliche Konflikte zwischen Interessengruppen. Öffentlichkeitsarbeit und die Einbeziehung von Stakeholdern und der Bevölkerung werden in dieser Studie als notwendig für eine erfolgreiche Bekämpfung von Mückenpopulationen erachtet.

Deng et al. (2021) geben einen systematischen Überblick über bestehende mathematische Modelle zur Infektion mit dem Parasiten *T. gondii* und identifizieren die Datenlücken für solche Modelle. Damit liefern sie die Basis für die Modellierung der Malariaausbreitung durch Anopheles-Arten als Vektoren.

In einer theoretischen Studie wurde ein populationsgenetisches Modell entwickelt (Edgington und Alphey, 2019). Diese Autor*innen zeigen, dass gezielte Mutationen wahrscheinlich nicht dazu in der Lage sind, eingeführte Transgene in Wildpopulationen zu etablieren. Individuen, die einen freien Suppressor tragen, stellen zwar aufgrund der extrem geringen Freisetzungsanforderungen eine kostengünstige Strategie dar, sie sind jedoch nicht dazu in der Lage, eine vollständige Wildtyppopulation zu verändern.

Sutter et al. (2021) weisen auf die Bedeutung der Paarungsökologie von Mücken bei ihrer Bekämpfung hin: Veränderungen in der Paarungsökologie erfolgen teilweise unbeabsichtigt auf die Ergebnisse von Manipulationsversuchen. Weitergehende Risiken für andere Arten sind noch vollkommen unbekannt.

Mohammed-Awel et al. (2020) stellen ein neuartiges mathematisches Modell vor, das die Malaria-Epidemiologie mit der Genetik einer Mückenpopulation koppelt. Das Modell dient der Bewertung der Auswirkungen der Insektizidresistenz auf die Malariaepidemiologie. Diese Studie identifizierte drei Schlüsselparameter des Modells, die sich negativ auf die Größe des effektiven Kontrollfensters auswirken, nämlich Parameter im Zusammenhang mit dem Abtöten von Larven, der Anzahl neuer erwachsener weiblicher Mücken und die anfängliche Häufigkeit resistenter Allele in der Population.

Ein weiteres mathematisches Modell zur Populationsdynamik von Mücken wurde von Suandi et al. (2022) vorgestellt. Das Modell, das die dynamische Entwicklung der Gameten von *Anopheles* im Genpool beschreibt, wurde unter Berücksichtigung der doppelten Resistenz entwickelt. Dieses Modell beinhaltet drei wesentliche Faktoren bei der Herstellung verschiedener Genotypen, nämlich zufällige Paarung, natürliche Selektion und Rekombination. Die Autor*innen fanden heraus, dass die intrinsische Geburtenrate sowie logistische Faktoren das Modellverhalten stark beeinflussen. Dies deutete darauf hin, dass das Management von Larven (Lebensraummanipulation, Larvizide) eine wichtige Strategie zur Unterdrückung von Doppelresistenzen ist.

Bliman und Dumont (2022) untersuchten den Einfluss der Migration von Männchen und fruchtbaren Weibchen auf die Sterile Insektentechnologie (SIT). Die Autor*innen zeigen durch Modellsimulationen, dass für jede Migrationsstufe eine kritische Freisetzungsrate für sterile Männer existiert. Insbesondere wenn die Migration der fruchtbaren Weibchen ausreichend gering ist, kann die SIT erfolgreich entweder mit Open-Loop-Steuerung oder Closed-Loop-Steuerung (oder einer Kombination) durchgeführt werden.

Im Juli 2019 setzte das Target Malaria-Konsortium die erste Freilassung hemizygoter, genetisch veränderter steriler und nicht-transgener männlicher Exemplare der Malariaemücke *Anopheles coluzzii* in Burkina Faso fort. Diese Studie zielte darauf ab, die mit dem Transgen verbundenen potenziellen Fitnesskosten zu bestimmen und wichtige Informationen zur Dynamik von Transgen-tragenden Mücken zu sammeln. Bayesianische Schätzungen bestätigten, dass genetisch veränderte Männchen eine höhere Mortalität hatten und weniger mobil waren als ihre Wildtyp-Geschwister (Yao et al, 2022).

Underdominance Gene Drives zielen darauf ab, einen gewünschten homozygoten Genotyp innerhalb einer Population zu verbreiten. Wenn die gewünschte Homozygote über einer Schwellenhäufigkeit freigesetzt wird, wirkt der heterozygote Fitnessnachteil, um das gewünschte Merkmal zur Fixierung zu bringen. In einer Modellstudie fanden Khamis et al. (2018) heraus, dass der Paarungserfolg von transgenen Mücken mit Wildtyp-Weibchen (beeinflusst durch einen Mangel an Wettbewerbsfähigkeit oder die Entwicklung von Verhaltensresistenz in der Form aktiver weiblicher Partnerpräferenz) und die Langlebigkeit künstlich gezüchteter Mücken von entscheidender Bedeutung für die Erfolgchancen von Underdominance Gene Drives sind.

Beaghton und Burt (2022) analysierten eine Reihe von explizit lösbaren stochastischen Modellen für die Wirkung des Timings von Paarung und der Reproduktion auf die Ausbreitung von Gene Drives in Mücken. Diese Autor*innen fanden, dass durch eine niedrige Populationsdichte Inzucht und Inzuchtdepression induziert werden können, wodurch wiederum Auswirkungen von Gene Drives auf die Zielpopulation folgen.

Um die interaktive Dynamik von wilden Mücken und Mücken mit gentechnisch veränderten Bakterien zu untersuchen, formulierten Li et al. (2018a) zeitkontinuierliche homogene und

stufenstrukturierte Modelle. Die Ergebnisse aus dem homogenen und den stufenstrukturierten Modellen waren ähnlich. Im Fokus dieser Studie stand die horizontale Übertragung von transgenen Bakterien.

In einer weiteren Modellstudie wurde ein mathematisches Modell zur Beschreibung der Dynamik von *Anopheles*-Mücken hergeleitet, das die genetische Klassifizierung basierend auf ihrem Resistenzstatus gegenüber Insektiziden hervorhebt (Suandi et al., 2019). Numerische Simulationen ergaben, dass der langfristige Einsatz hoher Insektiziddosen den Anteil resistenter Mücken signifikant erhöhen kann.

Ein ökologisches Modell wurde entwickelt, um eine Mückenpopulation nach Freisetzung gentechnisch veränderter Mücken zu simulieren (Natiello und Solari, 2020). Hybridisierungsstufen sowie die Populationserholungszeit nach der Intervention als Funktion von Interventionsdauer und -ziel wurden unter verschiedenen Hypothesen in Bezug auf die Fitness von Hybriden berechnet und mit zwei Feldstudien zu tatsächlichen Interventionen verglichen. Die Simulationen zeigten eine Verringerung der Anzahl erwachsener Weibchen (und aller anderen Subpopulationen außer erwachsener Männchen) während des Behandlungszeitraums. Es gibt einen anfänglichen Rückgang unter einen avisierten Zielwert, Das Verhältnis erwachsener Männchen lag während der Behandlung dauerhaft über 10:1. Nach Abschluss der Behandlung kehrte das System zu einer Situation zurück, die mit dem anfänglichen Gleichgewichtszustand vergleichbar ist.

Brozak et al. (2022) stellen einen genetisch-ökologischen Modellierungsrahmen zur Beschreibung der Auswirkungen von Insektizidresistenz, Temperaturschwankungen und insektizidbasierten Eingriffen auf die Populationsdynamik und Kontrolle von Malaria-Mücken vor. Analysen des Modells zeigen, dass das Grenzgleichgewicht mit ausschließlichem Auftreten von Mücken vom homozygoten resistenten Genotyp asymptotisch lokal stabil ist, wenn eine bestimmte ökologische Schwelle erreicht wird.

2.2.1.6 Auswahl der nGVO

Auf Grundlage der Literaturrecherche und dem darauf aufbauenden Review wird für die Gruppe der Mücken *Anopheles gambiae* als Beispiel-nGVO vorgeschlagen. Für diese Art wurden viele Anwendungen moderner gentechnischer Methoden beschrieben (Abb. 2), und sie ist ein Hauptvektor für Plasmodium, den Malariaerreger. Eine künftige Anwendung neuer Gentechniken in Zusammenhang mit Freilandexperimenten gilt daher für diese Art als wahrscheinlich. Die ökologischen Funktionen dieser Art sind weiterhin gut erfasst. In einer Studie von Hammond et al. (2021) fanden Experimente in großen Käfigen mit genmanipulierten Mücken dieser Art statt. Bei diesen Vorstufen zu Freilandexperimenten konnten auch Änderungen der Verhaltensweisen untersucht werden. *Anopheles gambiae* besitzt insbesondere hinsichtlich des Klimawandels und fortschreitender Renaturierungsmaßnahmen ein Potenzial, sich in mitteleuropäische Bereiche auszubreiten. Zusammenfassend spricht vieles dafür, diese Art *Aedes aegypti*, die bisher am häufigsten mit neuen gentechnischen Methoden behandelt wurde, als Beispielart vorzuziehen.

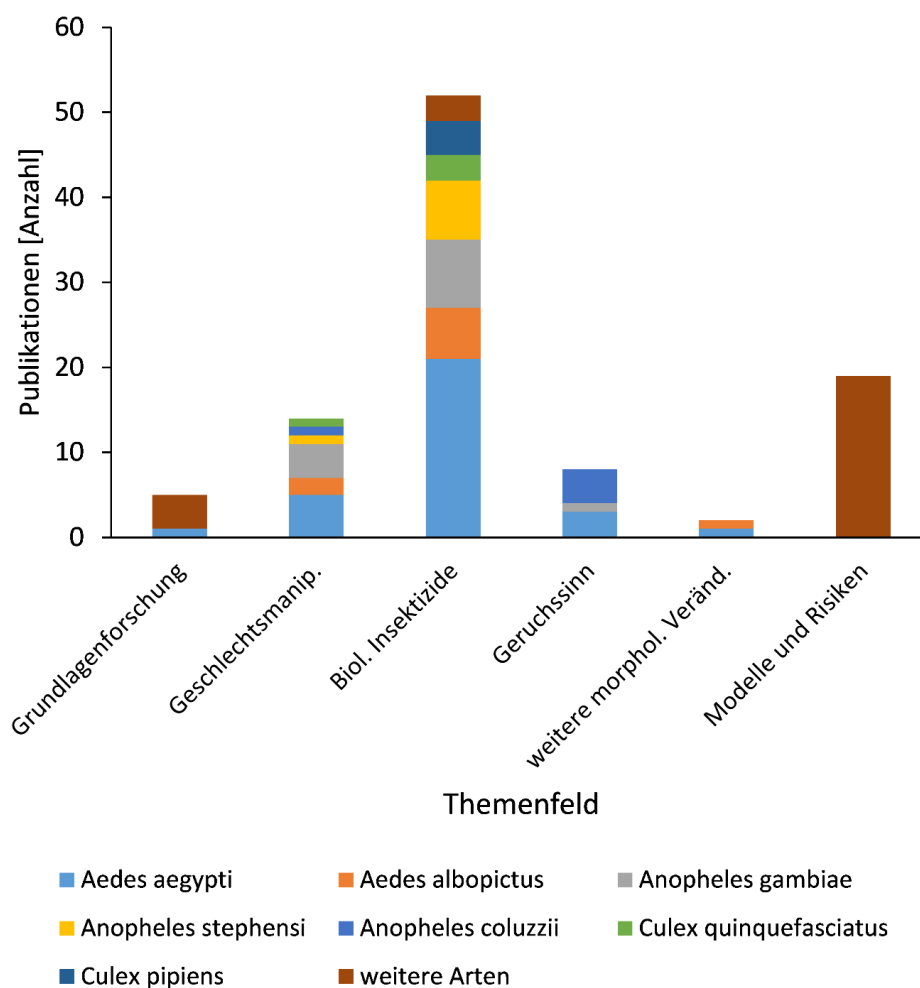


Abb. 2: Anzahlen der selektierten Publikationen zu neuen gentechnischen Methoden bei Mücken gegliedert nach Taxa und Themenfeldern.

2.2.1.7 Steckbrief *Anopheles gambiae*

Anopheles gambiae ist eine Stechmückenart aus der Gattung *Anopheles* der Untergattung *Cel-lia*. Im weiteren Sinn fasst man eine Gruppe von sechs anhand äußerer Merkmale nicht unterscheidbaren afrikanischen *Anopheles*-arten als *Anopheles-gambiae*-Komplex zusammen. Einige Arten des *Anopheles-gambiae*-Komplexes zählen zu den gefährlichsten Überträgern der Malaria. *Anopheles gambiae* sensu stricto wurde um 1900 am Gambia-Fluss entdeckt. Das Genom dieser Art wurde seit 2002 vollständig sequenziert. Zwei Autosomen und zwei Geschlechtschromosomen enthalten zusammen mit dem Genom des Mitochondriums 12.456 Gene.

Die Arten des *Anopheles-gambiae*-Komplexes kommen in großen Teilen Afrikas südlich der Sahara sowie auf der Arabischen Halbinsel vor. Zu diesem Komplex gehören folgende Arten:

- *Anopheles gambiae* sensu stricto Giles (1902)
- *Anopheles arabiensis* Patton (1905)
- *Anopheles quadriannulatus* Theobald (1911)
- *Anopheles bwambae* White (1985)

- *Anopheles merus* Dönitz (1902)
- *Anopheles melas* Theobald (1903)

Anopheles arabiensis findet sich im Jemen, in Saudi-Arabien und den trockeneren Gebieten Afrikas. Sie ist wie *Anopheles gambiae* s. str. ein sehr effizienter Malariaüberträger, da sie bevorzugt beim Menschen Blut saugt. Die Art *Anopheles quadriannulatus* tritt in Südafrika auf. Sie gilt als vergleichsweise ineffizienter Malariavektor, da sie häufig Tiere sticht und selten in menschlichen Behausungen anzutreffen ist. *Anopheles bwambae* wurde 1945 in einem unbewohnten Urwald im Westen Ugandas beschrieben. *Anopheles melas* kommt an den Küsten Westafrikas vor, *Anopheles merus* entlang der ostafrikanischen Küste. Beide Arten können im Salz- oder Brackwasser brüten.

Die anthropophilen Arten von *Anopheles* sp. finden ihre Wirte hauptsächlich durch Erkennen der CO₂-Ausscheidungen der Atemluft. Bei Windstille stechen weibliche Individuen von *Anopheles gambiae* Menschen bevorzugt in den Bereich der Fußsohlen und Knöchel. Dies sind die Bereiche des menschlichen Körpers, auf denen Bakterien der Art *Brevibacterium epidermis* leben, die kurzkettige Fettsäuren produzieren. Die Moskitos werden jedoch auch durch die Stoffwechselprodukte der verwandten Bakterienart *Brevibacterium linens* angezogen.

Gillies und de Meillon (1968) geben einen Überblick über die Ökologie von *Anopheles gambiae*, der im Folgenden verkürzt wiedergegeben wird:

Wie alle Mücken hat *Anopheles gambiae* vier Lebensstadien: Ei, Larve, Puppe und adulte Individuen. Sowohl männliche als auch weibliche erwachsene Moskitos ernähren sich von Nektar, aber nur Weibchen ernähren sich von Blut von Wirbeltieren, um Nährstoffe für ihre Eier zu erhalten. Adulte Tiere überleben in Gefangenschaft bis zu einem Monat, in freier Wildbahn jedoch nur ein bis zwei Wochen.

Adulte Individuen von *Anopheles gambiae* sind nachtaktiv, mit Spitzenaktivitätszeiten von Mitternacht bis 4:00 Uhr morgens, wobei die Aktivität bis kurz vor Sonnenaufgang andauert. Die Weibchen ernähren sich bevorzugt in menschlichen Behausungen, es kommt aber auch zur Nahrungsaufnahme im Freien. *Anopheles gambiae* ernährt sich im Gegensatz zu anderen Tieren bevorzugt von menschlichem Blut. Das macht diese Art zu einem sehr effizienten Überträger der menschlichen Malariaparasiten.

Erwachsene Weibchen legen ihre Eier auf der Wasseroberfläche in einer Vielzahl von aquatischen Lebensräumen ab, sie bevorzugen jedoch flache, sonnenbeschienene Teiche mit stehendem Wasser. Die Larven entwickeln sich im aquatischen Lebensraum. Wie bei allen Mücken verpuppen sich die Larven von *Anopheles gambiae* nach dem vierten Larvenstadium, sobald sie eine ausreichende Menge an Nahrung aufgenommen haben. *Anopheles gambiae* kann sich in 10–11 Tagen vom Ei zum adulten Tier entwickeln, aber die Entwicklung ist temperaturabhängig und kann unter kühleren Bedingungen bis zu drei Wochen dauern.

Die saisonale Häufigkeit von *Anopheles gambiae* variiert je nach Standort, aber im Allgemeinen nimmt die Populationsgröße während der Trockenzeit ab und erreicht ihren Höhepunkt während der Regenzeit. Die Populationen beginnen mit Beginn der Regenzeit zu wachsen, erreichen ihren Höhepunkt in der Mitte der Saison und nehmen ab, wenn sich der Wasserstand stabilisiert und sich aquatische Prädatoren etablieren.

Verschiedene Managementtechniken werden verwendet, um die Mückenpopulationen zu kontrollieren und die Übertragung von Malaria zu begrenzen. Effektive und derzeit

angewandte Managementpraktiken umfassen die Aufklärung der Bevölkerung über Malaria und die Rolle von Mücken bei der Übertragung, bauliche Maßnahmen, um das Eindringen von Mücken in Behausungen zu verhindern und um die Verfügbarkeit von Larvenentwicklungsstandorten zu verringern, sowie die Verwendung von Moskitonetzen, räumlichen Abwehrmitteln und der Einsatz von Insektiziden. Zu den möglichen Managementpraktiken gehören weiterhin die Einführung von Prädatoren, die sterile Insektentechnik und die Freisetzung gentechnisch veränderter Mücken. Abhängigkeiten von Insektiziden können lokal zur Entwicklung insektizidresistenter Mückenpopulationen führen.

2.2.2 Gentechnisch veränderte Bakterien

Der Hauptvorteil des Einsatzes von Mikroorganismen zur Schädlingskontrolle ist ihre Wirtsspezifität der Erreger. Bakterien, Algen, Pilze und andere Mikroorganismen haben die Fähigkeit, Schädlinge zu bekämpfen, ohne andere nützliche Populationen zu schädigen. Darüber hinaus haben eine Vielzahl von Mikroorganismen die Fähigkeit, die Stickstofffixierung zu fördern, und sie werden daher erfolgreich als Biodünger eingesetzt (Pole et al., 2022). Weiterhin bieten neue Techniken der Geneditierung Chancen, Plastikmüll und Schadstoffe in der Umwelt abzubauen (Kumari und Chaudhary, 2020). Gentechnisch veränderte Bakterien wie *Rhodococcus spp.* werden daneben zur Bioumwandlung, Biosynthese und Bioremediation eingesetzt (Liang et al., 2020). Dabei werden Techniken wie CRISPR/Cas9 immer weiter optimiert, um z. B. DNA-Doppelstrangbrüche zu vermeiden (Liang et al., 2021). Schließlich ist die Bioraffinerie von auf Biomasse basierenden Biokraftstoffen und Biochemikalien durch Mikroorganismen eine wettbewerbsfähige Alternative zu herkömmlichen Verfahren der Erdölraffinerie. So ist *Zymomonas mobilis* ein natürliches ethanogenes Bakterium mit Eigenschaften, die es im Rahmen der Geneditierung zu einem idealen industriellen mikrobiellen Biokatalysator für die kommerzielle Produktion von Kohlenwasserstoffen machen (X. Wang et al., 2018c). Weitere Anwendungsmöglichkeiten neuer gentechnischer Methoden bei Bakterien sind die Produktion von biogenen Kunststoffen (Chong et al., 2021) und die Bekämpfung bakterieller Infektionen (Wang et al., 2019). Im Folgenden werden neue Methoden der Geneditierung gegliedert nach ihren Anwendungsfeldern behandelt.

In Analogie zum Kapitel über gentechnisch veränderte Mücken wird im Folgenden eine Gliederung nach Themen vorgenommen. Die Themen ergeben sich aus den Publikationen und somit aus dem Stand der Forschung. Gentechnische Veränderungen, die ähnliche Anwendungen haben wie die Produktion von Kohlenwasserstoffen und von künstlichen Polymeren, werden zusammen in einem Unterkapitel behandelt.

2.2.2.1 Produktion biologischer Pestizide

Singh und Mazumdar (2022) geben einen Überblick über die bakterielle Herstellung von Pestiziden. Trends, Anwendungsbereiche und Anwendungen zur Verbesserung von Pflanzen und Böden werden darin aufgezeigt, und Geneditierungen mit CRISPR/Cas werden als bessere Alternative zur chemischen Mutagenese diskutiert.

Neben der Bildung von Sporen kann *Bacillus thuringiensis* Toxine und insektizide Kristallproteine produzieren. Das die Sporenbildung regulierende Gen wurde erfolgreich durch Genrekombination ausgeknockt, und es wurde gezeigt, dass so die Sporulation gehemmt wird (Zhou et al., 2020). Der Mutantenstamm zeigte ein deutlich verringertes Wachstum und eine verminderte Kristallbildung. Die Geneditierung hemmte die Sporenbildung und verringerte teilweise die Geschwindigkeit der Kristallsynthese.

Eine Studie von Han et al. (2022) zielte darauf ab, einen neuen Bakterienstamm 7WMA2 als natürliches Fungizid zu etablieren. Der Stamm 7WMA2 wurde aus marinem Sediment isoliert. Die Genomanalyse dieses Stammes lieferte Einblicke in seine antagonistische Fähigkeit und die Funktion seiner sekundären Metabolite als biologisches Fungizid.

2.2.2.2 Natürliche Düngung

Adetunji et al. (2022) geben einen Überblick über neue Verfahren der Düngung mit Hilfe von gentechnisch veränderten Bakterien und Pilzen wie *Bradyrhizobium japonicum*, *Actinomyces frankia* und *Sinorhizobium meliloti*. Nach diesen Autor*innen bietet die Ausweitung der Gentechnik bei der Modifizierung von Mikroorganismen in der Landwirtschaft mehrere Vorteile wie Nachhaltigkeit und Umweltfreundlichkeit.

Bacillus subtilis stammt ursprünglich aus Luftwurzeln von *Ficus benghalensis* und ist ein potenzielles Biokontrollmittel durch Sekretion einer Mischung aus Surfactinen, Iturinen und Fengycinen. Eine Studie von Nanjani et al. (2022) erweitert die Charakterisierung dieses Bakteriums durch genomeditierende und vergleichende genomische Ansätze. Der Stamm *B. subtilis* K1 wurde von diesen Autor*innen taxonomisch als *B. velezensis* klassifiziert.

Wen et al. (2021) beschrieben die Identifizierung, Entwicklung und den Einsatz eines mikrobiellen Produkts, das mithilfe von neuen Geneditierungs-Methoden optimiert wurde, um bakterielle Stickstofffixierung für Mais (*Zea mays*) auf gedüngten Feldern zu ermöglichen. Ein gentechnisch veränderter Stamm wurde abgeleitet von einem stickstofffixierenden Wildtyp, der aus landwirtschaftlichen Böden isoliert wurde (*Klebsiella variicola* 137-1036, „Kv137-1036“). Der genetisch veränderte Stamm behielt die Fähigkeit bei, Maiswurzeln zu besiedeln, während die Stickstofffixierungsaktivität in stickstoffreichen Umgebungen um das 122-fache erhöht wurde. In mehrjährigen Feldversuchsexperimenten an mehreren Standorten im US-Maisgürtel zeigten Felder, die mit Kv137-1036 angebaut wurden, höhere Erträge im Vergleich zu Feldern, die nur mit synthetischen Stickstoffdüngern gedüngt wurden.

Bloch et al. (2020) isolierten einen Stamm des pflanzenassoziierten Proteobakteriums *Kosakonia sacchari* aus Maiswurzeln. Diese Autor*innen charakterisierten sein stickstoffregulierendes Netzwerk. Genmanipulationen zielten darauf ab, die Stickstofffixierung in Mais zu optimieren. Während der Wildtyp-Stamm die Stickstofffixierung in Böden mit hohen Konzentrationen bioverfügbaren Stickstoffs wie in gedüngten Gewächshäusern und Versuchsfeldern unterdrückte, zeigten geneditierte Stämme selbst in Gegenwart von exogenem Stickstoff erhöhte Dichten in der Rhizosphäre von Mais.

2.2.2.3 Bioremediation

Ein systemisches Wissen über Pflanzen-Mikroben-Interaktionen wird den Einsatz von Gen-Editierung und Genmanipulationstechniken ermöglichen, um die Effizienz von Pflanzen in der Phytoremediation zu steigern. In einem Meinungsartikel konzentrierten sich Basu et al. (2018) auf neue Gen-Editierungs-Techniken, die in Pflanzen und Mikroben zur Phytoremediation verwendet werden. Diese Autor*innen betonten u.a. ihre Wirksamkeit, ihren Fortschritt und ihre zukünftigen Auswirkungen auf eine nachhaltige und umweltfreundliche Landwirtschaft.

Miri et al. (2022) geben einen Überblick über den bakteriellen Abbau von Mikroplastik in der Umwelt durch Pilze und Bakterien wie *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowii*, *Streptomyces sp.*, *Bacillus sp.*, *Zalerion maritimum* und *Engyodontium album*. In diesem Zusammenhang werden neue Methoden der Geneditierung wie CRISPR/Cas9 zur Steigerung der Abbaueffektivität diskutiert.

Araújo et al. (2021) isolierten Carbapenem-resistente Bakterien im Abwasser von kommunalen Kläranlagen. Die Isolate wurden meistens identifiziert als Bakterien der Gattungen *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Leclercia* und *Lelliottia*. Gensequenzierungen der Isolate mit Hilfe von CRISPR/Cas9 fanden in Plasmiden Ähnlichkeiten mit Genen, die Resistenzen gegen andere Antibiotika codieren.

Mandpe et al. (2022) stellten in einem Review-Artikel Bakterienarten und -gattungen zusammen, die im Rahmen neuer gentechnischer Methoden zur Bioremediation von Pestiziden eingesetzt werden können. Dazu zählen solche Arten wie *Acinetobacter sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Bordetella sp.*, *Pandoraea sp.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Rhodococcus erythropolis*.

French et al. (2020) entwickelten eine neue Technologie, um einheimische mikrobiologische Gemeinschaften im Boden für eine biologische Sanierung zu nutzen, indem die lokale Population mit katabolischen Genen für den Abbau von Erdölkohlenwasserstoffen überflutet wird. Die Überexpression von drei Enzymen (almA, xylE, p450cam) in *Escherichia coli* führte zum Abbau von 60–99 % der vorhandenen Kohlenwasserstoffe. Paarungsexperimente und Fluoreszenzmikroskopie zeigten, dass einheimische Bakterien die Vektoren aus *E. coli* durch mehrere Mechanismen des horizontalen Gentransfers einschließlich Konjugation und zytoplasmatischem Austausch durch Nanoröhren erhalten könnten. Die Inokulation erdölverschmutzter Sedimente mit *E. coli*, die den Vektor pSF-OXB15-p450camfusion trugen, zeigte, dass die *E. coli*-Zellen nach fünf Tagen starben, aber eine Vielzahl von Bakterien erhielten und trugen den Vektor über 60 Tage nach der Inokulation. Innerhalb von 60 Tagen wurde der Gesamtgehalt an Erdölkohlenwasserstoffen des verschmutzten Bodens um 46 % reduziert.

In einem Review stellen Wu et al. (2021a) die jüngsten Fortschritte bei biologischen Sanierungstechniken für Böden vor, die mit organischen Schadstoffen und Schwermetallen kontaminiert sind. Das Design multifunktionaler gentechnischer Mikroorganismen hat eine gesteigerte Effizienz und die Erfüllung von Umweltauflagen zum Ziel. Die Autor*innen diskutieren neue Methoden der Biotechnologie und Geneditierung zur Verbesserung der Fähigkeit mikrobieller Enzyme für einen effektiven kombinierten Schadstoffabbau.

Zur Verbesserung der Abbauleistung von organischen Schadstoffen wurde ein speziell entwickeltes CRISPR-ddAsCpf1-System in *Shewanella oneidensis* verwendet (Chen et al., 2022). Die Modifikationen erhöhten nicht nur die Transkriptionsrate des Gens, das den L-Lactat-Stoffwechsel reguliert, sondern verbesserten auch die Riboflavinproduktion. Das resultierte wiederum in einer Umleitung des Elektronenflusses zur Verbesserung der Bioreduktion von Methyl-Orange und sechswertigem Chrom.

2.2.2.4 Produktion von Kohlenwasserstoffen und von organischen Polymeren

Li et al. (2021b) berichten von einer neuartigen Methode, einem Plug-and-Play-Toolkit, das eine hocheffiziente, einstufige Multi-Locus-Integration von Biosynthese-Genclustern von Naturprodukten in Actinomyceten ermöglicht. Anwendungen dieser neuen Methode ergeben sich insbesondere in der Produktion von Lebensmitteln und Kunststoffen.

Eine effiziente Vorbehandlung Lignin-haltiger Biomasse ist erforderlich, um die damit verbundenen Energiekosten zu senken. Lignin-abbauende Bakterien (*Comamonas testosteroni*, *Agrobacterium sp.*, *Lysinibacillus sphaericus* und *Paenibacillus sp.*) wurden diesbezüglich von Nurika et al. (2022) getestet. Die höchsten Ausbeuten an Methan resultierten aus der Behandlung mit *Comamonas testosteroni*.

Mehta et al. (2021) geben einen Überblick über neue Entwicklungen bei der Nutzung von exopolymeren Substanzen (EPS) von Bakterien. Hierbei steht die Integration der CRISPR/Cas9-Technologie für eine Herstellung und Modifikation von EPS-Produkten im Vordergrund. Weiterhin werden in diesem Artikel pflanzenwachstumsfördernde Eigenschaften von EPS behandelt.

Javed et al. (2019) erstellten ein Review über die biogene Produktion von Kraftstoffen. In dem Artikel werden eine Zusammenfassung verschiedener Herstellungsweisen von Biokraftstoffen, integrierte Prozesse der Bioumwandlung von Rohstoffen in Biokraftstoffe und die Rolle von Mikroben bei den Umwandlungsprozessen vorgestellt. Ein Schwerpunkt des Reviews liegt auf der CRISPR/Cas9-vermittelten Genombearbeitung in Mikroorganismen und ihrem Nutzen für eine verbesserte Produktion von Biokraftstoffen.

Durch die Kombination des thermophilen CRISPR-Systems mit Rekombinasen haben Walker et al. (2020) ein neues Tool entwickelt, das eine effiziente CRISPR-Bearbeitung ermöglicht. Diese CRISPR-Technologie diente zur Entwicklung eines neuen Stammes von *C. thermocellum* sowohl für einen erhöhten Lignozelluloseabbau als auch für Biokraftstoffproduktion.

Polyhydroxyalkanoate (PHAs), eine Klasse von Biokunststoffen, die von einer Vielzahl von Mikroorganismen produziert werden, sind aufgrund ihrer überlegenen physikalisch-chemischen und Materialeigenschaften ideale Alternativen für erdölbasierte Kunststoffe geworden. *Pseudomonas putida* kann PHA mittlerer Kettenlänge aus verschiedenen Substraten produzieren. Liu et al. (2022) verwendeten eine neuartige Strategie der groß angelegten Deletion von genomischen Inseln und einer Kopplung mit Promotor-Engineering, um Zellfabriken effizient zu konstruieren.

Die meisten Prokaryoten beherbergen native CRISPR-Cas-Systeme. Genom-Engineering kann erreicht werden, indem diese endogen genutzt werden. Zhang et al. (2018) berichten über die Nutzung von CRISPR-Cas von *Clostridium tyrobutyricum* für eine Genombearbeitung. Das entwickelte Protokoll hat eine breite Anwendbarkeit auf andere Prokaryoten, die endogene CRISPR-Cas-Systeme enthalten. *C. tyrobutyricum* könnte den Autor*innen zufolge als Plattform für die Produktion von Biokraftstoff eingesetzt werden.

Eine Studie von Fan et al. (2020) untersuchte, ob eine verbesserte Produktion von Polyhydroxyalkanoat und Alginat-Oligosaccharid durch *Pseudomonas mendocina* durch Genomreduktion erreicht werden kann. Hierbei wurden 14 große genomische Fragmente deletiert, um eine Reihe von genomreduzierten Stämmen durch ein markerloses Knockout-Verfahren zu erzeugen. Die neuen Stämme können als Zellfabriken von verschiedenen Polymeren dienen.

Elektrogene Bakterien verstoffwechseln organische Substrate, indem sie Elektronen auf eine Elektrode übertragen und so Strom erzeugen können. Mit CRISPR-Cas9 wurden Knockout-Mutanten von *Arcobacter butzleri* erzeugt, die eine einzige Kohlenstoffquelle nutzen können. Dabei blieb die Energieerzeugung kaum verändert (Szydlowski et al., 2020).

Obruca et al. (2022) geben eine Übersicht über die bakterielle Genese von Polyhydroxyalkanoaten (PHA). PHA werden von mikrobiellen Zellen in Form von intrazellulären Granula hauptsächlich als Speicher angereichert. Zahlreiche neuere Berichte beschreiben auch die Bedeutung von PHA für die Stressrobustheit von Bakterien. In der Übersicht fokussieren die Autor*innen auf die Akkumulation von PHA in Halophilen und Thermophilen – prokaryotischen Mikroorganismen, die an hohen Salzgehalt und hohe Temperaturen angepasst sind.

Proteiniphilum saccharofermentan ist eine kürzlich beschriebene Art innerhalb der Familie der Porphyromonadaceae, die aus einem mesophilen Biogasreaktor im Labormaßstab isoliert wurde. Das Genom des Stammes wurde vollständig sequenziert und manuell annotiert (Tomazetto et al., 2018). Diese Autor*innen erfassten dessen metabolisches Potenzial bezüglich Biomasseabbau und Fermentation zu Kraftstoffen.

2.2.2.5 Produktion von Arzneimitteln und Lebensmitteln

Ko et al. (2021) entwickelten einen neuen Stamm von *Corynebacterium glutamicum*, der in der Lage ist, Häm mit hoher Ausbeute zu produzieren. Hierzu wurde die Membranoberfläche modifiziert. Die Kombination zweier etablierter Synthesewege erhöhte den Kohlenstofffluss in Richtung Häm- und Porphyrin-Biosynthese.

Qin et al. (2021) entwickelten eine Methode der Geneditierung von *Gluconobacter oxydans*. Zuvor waren für *G. oxydans* nur sehr wenige Gen-Editierungs-Tools verfügbar. Diese Studie zielte darauf ab, eine effiziente Methode unter Verwendung eines neuen Markers zu entwickeln.

Bacillus licheniformis ist ein bekanntes Probiotikum, das in einer Vielzahl von Lebensmitteln enthalten ist. Dindhoria et al. (2022) trugen mit neuen gentechnischen Methoden der Gensequenzierung dazu bei, die Fähigkeit von *B. licheniformis* zu verstehen, sich an das menschliche Darmmilieu anzupassen.

Streptococcus thermophilus ist ein wirtschaftlich bedeutendes Bakterium zur Herstellung gängiger Milchprodukte. Das Fehlen präziser genetischer Manipulationsansätze hat jedoch seine industrielle Anwendung in der Vergangenheit stark behindert. Kong et al. (2022) haben hierfür eine effiziente Toolbox zur Genombearbeitung entwickelt, die auf CRISPR/nCas9 basiert.

Ke et al. (2022) entwickelten eine neue CRISPR/Cas-Technik, die mit einer Rekombinase kombiniert wird. Die neue Methode, das CRAGE-CRISPR-System, ist einfach und erwies sich als leistungsstarker Ansatz zur schnellen Störung der Expression definierter bakterieller Gene.

Chen et al. (2018d) berichten von der Entwicklung des Genom-Editierungs-Verfahrens pCasPA/pACRISPR durch Nutzung des CRISPR/Cas9- und des Phagen- λ -Red-Rekombinationssystems. Die Methode wurde auf *Pseudomonas aeruginosa* angewandt und stellt eine effiziente Möglichkeit der Synthese von Arzneimitteln dar.

Die Nutzung von halophilen Bakterien zur Herstellung von Therapeutika erfordert neue gentechnische Methoden. Eine schnelle und effiziente Methode wurde über das CRISPR/Cas9-System von Qin et al. (2018) entwickelt. Das Verfahren erreichte bei Anwendung auf *Halomonas* einen Wirkungsgrad von 100 %.

Effiziente und einfache genetische Manipulationen von Mykobakterien, wichtigen Mikroorganismen in der Humanmedizin und der pharmazeutischen Industrie, sind nur begrenzt vorhanden. In einer Studie von Liu et al. (2022a) wird ein Modellstamm von *Mycobacterium neoaurum* verwendet, um ein Genom-Editierungs-System unter Einsatz von CRISPR-Cas12a zu entwickeln. Die entwickelten robusten CRISPR-Systeme zeigten ein starkes Potenzial zur präzisen Genombearbeitung in *M. neoaurum*, einschließlich gezielter Löschung von DNA-Sequenzen verschiedener Längen und Integration von Zielgenen an gewünschten Stellen im Genom.

Ein hocheffizientes Genom-Editierungssystem wurde für *Bacillus licheniformis* basierend auf einem einzelnen Plasmid und CRISPR/Cas9 entwickelt (Zhou et al., 2019). Für eine hocheffiziente Genom-Editierung wurde der Shuttle-Vektor pWH1520 ausgewählt, um das Knockout -

Plasmid zu konstruieren. Die metabolische Regulierung von *Bacillus licheniformis* und anderer industriell relevanter *Bacillus*-Arten bieten Möglichkeiten in der Arzneimittelproduktion.

Hartz et al. (2021) beschreiben die Anpassung eines CRISPR-Cas9-Vektors zur Ermöglichung einer effizienten Genombearbeitung in *Bacillus megaterium*. Das veränderte Bakterium wurde erfolgreich zur Synthese eines C21-veresterten Derivats von Kortison eingesetzt.

Als traditionelles Aminosäure-produzierendes Bakterium ist *Corynebacterium glutamicum* ein Plattformstamm für die Produktion von verschiedenen Chemikalien. Basierend auf CRISPR/Cas9 wurde von Deng et al. (2020) ein Gen-Editierungs-Tool entwickelt, das eine Basenumwandlung im Genom von *C. glutamicum* ermöglicht. Das neue Tool benötigt keinen DNA-Doppelstrangbruch und keine homologe Matrize.

Mo et al. (2019) entwickelten ein neues CRISPR-Cas9-System pMWCas9. Dieses System wurde erfolgreich zum Löschen/Ersetzen von Erythromycin PKS und anderen biosynthetischen Genen in *Saccharopolyspora erythraea* und *Streptomyces sp.* angewendet. Die Ergebnisse dieser Studie bieten ein robustes und nützliches Cas9-Tool für genetische Studien an Aktinobakterien zur Arzneimittelsynthese.

Lin et al. (2021) haben Elemente des *Francisella novicida*-Genoms zur Bearbeitung des Genoms von *Pseudomonas aeruginosa* verwendet. Durch die Verwendung eines Zwei-Plasmid-Systems und einer CRISPR-RNA erreichten die Autor*innen die Löschung und Insertion von Genen mit hoher Effizienz (in den meisten Fällen > 75 %).

Die Ausweitung der CRISPR/Cas9-Werkzeuge auf eine Vielzahl mikrobieller Organismen ist erforderlich in der Herstellung von Arzneien und Lebensmitteln. Alfaro et al. (2022) hatten zum Ziel, die Eignung von CRISPR/Cas9 für die Genomeditierung eines Stamms vom Typ *Citrobacter freundii* zu testen. Die auf CRISPR/Cas9 basierende Methode ermöglichte eine hohe Bearbeitungseffizienz (~91 %) für ein Knock-out des Galactokinase-kodierenden Gens.

Li et al. (2020b) konnten anhand einer gentechnischen Studie an *Bacillus subtilis* und *E. coli* zeigen, dass eine Kombination aus Optimierung der Vorläuferversorgung und Regulierung des Cofaktorstoffwechsels ein effektiver Ansatz für die Produktion von Tryptophan ist. Ähnliche Strategien könnten auf die Produktion anderer Aminosäuren oder verwandter Derivate angewendet werden.

Eine genombasierte kombinatorische Engineering-Strategie wurde von Li et al. (2021b) entwickelt, um sowohl die Fidaxomicin-Produktion als auch die genetische Stabilität von *Actinoplanes deccanensis* zu verbessern. Nach Genomanalysen wurden mehrere mit genetischer Instabilität assoziierte Elemente kumulativ gelöscht, wodurch eine genetisch stabile Mutante erzeugt wurde.

Die häufig verwendete Cas9-Nuklease stammt von *Streptococcus pyogenes*. Sie ist aufgrund seiner Zytotoxizität und Größe schwierig zu handhaben. Okano et al. (2021) haben ein alternatives Genom-Editierungssystem unter Verwendung einer Miniatur-Cas12f1-Nuklease entwickelt, das von einem unkultivierten Archaeon abgeleitet wurde.

Southern und Oyston (2020) beschrieben die Konstruktion eines All-in-One-Vektors zur Erzeugung einer potenziell narbenlosen Deletion. Dies diente der Generierung eines Mutanten von *Francisella tularensis* unter Verwendung eines CRISPR-Cas9-basierten Systems.

Ein neuartiges Genom-Editierungs-Verfahren zum wiederholten Einbringen von Fremd-DNA, einschließlich des Einfügens ziemlich großer DNA-Fragmente im Chromosom von

Corynebacterium glutamicum wurde entwickelt (Lobanova et al., 2022). Die Methode basiert auf der Implementierung der Dual-In/Out-Strategie, die zuvor in *Escherichia coli* getestet wurde, sie ermöglicht eine schrittweise Genese von markerlosen plasmidfreien rekombinanten Stämmen.

Yates et al. (2019) beschreiben eine gentechnische Strategie, bei der das Hauptgen für nicht-essentielle Polysaccharide in *Escherichia coli* durch orthogonale Glykosylierungskomponenten für die Biosynthese heterologer Glykanstrukturen ortsspezifisch ersetzt wurde. Die neuen Stämme hefteten Glykane an Akzeptorproteinziele mit gleicher oder größerer Effizienz an, während sie deutlich bessere Wachstumsraten und höhere Glykoproteintiter zeigten.

In einer Arbeit von Aparicio et al. (2020) wurde ein gentechnisches System erstellt, mit dem mehrere Veränderungen am Chromosom des biotechnologisch relevanten Stammes EM42 von *Pseudomonas putida* vorgenommen werden können. Mit dieser neuen Methode kann *P. putida* zur Synthese von verschiedenen Substanzen verwendet werden.

D-Pantothensäure (D-PA) ist ein essentielles Vitamin, das in der Medizin, in Lebensmitteln und in Tierfutter weit verbreitet ist. Zou et al. (2021) nahmen an *E. coli*-Stämmen Verbesserungen und Änderungen an der Fermentation zu D-PA vor, um eine Produktion auf hohem Niveau zu erreichen. Dadurch wurden Grundlagen für die industrielle Produktion von biogenem D-PA geschaffen.

Thraustochytrid-Stämme, die zur Gattung *Aurantiochytrium* gehören, akkumulieren beträchtliche Mengen an Lipiden, einschließlich mehrfach ungesättigter Fettsäuren und Carotinoide. Watanabe et al. (2021) haben CRISPR-Cas9 angewendet, um neue Stämme von *Aurantiochytrium*-Arten mit beschleunigtem Stoffwechsel zu generieren. Die Effizienz des spezifischen Gen-Knock-ins stieg um mehr als das 10-fache nach Anwendung der CRISPR-Cas9-Technik.

Die Effizienz der Bioumwandlung von Glycerol zu 1,3-Propandiol (1,3-PD) durch *Clostridium butyricum* wird durch geringe Toleranz gegenüber verschiedenen Stressoren, insbesondere Glycerin als Substrat, 1,3-PD als Endprodukt und Buttersäure als Nebenprodukt beeinträchtigt. Yun et al. (2022) steigerten die Verträglichkeit und 1,3-PD-Produktion von *C. butyricum* unter Verwendung von Zufallsmutationen und neuen Evolutionstechniken.

Durch CRISPR/Cas9 verursachte Doppelstrangbrüche verringern die Überlebensrate von Bakterienzellen dramatisch, was die Multiplex-Genom-Editierung in Bakterien behindert. Wang et al. (2018d) versuchten dieses Problem zu lösen und entwickelten eine automatisierte Multiplex-Basenbearbeitungsmethode für *Corynebacterium glutamicum* (MACBETH) unter Verwendung von CRISPR/Cas9 und aktivierungsinduzierter Cytidin-Desaminase (AID) ohne fremde DNA-Matrizen. Die Produktion von Glutamat konnte im transgenen Stamm um das Dreifache gegenüber dem Wildtyp-Stamm gesteigert werden.

Salidroside ist ein natürlich vorkommendes Phenylpropanoidglykosid, das in Lebensmitteln und Kosmetika weit verbreitet ist. Um einen stabilen Salidroside-produzierenden Stamm zu konstruieren, wurde ein Gen in das Genom von *E. coli* integriert (S. Liu et al., 2022b). Unter Verwendung einer Mehrfachkopien-Integrationsstrategie wurde eine hohe Ausbeute von Salidroside erzielt.

Daszczyk et al. (2014) entwickelten einen zellbasierten Biosensor, der die Beurteilung der Fleischfrische anhand des gram-positiven Modellbakteriums *Bacillus subtilis* als Chassis ermöglicht. Mittels Transkriptomanalyse wurden Promotoren identifiziert, die durch freigesetzte flüchtige Stoffe spezifisch aktiviert werden. Der am stärksten aktivierte Promotor war

PsboA. Anschließend wurde ein neuartiges Integrationsplasmid für *B. subtilis* und geklontes PsboA generiert.

Die häufigste Single-Gen-Knockout-Strategie bei *Lactococcus lactis*, einem Milchsäurebakterium, beinhaltet eine homologe Rekombination, die relativ zeitaufwändig ist. Song et al. (2021b) entwickelten eine neue präzise und effiziente Genomeditierungsmethode für *L. lactis*.

Seok et al. (2021) verwendeten einen synthetischen Biosensor, um die Produktion eines bestimmten Metaboliten mit dem Zellwachstum zu koppeln. Zur Herstellung von Hydroxypropionsäure aus Glycerin in *Escherichia coli* als Modellsystem wurden gezielte Mutationen in den Regionen des Genoms, die an der globalen Transkriptionsregulation beteiligt sind, erzeugt. Aus dieser Studie ergeben sich neue Möglichkeiten bezüglich der Stoffwechseloptimierung für die Produktion von Lebensmitteln.

2.2.2.6 Bekämpfung von bakteriellen Infektionen

Tejada-Arranz et al. (2020) geben einen Überblick über bakterielle RNA-Degradosomen als molekulare Multienzymmaschinen, die als Knotenpunkte für posttranskriptionelle Prozesse fungieren. Dabei diskutieren sie mögliche Anwendungen von Degradosomen zur Bekämpfung von Krankheitserregern wie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Helicobacter pylori*.

Chen et al. (2018a) generierten *Staphylococcus aureus*-Mutanten. Diese Mutanten wurden unter Verwendung eines Klonierungsvektors erstellt. Durch die Mutation verlor der Keim seine pathogene Wirkung.

Meijers et al. (2020) haben die CRISPR-Interferenz in ein effizientes Genom-Editierungs-Tool für Mykobakterien umgewandelt. Diese Autor*innen konnten zeigen, dass ein CRISPR1-Cas9 von *Streptococcus thermophilus* in *Mycobacterium marinum* und *Mycobacterium tuberculosis* funktionsfähig ist und präzise DNA-Brüche ohne Off-Target-Effekte ermöglicht.

Für die Entwicklung von vektorisierten Impfstoffen gegen Schweinepathogene wird häufig das Genom des Pseudorabiesvirus-Impfstoffs verwendet. In einer Studie von Hübner et al. (2018) wurde ein infektiöses bakterielles künstliches Chromosom des Schweinepestersgereggers geklont und modifiziert.

Eine große Einschränkung der Baseneditierung ist das Vorhandensein bearbeitbarer Stellen im bakteriellen Zielgenom aufgrund sehr unterschiedlicher genomischer Zusammensetzungen. Chen et al. (2021) haben dieses Problem behandelt und in *E. coli* eine Breitspektrum-DNase-inaktive Variante aus *Francisella novicida* durch gerichtete Evolution entwickelt.

Plasmide, die das CRISPR-Cas9-System tragen, wurden von Wang et al. (2018b) konstruiert und in *Clostridium difficile* durch Konjugation transformiert. Ein Hitze-Überlebens-Ansatz wurde verwendet, um die Sporulation zwischen der Mutante ohne Sporulationsgen und dem Wildtyp-Stamm zu vergleichen. Die Mutationseffizienz betrug in dieser Studie 100%.

Vibrio mimicus ist ein bedeutender Krankheitserreger bei Süßwasserwelsen. Multiplex-Genomeditierung durch natürliche Transformation (MuGENT) ist eine einfache Knockout-Methode, die bisher bei verschiedenen Bakterien mit Ausnahme von *V. mimicus* erfolgreich eingesetzt wurde. Yu et al. (2019) fanden, dass *V. Mimicus* exogene DNA aufnehmen und in das Genom einfügen kann. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um fünf Mutanten herzustellen, deren Antibiotikaresistenzmarker so entfernt wurden.

Xu et al. (2019c) berichten von der Innovation einer hocheffizienten in situ Genomeditierungs-Technik, die im klinischen Bereich und in der Umwelt anwendbar ist. Isolate des prototypischen MDR-Erregers *Pseudomonas aeruginosa* wurden mit IF CRISPR-Cas-Systemen gentechnisch verändert. Das ermöglicht die Entdeckung von Anti-Resistenz-Medikamenten für klinisch isolierte MDR-Erreger.

Um die Möglichkeiten der Genombearbeitung in *Bacillus subtilis* zu erweitern, wurde ein neues Konzept entwickelt, das Cre-Cas-System, das Cre-lox72 und CRISPR-Cas9 zu einer effektiven und bequemen Methode kombiniert (Cai und Chen, 2021). Damit können Antibiotikaresistenzen von *B. subtilis* wirksam behandelt werden.

Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotikaresistenzgene verbreiten sich über Plasmide und Konjugation. Liu et al. (2022c) untersuchten verschiedene gentechnische Verfahren zur Inaktivierung dieser Gene in Stämmen von *Escherichia coli* und *Pseudomonas*.

Genetische Variationen von *Mycobacterium tuberculosis* können mit antigenen Variationen und Immunevasion assoziiert sein, was die Pathogenese von *M. tuberculosis* erschwert. Hypervirulente *M. tuberculosis*-Stämme enthielten mehrere große Sequenzdeletionen, darunter einige CRISPR-Loci und mehrere Cas-Gene. Zhai et al. (2018) kamen zu dem Schluss, dass das eine bestimmte Mutation im Genom wichtig ist, um die Wirtsabwehr zu dämpfen.

Liu et al. (2022d) verbesserten ein kleines Cas9-Ortholog von *Streptococcus pasteurianus* für eine effiziente in vivo Genom-Editierung. Das neue Toolset ist einsatzbereit für effiziente Genmodifikationen und therapeutische Anwendungen.

Techniken zur Überwachung von Transkriptionsfaktor (TF) - Promotor-Wechselwirkungen in situ in lebenden Bakterien fehlen. Wang et al. (2022b) entwickelten einen Ganzzell-TF-Promotor für *E. coli*. Es wurde eine handhabbare und sensitive TF-Promotor-Bindungs-Methode etabliert, die neue Möglichkeiten für die funktionelle Annotation von Bakterien und für Untersuchungen der Bakterien-Wirt-Schnittstelle bietet.

Um die Eigenschaften von UV-induzierten Mutationen besser zu verstehen, führten Alves et al. (2022) eine vollständige Genomanalyse von Mutationen durch, die bei überlebenden Bakterien von *Caulobacter crescentus* vorhanden waren. Die Autor*innen fanden mit vollständigen Gensequenzierungen durchschnittlich 3,2 Mutationen/Genom in bestrahlten Proben, die ausschließlich aus Basensubstitutionen bestanden.

2.2.2.7 Auswahl nGVO Bakterien

Bei der Auswahl geeigneter Beispiellarten aus der Vielzahl von Anwendungsfeldern gentechnisch veränderter Bakterien müssen zunächst Produktionsverfahren, die in geschlossenen Systemen stattfinden, und möglichen Anwendungen im Freiland unterschieden werden (Abb. 3, Tab. 2). Bei ersteren ist eine absichtliche Ausbringung genveränderter Bakterienstämme nicht vorgesehen. Daher reduziert sich die Liste möglicher Beispiellarten auf solche, für die mögliche und tatsächliche Anwendungen in offenen Systemen beschrieben wurden. Solche Anwendungen sind Entwicklungen von biologischen Pestiziden und natürliche Düngung. Bei solchen Anwendungen kamen in der jüngsten Vergangenheit *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* zum Einsatz. Beide Arten sind fakultativ anaerob und überlebensfähig in aquatischen Bereichen. Beide Arten sind sehr gut beschrieben, und ihr Genom ist jeweils vollständig sequenziert. *E. coli* wird zudem als Indikator für die Verunreinigung von Trink- und Badewasser genutzt, d.h. für diese Art existieren bereits weit verbreitete Monitoringverfahren. Es gibt bisher wenige Anwendungen von neuen gentechnischen Methoden, die an *B. subtilis* im Freiland erforscht

wurden, der Wildtyp von *B. subtilis* wird aber schon in Freilandanwendungen genutzt. Somit ist absehbar, dass mit neuen Techniken veränderte Stämme von *B. subtilis* entsprechend auch Anwendung finden können. Daher wurde festgelegt, *B. subtilis* als nGVO weiter zu untersuchen.

2.2.2.8 Steckbrief von *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis oder Heubazillus ist ein weitverbreitetes grampositives, stäbchenförmiges, begeißeltes Bodenbakterium. Wie alle Bakterien der Gattung *Bacillus* ist *B. subtilis* ein fakultativ anaerob wachsender Endosporenbildner. *B. subtilis* weist eine Größe von 2 bis 3 µm auf, die Dicke liegt bei 0,7 bis 0,8 µm. Seine Sporen sind elliptisch mit einer Länge von 1 bis 1,5 µm und einer Breite von 0,6 bis 0,9 µm. Die Zellen sind peritrich begeißelt und können sich dadurch schnell fortbewegen. Das Bakterium wird von einer grampositiven Zellwand umgeben.

B. subtilis ist ubiquitär verbreitet und kann aus Boden, Staub und Luft isoliert werden. Als Bodenkeim kommt er häufig auf Pflanzen und Pflanzenmaterial vor. Die Generationszeit beträgt bei optimalem Nährstoffangebot, optimaler Sauerstoffversorgung und einer optimalen Wachstumstemperatur von 40 °C ca. 45 Minuten.

B. subtilis ernährt sich chemoorgano-heterotroph. *B. subtilis* besiedelt sowohl die Rhizosphäre als auch die oberen Schichten des Bodens. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wird bevorzugt Glucose genutzt. Zur Energiegewinnung dient Sauerstoff als bevorzugter terminaler Elektronenakzeptor. Unter anaeroben Bedingungen können die Zellen bei Glucose- und Nitrat-Anwesenheit noch Energie für langsames Wachstum erzeugen. Sind keine als Elektronenakzeptor nutzbaren Substrate verfügbar, dann ist *B. subtilis* in der Lage, auch ausschließlich durch Gärungsstoffwechsel zu überleben.

Widrigen Umweltbedingungen versucht sich *B. subtilis* durch aktive Fortbewegung zu entziehen. Diese Art kann Endosporen bilden, die lange Perioden überdauern. Eine weitere Eigenschaft ist die Ausbildung der Kompetenz (Fähigkeit, im umgebenden Medium frei vorhandene DNA aufzunehmen).

In der Landwirtschaft wird *B. subtilis* als biologisches Pflanzenschutzmittel kommerziell eingesetzt. Lipopeptide wirken fungizid und gegen bakterielle Pflanzenschädlinge.

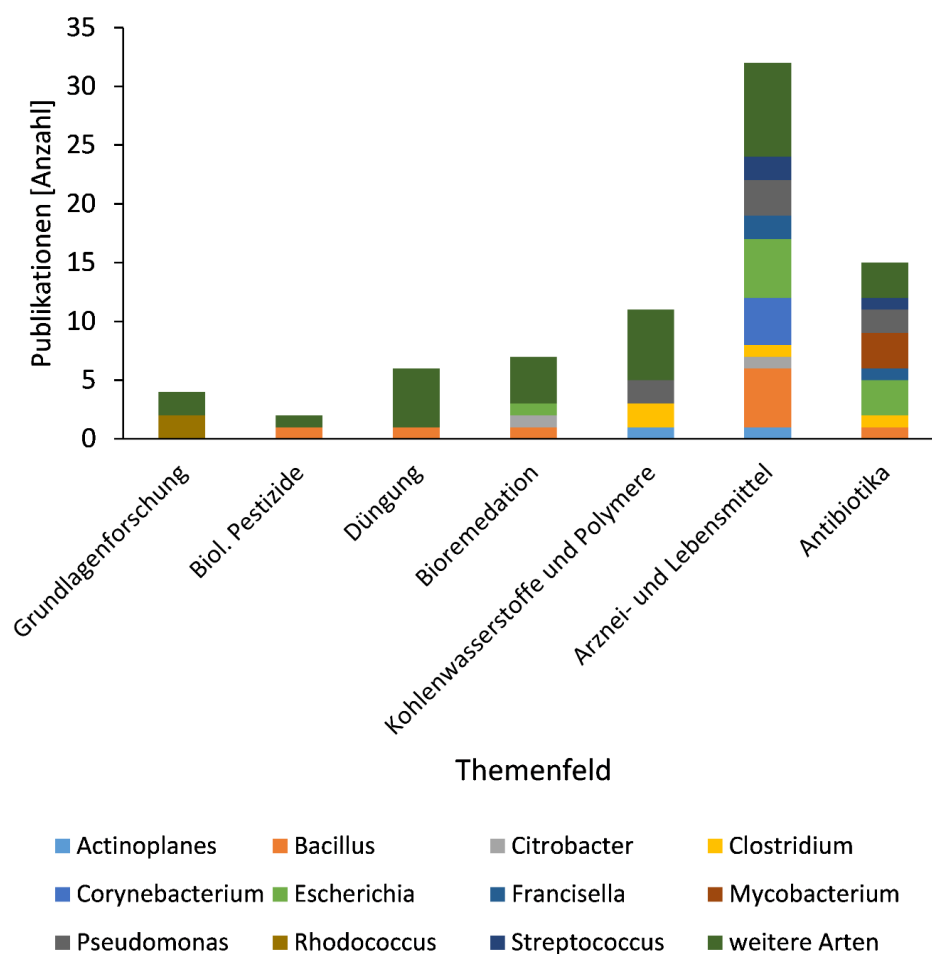


Abb. 3: Anzahlen der selektierten Publikationen zu neuen gentechnischen Methoden bei Bakterien gegliedert nach Gattungen und Themenfeldern.

Tab. 2: Tabellarische Zusammenfassung der Verteilung und Aufschlüsselung der Gattungen von Bakterien, aus denen sich die Darstellung „weiterer Arten“ zusammensetzt.

	Grundlagenforschung	Biol. Pestizide	Düngung	Bioremediation	Kohlenwasserstoffe und Polymere	Arznei- und Lebensmittel	Antibiotika
weitere Arten Summe	2	1	5	4	6	8	3
7WMA2		1					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1						
<i>Actinomyces frankia</i>			1				
<i>Agrobacterium sp.</i>					1		
<i>Arcobacter butzleri</i>					1		

	Grundlagenforschung	Biol. Pesticide	Düngung	Bioremediation	Kohlenwasserstoffe und Polymere	Arznei- und Lebensmittel	Antibiotika
<i>Aurantiochytrium sp.</i>						1	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>			1				
<i>Caulobacter crescentus</i>							1
<i>Comamonas testosteroni</i>					1		
<i>Enterobacter sp.</i>				1			
<i>Gluconobacter oxydans</i>						1	
<i>Halomonas spp.</i>						1	
<i>Klebsiella variicola</i>			1				
<i>Kosakonia sacchari</i>			1				
<i>Lactococcus lactis</i>						1	
<i>Leclercia</i>				1			
<i>Lelliottia</i>				1			
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>					1		
<i>Mycolicibacterium neoaurum</i>						1	
<i>Paenibacillus sp.</i>					1		
<i>Photorhabdus luminescens</i>						1	
<i>Proteiniphilum saccharofermentan</i>						1	
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>							1
<i>Shewanella oneidensis</i>				1			
<i>Sinorhizobium meliloti</i>			1				
<i>Staphylococcus aureus</i>							1
<i>Streptomyces sp.</i>						1	

	Grundla- genfor- schung	Biol. Pesti- zide	Dün- gung	Biore- meda- tion	Kohlenwasser- stoffe und Poly- mere	Arznei- und Lebensmit- tel	Anti- bio- tika
<i>Vibrio mimicus</i>							1
<i>Zymomonas mobi- lis</i>	1						

2.2.3 Gentechnisch veränderte Mikroalgen

Mikroalgen sind eine äußerst diverse, polyphyletische Gruppe von Mikroorganismen. Der Begriff Mikroalge umfasst dabei neben eukaryotischen Algen auch einige Prokaryoten. Mikroalgen zeichnen sich durch ihre geringe Größe, ihre vergleichsweise einfache Zellstruktur und ihre phototrophe Lebensweise aus. Ihre Vertreter reichen von einzelligen bis hin zu vielzelligen Formen. Sie kommen vorwiegend in aquatischen Lebensräumen vor, aber auch am Boden, in der Luft, an Baumrinden oder sogar an Tieren (Daneshvar et al. 2021). Mikroalgen weisen aus wirtschaftlicher und ökologischer Sicht einige Vorteile gegenüber anderen Gruppen von Organismen auf. Sie haben eine schnelle Wachstumsrate, eine hohe Photosyntheseeffizienz, gelten als flexibel und anpassungsfähig, sind stressresistent, lassen sich leicht kultivieren und eignen sich zur Produktion von einer Vielzahl von Stoffen (Yap et al. 2021).

Die CO₂-neutrale, nachhaltige Produktion von Lipiden, Fettsäuren, Pigmenten, Alkoholen, Terpenen, Biopolymer-Vorläufern, kommerziellen Enzymen und weiteren Verbindungen durch Mikroalgen spielt in der Biotechnologie eine große Rolle. Die Mikroalgen-Biotechnologie findet dabei Anwendung im Bereich der Futter- und Lebensmittel, Biodünger, Kosmetika, Therapeutika oder der Biokraftstoffe (Ng, Keskin, und Tan 2020). Die Produktionskosten sind im Vergleich zu weniger nachhaltigen Alternativen allerdings noch relativ hoch (Naduthodi et al. 2019). Die genetische Veränderung von Mikroalgen kann dabei zu einem verbesserten Potential der Algen für die biotechnologische Anwendung führen und sogar die Herstellung von Verbindungen oder dem Hinzufügen von Merkmalen ermöglichen, die normalerweise nicht in der Alge vorhanden sind (Hallmann 2019). Im Vergleich zu höheren Pflanzen, Pilzen und Bakterien sind die für Mikroalgen verfügbaren molekularen Techniken jedoch bisher eher begrenzt (Fu et al. 2019).

Dieses Review soll einen Überblick über die Entwicklung solcher molekularen Techniken zur genetischen Editierung von Mikroalgen geben. Zudem werden Anwendungsbeispiele von genetisch editierten Algen im biotechnologischen Kontext zusammengetragen.

2.2.3.1 Grundlagenforschung

Bisher wurde hauptsächlich grundlegende Forschung zur Etablierung und Optimierung von gene editing-Methoden in Mikroalgen betrieben. In der Studie beziehen wir uns dabei nur auf die Entwicklungen der letzten sechs Jahre (ausgehend vom Zeitpunkt der Recherche (2023)).

Chlamydomonas reinhardtii

In einer physiologischen Studie von Greiner et al. (2017) wurden verschiedene gene editing-Methoden in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* angewandt: Die Plasmid-basierte Expression des SpCas9-bzw. des SaCas9-Enzyms, die Einbringung eines SpCas9 Ribonukleoproteins (RNP) und ZFNs. Die Mutageneseeffizienz in den Transformaten betrug zwischen 5 und 15 %, wobei diese beim Plasmid-basierten SaCas9 höher als beim SpCas9 war, bei dem RNP höher als genetisch codierten Varianten und bei ZFNs und RNP ungefähr gleich. Die ZFNs

führten allgemein eher zu HR (homologe Rekombination) und das Cas9 eher zu NHEJ (non-homologous end joining). Als Target dienten die Gene der Photorezeptoren COP1/2, COP3, COP4, COP5, aCRY, PHOT, UVR8, VGCC sowie die Gene des MAT3, KU80 und POLQ, die an der Regulierung des Zellzyklus und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Anhand des knock-out ließ sich auf die physiologischen Funktionen schließen, welche im Hinblick auf die Entwicklung und das Verhalten der *Chlamydomonas*-Alge von besonderem Interesse sind.

Jiang und Weeks (2017) verwendeten ein Hybrid-Konstrukt, bestehend aus Cas9 und sgRNA, zum gene editing in *Chlamydomonas reinhardtii*. Dieses Hybrid-Konstrukt besteht aus einem Cas9-Gen, das ein künstliches Intron mit einem eingefügten sgRNA-Gen enthält und so die Anzahl der benötigten Gene von zwei auf eins reduziert. Durch die Verwendung des Hybrid-Konstruktes zum knock-out des fkb12-Gens konnte die Mutageneseeffizienz dabei auf $\sim 3 \times 10^7$ angehoben werden (im Vergleich zu $> 1,5 \times 10^9$ unter Verwendung herkömmlicher Cas9- und sgRNA-Gene). Des Weiteren führte die Transformation von arg7-8-Mutanten mit dem Cas9/Intron-sgRNA-Konstrukt und ssDNAs, die komplementär zum Argininosuccinat-Lyase-Gen (arg) sind, zu einer erfolgreichen homologen Rekombination zur Komplementierung des arg7-8-Gen. Zum Aufzeigen eines praktischen Ansatzes wurde zusätzlich das Acetolactat-Synthase-Gen (als) unter Verwendung von ssDNAs und einem Cas9/Intron-sgRNA-Konstrukts mutiert, wobei entsprechende Mutanten resistent gegen das Herbizid Sulfometuron-Methyl sind.

In einer anderen Studie konnte Homologie-gerichtetes gene editing in *Chlamydomonas reinhardtii* durch Verwendung der Cpf1-Endonuklease erreicht werden. Eine präzise und gezielte homologe Rekombination konnte mittels CRISPR/Cpf1-RNP und einzelsträngigen Oligodesoxynukleotiden (ssODNs) als Reparaturvorlage mit einer Effizienz von bis zu 10 % beobachtet werden. Als Target dienten hier die Gene fkb12, ftsy, srp43 und pht7 (Ferenczi et al. 2017).

Im selben Jahr wurde erstmals die CRISPRi-Methode zur Regulation der Genexpression in Mikroalgen von Kao und Ng (2017) in *Chlamydomonas reinhardtii* etabliert. Für einen Proof-of-Concept wurde zuerst die Expression des exogenen rfp-Gen mittels CRISPRi reprimiert, wobei eine Effizienz von 94 % erreicht werden konnte. Anschließend wurde für einen Proof-of-Function ein endogenes Chlamydomonas-Gen mittels CRISPRi editiert. Die Hemmung der Expression des pepc1-Gens führte zu einer Erhöhung der Lipidproduktion sowie des Lipidgehalts (vgl. 2.2.3.2 Steigerung der Lipidproduktion).

Guzmán-Zapata et al. (2019) nutzten eine transiente Expression der SpCas9 CDS und der sgRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* zum knock-out des Adenin-Phosphoribosyl-Transferase-Gens (apt). Der funktionelle knock-out des apt-Gens führt dabei zu einer Resistenz der Zelle gegen die ansonsten toxische Verbindung 2-Fluoradenin (2-FA). Die Mutageneseeffizienz betrug 3 % bzw. 30 % bei einer vorherigen Selektion von 2-FA-resistenten Kolonien. Das Adenin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen eignet sich somit als auxotropher Selektionsmarker für das CRISPR/Cas9-vermittelte gene editing.

Bei der von Kang et al. (2020) veröffentlichten Publikation handelt es sich um eine methodische Studie, die einen Teil der Grundlagenforschung des CRISPR/Cas9-Systems darstellt. Die Einbringung des Cas9-RNPs (Cas9/sgRNA-Komplex) in *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgte dabei unter Verwendung des, in einer nicht-kovalenten Form vorliegen, zellpenetrierenden Peptids pVEC. Die Funktionalität dieser Methode wurde durch den knock-out von zwei endogenen Markergenen nachgewiesen: Des Gens der β -Untereinheit der Tryptophan-Synthase (maa7, Mutation führt zu einer Resistenz gegen 5-Fluorindol) und der Peptidyl-Prolyl-cis-trans-

Isomerase (fkb12, Mutation führt zu einer Resistenz gegen Rapamycin). Es wurde eine Mutationseffizienz von $1,1 \times 10^{-6}$ erreicht. Zudem wurde die off-Target-Effekt-bedingte Zytotoxizität des Cas9-Proteins und des RNP-Komplexes auf die Algenzellen untersucht und gezeigt, dass das Cas9-Enzym ohne sgRNA eine höhere Zytotoxizität zeigte als der RNP-Komplex.

Angstenberger et al. (2020) konnten zeigen, dass eine Synchronisierung der Zellen (durch Langzeitkultivierung unter spezifischen Wachstumsbedingungen) in *Chlamydomonas reinhardtii* zu einer Optimierung der CRISPR/Cas9-vermittelten Mutagenese führt. Die Zellsynchronisierung steigert die Transformationseffizienz und ermöglicht einen Einfluss auf das Verhältnis zwischen NHEJ und HR. Als Target wurde in der Studie das Gen *cpfts* verwendet, welches am Aufbau des Lichtsammelsystems in den Thylakoidmembranen beteiligt ist und dessen knock-out zu einem blassgrünen Phänotyp führt.

Dhokane et al. (2020) beschäftigten sich ebenfalls mit der Optimierung des CRISPR/Cas9-vermittelten gene editings für eine höhere Mutageneseeffizienz in *Chlamydomonas reinhardtii*. Als Target wurde das Gen *maa7* (β -Untereinheit der Tryptophansynthase, Mutanten resistent gegen 5-Fluorindol) ausgewählt, welches durch einen CRISPR/Cas9-RNP-Komplex mutiert wurde. Durch eine Optimierung der Transformations-Pipeline und der Konzentration des RNP-Komplexes konnte eine Mutageneseeffizienz von 60.87 - 81.03 % erreicht werden.

In der Studie von Park et al. (2020) wurde das CRISPR/Cas9-Transformationsprotokoll für *Chlamydomonas reinhardtii* so modifiziert, dass auch die Verwendung von verbreiteten Elektroporationsgeräten möglich ist (bisher nur Verwendung der komplexen Elektroporationswellenform des NEPA21 Super Elektroporators möglich). Als Target wurde dabei das Phytoene-Synthase-1-Gen (*psy1*) ausgewählt, welches für ein Enzym der Carotinoid-Biosynthese codiert. Ein funktioneller knock-out dieses Gens verhindert die Bildung zyklischer Carotinoide, die für die Stabilisierung des Chlorophylls wichtig sind. Entsprechende Mutanten enthalten kein funktionelles Chlorophyll und erscheinen weiß gefärbt. Bei einer Elektroporation mit einfachen Wellenformen war es nötig die Konzentration des Cas9-Expressionsvektors zu erhöhen sowie die Erholungszeiten für die transformierten Kolonien. Jedoch konnte eine gene editing-Effizienz erreicht werden, die mit der für den NEPA21 Elektroporators berichteten zu vergleichen ist.

Die Autor*innen Kim et al. (2020) beschreiben ebenfalls einen Ansatz, mit welchem die CRISPR/Cas9 Methode für das gene editing in *Chlamydomonas reinhardtii* weiter optimiert werden kann. Der CRISPR/Cas9-vermittelte knock-in eines Antibiotika-Resistenzgens in das endogene *fts*-Gen, führte erfolgreich zu einer Inaktivierung. Durch die Kombination aus RNP-Komplex und Antibiotika-Resistenzgen sowie einer Optimierung des RNP-Komplexes konnte dabei eine 2.5-fach höhere Mutageneseeffizienz erreicht werden. Des Weiteren konnte die ortspezifische Insertion eines langen DNA-Fragments erfolgen, welche zur heterologen Expression der Luciferase und des mVenus führte. Der hier vorgestellte standortspezifische, CRISPR/Cas9-vermittelte knock-in eignet sich zum knock-out sowie zur effizienten (Über-)Expression eines Gens und vermeidet negative Positionseffekte.

Picariello et al. (2020) stellen in einer Studie die Entwicklung der Methode TIM zur CRISPR/Cas9-vermittelten Insertionsmutagenese vor. Diese Methode basiert auf der Transfektion eines Cas9-gRNA-RNPs und einer exogenen doppelsträngigen (Donor-)DNA in die Zelle. Die Donor-DNA umfasst dabei genspezifische Homologiearme und ein integrales Antibiotikaresistenzgen, welches an dem vom Cas9 generierten Doppelstrangbruch eingefügt wird. In *Chlamydomonas reinhardtii* konnte diese Methode erfolgreich zum knock-out von sechs

verschiedenen Genen (fap70, ift81, mot17, cdpk13, cep131, ift43) verwendet werden. Die Mutationseffizienz für die sechs verschiedenen Gene lag zwischen 40 % und 95 %. Zudem war der gleichzeitige knock-out zweier Gene (fap70, ift81) möglich.

Von Akella et al. (2021) wurde das CRISPR/Cas9-RNP zusammen mit einzelsträngigen Oligodesoxynukleotiden (ssODNs) in *Chlamydomonas reinhardtii* eingebracht, um ein präzises und "narbenloses" Einfügen von Fremd-DNA zu ermöglichen. Dabei konnte bestätigt werden, dass die ssODNs für die DNA-Synthese während der homologen Reparatur des Doppelstrangbruchs (DSB) als Vorlagen verwendet wurden. Bei der Co-Editierung der Gene ftsY bzw. wdtd1 und dem Marker-Gen ppx1 wurden in ~ 1 % der selektierten Transformanten präzise Änderungen in den Target-Genen nachgewiesen. Zudem konnten in der Studie die Gene ppx1 (Protoporphyrinogen-IX-Oxidase) und als1 (Acetolactat-Synthase) als geeignete, co-editierbare Selektionsmarker-Gene etabliert werden.

Weiterführend dazu wurden die Grundlagen der Reparatur von Cas-induzierten Doppelstrangbrüchen (DSB) mit Hilfe von einzelsträngigen Oligodesoxynukleotiden (ssODNs) als Template in *Chlamydomonas reinhardtii* von Ferenczi et al. (2021) aufgeschlüsselt. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Einzelstrang-Matrizen-DNA-Reparatur (SSTR) wurden an Cas12a-induzierten DNA-Brüchen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ssODNs bei der SSTR von Cas12a-induzierten DSBs in das Genom eingebaut werden. Zudem wurde beobachtet, dass dieser Prozess unabhängig von der Rad51-abhängigen homologen Rekombination (HR) und dem Fanconi-Anämie-Pathway ist und alleine durch das alternative End-Joining-Enzym Polymerase θ (codiert durch polq) vermittelt wird. Des Weiteren wurde erkannt, dass der SSTR-Mechanismus in starker Konkurrenz zu dem nicht-homologem End-Joining (NHEJ) steht, welches selbst in Gegenwart von ssODNs den Großteil der DSB-Reparatur übernimmt.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch in der Studie von Sizova et al. (2021) angestellt, in welcher die Rolle von zwei endogenen *Chlamydomonas reinhardtii*-Genen in Bezug auf die CRISPR-Cas9-vermittelte Mutagenese analysiert wurde. Dafür wurden die Gene des KU80/KU70-Proteinkomplexes und das Gen der DNA-Polymerase-Theta (polq) mittels CRISPR-Cas9 ausgeknockt und die daraus resultierenden Veränderungen auf das CRISPR-basierende gene editing untersucht. Passend zu den Ergebnissen von Ferenczi et al. (2021) konnte beobachtet werden, dass die DNA-Polymerase θ den Hauptbeitrag für die homologiegesteuerte Reparatur (HDR) und die zufällige Integration von Transgenen mit CRISPR/Cas leistet, während KU70/KU80 eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

In der Studie von Nievergelt et al. (2022) wurde das CRISPR-Cas-System für den knock-in von endogenen Markierungen in *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet. Durch eine Co-Transformation mit dem Cas9-RNPs und spezifischen Konstrukten konnte eine Methode zur narbenlosen Integration von Fusions-Tags oder Sequenzmodifikationen neben die CDS beliebiger Proteine entwickelt werden.

Freudenberg et al. (2022) beschreiben die Etablierung eines neuartigen auxotrophen Markersystems für das CRISPR/Cas9-vermittelte gene editing in der Alge *Chlamydomonas reinhardtii*. Der knock-down des Spermidinsynthase-Gens (sdp1) führte zur einer Spermidin-Auxotrophie, welche eine Selektion der Mutanten ermöglicht. Zudem konnte eine Effizienzsteigerung der Cas9-sgRNA-RNP-vermittelten Mutagenese von 10 auf 66 % erreicht werden, indem die Vorkultur unter Stickstoffmangel gesetzt wurde.

Chlorella sp.

Die *Chlorella*-Arten finden vielfach industrielle Anwendung, werden aber aufgrund ihres hohen Gehalts an Guanin und Cytosin bisher kaum zur DNA-Mutagenese verwendet (Lin, Lin, und Ng 2022).

In der Studie von Kim et al. (2021) wurde die CRISPR/Cas9-Methode als Genome Editing Tool in der Grünalge *Chlorella vulgaris* weiter etabliert. Mittels DNA-basierter sowie RNP-basierter Mutagenese konnte das Gen der Nitratreduktase (nr) und der Adeninphosphoribosyltransferase (apt) erfolgreich ausgeknockt werden. Ein knock-out dieser Gene ermöglichte eine negative Selektion gegen Kaliumchlorat bzw. 2-Fluoradenin anstelle von Antibiotika.

Coccomyxa sp.

Yoshimitsu, Abe, und Harayama (2018) verfassten den ersten Bericht über eine erfolgreiche Anwendung von CRISPR/Cas9 in der industriell genutzten Grünalge *Coccomyxa*. Mittels eines RNP-Komplexes, bestehend aus dem Cas9-Protein und der guide-RNA konnte das Gen des SRP-Rezeptors FTSY mit einer Effizienz von 0,01 % mutiert werden.

Euglena gracilis

Durch Nomura et al. (2019) wurde erstmals eine transgenfreie zielgerichtete Mutagenese in *Euglena gracilis* durchgeführt. Mittels Cas9-RNPs konnte das gsl2-Gen (glucan synthase-like 2) mit einer Mutageneserate von bis zu > 80 % editiert werden. Die hohe Editierungseffizienz liegt dabei möglicherweise darin begründet, dass *Euglena* im Gegensatz zu anderen Mikroalgen keine Zellwand besitzt.

Nannochloropsis sp.

Die Gattung *Nannochloropsis* gehört nicht zu den Grünalgen, sondern wird dem Taxon *Eustigmatales* zugeordnet. Verruto et al. (2018) gelang für *Nannochloropsis gaditana* erstmals ein markerloses gene editing durch eine Kombination der Cre-Rekombinase und der Cas9-Nuklease. Die Kombination beider Enzyme erlaubt die Entfernung des Selektionsmarkers sowie die gleichzeitige Editierung mehrerer Loci, durch welche die Komplementation eines knock-out in funktionell redundanten Genfamilien umgangen werden kann. Für einen Proof-of-Concept wurde erst der markerlose knock-out des Acyl-CoA-Oxidase-Gens (aco1) durchgeführt. Anschließend wurde durch eine gezielte Insertion in den 5'-UTR des ZnCys-Gens („Promotor-Bashing“) dessen Expression verringert und so die Lipidproduktivität der Alge verdoppelt (vgl. 2.2.3.2 Steigerung der Lipidproduktion). Des Weiteren konnten Mutanten erzeugt werden, welche durch den knock-out von sieben Genen der Familie der Lichtsammelkomplexe, eine reduzierte photosynthetische Antennengröße aufweisen.

In der Studie von Poliner et al. (2019) wurde ein episomales CRISPR/Cas9-System zum Transgen- und Marker-freien gene editing in *Nannochloropsis oceanica* verwendet. Als Target wurde dabei das Nitrat-Reduktase-Gen (nr) ausgewählt, da entsprechende knock-out Mutanten sich leicht selektieren lassen. Der Nachweis der CRISPR/Cas9-Komponenten innerhalb der Zellen konnte über einen, an das SaCas9 fusionierten Reporter (Cas9-Nlux-HA), erfolgen. Die eingebrachten Episomen konnten anschließend entfernt werden, und somit konnten nicht-transgene, Marker-freie Nitrat-Reduktase-knock-out-Linien generiert werden.

Naduthodi et al. (2019) verwendeten erstmals einen Cas-RNP-Komplex innerhalb der *Nannochloropsis*-Gattung. Das Gen der Nitratreduktase (nr) wurde als Target gewählt (siehe Poliner et al. 2019). Es konnte allgemein eine höhere Mutationsrate erzeugt werden als mit den

bisher verwendeten Plasmid-basierten Cas9-Methoden. Von den untersuchten Cas-Varianten (SpCas9 sowie drei Cas12a-Varianten) wies dabei das FnCas12a-Protein aus *Francisella novicida* die höchste Effizienz auf.

Kurita et al. (2020) editierten das Nitratreduktase-Gen (*nr*) und das Gen der am Glycerolipid-Biosyntheseweg-beteiligten Acyltransferase (*lpat1*) mittels TALENs in der Mikroalge *Nannochloropsis oceanica*. Die beiden Gene wurden ausgewählt, da potentielle knock-out-Mutanten sich phänotypisch vom Wildtyp unterscheiden (NR-Mutanten verlieren die Fähigkeit mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle zu wachsen, LPAT1-Mutanten weisen einen blassgrünen Phänotyp auf.). Im Fall der beiden Gene konnte auf genetischer Ebene eine sehr hohe Editierungs-Effizienz nachgewiesen werden. Für das *nr*-Gen konnte der knock-out auch auf phänotypischer Ebene beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde bei dem *lpat1*-Gen keine phänotypische Veränderung und somit auch kein funktioneller knock-out des Gens nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt die Wichtigkeit des richtigen Designs der TALENs zur Erzeugung eines funktionellen knock-out auf.

In einer Studie von Wang et al. (2021) wurde die CRISPR/Cas9-Methode erstmals zur gezielten Deletion großer genomischer Regionen in Mikroalgen angewendet (genome engineering). Regionen mit geringer Expression (LERs) wurden als "nicht essentielle" chromosomale Regionen identifiziert, wobei zwei der größten LERs anschließend mittels Episom-basiertem CRISPR/Cas-System entfernt wurden. Im Falle der einzelnen Deletion des LER1 zeigten die Algen keine signifikante Veränderung des Wachstums, der Lipidproduktion oder der Photosynthese. Im Fall der LER1-LER2-Doppeldeletion wiesen die Mutanten sogar ein etwas höheres Wachstum und eine etwas höhere Biomasseproduktivität als der Wildtyp auf. Zum einen trägt diese Studie dazu bei, die Grundlagen der Genomstruktur und -funktion zu erforschen. Zum anderen stellt sie einen Ansatz zur Erzeugung eines 'minimal genomes' dar, welches potenziell vorteilhaft für biotechnologische Anwendungen sein könnte.

Durch Naduthodi et al. (2021) erfolgte die Etablierung neuer Möglichkeiten für das CRISPR-basierte gene editing in der Alge *Nannochloropsis oceanica*. Dabei wurden folgende Editierungsstrategien entwickelt: Ein auf dem Cas12a-RNP und der homologiegesteuerten Reparatur (HDR) basierendes, markerloses gene editing, welches zur Generierung von markerlosen Mutanten genutzt werden kann; zum anderen ein Episom-basiertes CRISPR-Cas12a-System für das gene editing mit einer sehr hohen Mutageneseeffizienz. Des Weiteren konnte eine effektive Strategie für ein Multiplexes genome-engineering mittels CRISPR-Cas12a entwickelt werden, welches zur gleichzeitigen Editierung von drei verschiedenen Genen genutzt werden konnte. Abschließend wurde erstmals ein auf Cas9 bzw. Cas12a basierendes CRISPRi-Tool in der Art *Nannochloropsis oceanica* etabliert.

Kurita et al. (2022) entwickelten ein Editierungssystem für die Alge *Nannochloropsis oceanica*, bei dem die TALEN-Expressionsvektoren nach der Generierung von Mutationen wieder entfernt werden können. Durch auf dem Plasmid enthaltene Hefezentromere und autonome Replikationssequenzen (CEN/ARS) konnte eine TALEN-vermittelte Mutagenese des endogenen Nitratreduktase-Gens (*nr*) erreicht werden, sowie eine anschließende Entfernung des Expressionsvektors.

In einer Studie von Wie et al. (2022) konnte mittels CRISPRa die Expression des endogenen *g1248*-Gens (potenzielle Methyltransferase) in *Nannochloropsis oceanica* bis zu 6-fach erhöht werden. Im Falle einer hohen CO₂-Konzentration konnte dabei ein erhöhtes Wachstum und eine gesteigerte Photosyntheserate im Vergleich zum Wildtyp (WT) beobachtet werden.

Phaeodactylum tricornutum

Serif et al. (2017) veröffentlichten eine Pipeline für den TALEN-vermittelten Gen-knock-out in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*. Diese umfasst die Auswahl einer geeigneten TALEN-Zielstelle zur Vermeidung von potenziell unwirksamen und/oder off-Target-anfälligen TALEN-Konstrukten sowie die effiziente Transformation von *Phaeodactylum tricornutum* mit TALEN-Konstrukten unter Verwendung von zwei Antibiotika-Resistenzmarkern und ein effektives Screening der Transformanten. Aufgrund dessen, dass der Phänotyp von aureo1a-Mutanten (blaulichtabhängiger Transkriptionsfaktor Aureochrome) bereits bekannt ist, wurde dieses Gen für einen Proof-of-Concept als Target ausgewählt. Es wurde dabei eine Mutageneseeffizienz von 50 % erreicht, wobei der Anteil biallelische knock-out-Linien unter den Transformanten 21 % betrug.

Slattery et al. (2018) erzeugten eine Minderung der Expression (knock-down) des DNA-Ligase-IV-Gens (ligIV) in *Phaeodactylum tricornutum* mittels Antisense-RNA. Der knock-down dieses Gens bedingte die Hemmung des zentralen Ligationsschritts im NHEJ-Reparaturweg, welcher durch die LigIV katalysiert wird. Durch diese Interferenz wird eine Steigerung der HR-Frequenz erreicht, welche eine spezifische Integration von DNA an einer gewünschten Stelle im Genom sowie eine allgemein effizientere Transformation ermöglicht.

In einer Studie von Russo et al. (2018) wurden unerwünschte, durch das CRISPR/Cas9-System-verursachte Veränderungen im Genom in *Phaeodactylum tricornutum* untersucht. Dafür wurde das Episom-basierte CRISPR-Cas-System mittels bakterieller Konjugation in die Zelle eingebracht und zum knock-out des phatr3_J46193-Gens verwendet. Bei dieser Variante der Transformation und Expression des CRISPR-Cas-Systems sollen die Komponenten nur transient in der Zelle vorliegen und somit weniger off-Target Effekte verursachen. Anschließend erfolgte eine Sequenzierung des gesamten Genoms zur Detektion von möglichen off-Target Effekten, wobei in den Regionen, für die off-Targets vorhergesagt wurden, keine Mutationen gefunden werden. Sowohl im WT, als auch im Mutantenstamm wurden jedoch unterschiedliche, unspezifische Veränderungen nachgewiesen. Da derartige Veränderungen auch im WT detektiert werden konnten, wurden diese jedoch nicht in der Nukleaseaktivität vermutet, sondern als Auswirkung einer längeren Kultivierung.

In einer Studie von Serif et al. (2018) erfolgte die Identifizierung von zwei endogenen Selektionsmarkergenen in *Phaeodactylum tricornutum* mittels TALENs und Cas9-RNP-Komplex (UMPS - knock-out führt zu Resistenz gegen 5-Fluororotsäure (5-FOA) und APT - knock-out führt zu Resistenz gegen 2-Fluoradenin (2-FA).). Durch die Kombination von RNPs, die eines dieser Markergene und das Gen eines Blaulicht-Photorezeptors (PtAureo1a) als Target haben, konnten Doppel-knock-out-Stämme mit einer Effizienz von 65 % bis 100 % erzeugt werden. Des Weiteren gelang es durch das Einbringen von sechs RNP-Komplexen einen *Phaeodactylum*-Stamm mit einem dreifachen knock-out zu generieren. Die Methode stellt dabei einen Ansatz dar, um die Redundanz von Genen innerhalb einer Genfamilie zu umgehen oder den Stoffwechsel auf die Produktion eines Stoffes von Interesse umzulenken.

Moosburner et al. (2020) beschreiben eine Optimierung der Episom-basierten CRISPR/Cas9-vermittelten Mutagenese in *Phaeodactylum tricornutum*. In dieser Studie wurde das Cas9 durch das 2A-Peptid transkriptionell an das Antibiotikaresistenzgen sh ble fusioniert, was eine Selektion auf das Cas9-Episom ermöglicht und somit die Mutageneseeffizienz erhöht. Zusätzlich wurde eine neue Episom-Klonierungsstrategie (basierend auf der Golden-Gate-Assembly-Methode) entwickelt, um E. coli-Klone zu identifizieren, die konjugierbare Episomen

beherbergen. Des Weiteren wurde eine Strategie zur Auswahl von *Phaeodactylum*-Zelllinien und zur Genotypisierung entwickelt, die manuelle Sequenzierung, TIDE-Sequenzierungsanalyse und einen T7-Endonuklease-Assay kombiniert und so die erforderliche Zeit zur Generierung von Mutanten zu verkürzt. Anhand der optimierten, episomalen CRISPR/Cas9 gene editing-Pipeline konnten anschließend Nitratreduktase-knock-out-Zelllinien bzw. Linien mit einem Doppel-knock-out der Gene *gs-2* (Glutaminsynthetase 2) und *cgogat* (Chloroplasten lokalisierte Glutamatsynthase) mit Mutageneseeffizienzen von 48 % bzw. 25 % in kurzer Zeit erzeugt und genotypisiert werden.

Picochlorum celeri

Durch Krishnan et al. (2020) erfolgte erstmals ein gene editing mittels Cas9-sg-RNA-PNP-Komplex in der Alge *Picochlorum celeri*. Durch den knock-out von zwei Genen wurde ein Proof-of-Concept durchgeführt. Als Target-Genen dienten dabei das Nitratreduktase-Gen und das Carotinoid-Isomerase-Gen (*CrISO*), welches im Carotinoid-Biosyntheseweg wirkt. Mutanten weisen eine Verringerung des Luteinspiegels auf. Es wurden im Falle des Nitratreduktase-Gens für ~ 6 % der Transformanten diploide Loss-of-Function-Mutanten generiert, beim Carotinoidisomerase-Gen lag der Anteil bei ~ 50 %. Die generelle Transformationseffizienz war jedoch sehr gering (~ 8 Transformanten pro 10^8 Zellen).

Thalassiosira pseudonana

In einer Studie von Belshaw et al. (2017) wurde die CRISPR/Cas-vermittelte homologe Rekombination in *Thalassiosira pseudonana* etabliert. Dabei handelt es sich um den ersten Bericht einer hocheffizienten homologen Rekombination (HR) in einem diploiden photosynthetischen Organismus. Das Silacidin-Gen konnte hier mittels CRISPR/Cas-Konstrukt und einer Donor-Matrix ausgeschaltet werden, wobei die Mutageneseeffizienz ~ 85 % betrug. Entsprechende knock-out-Mutanten wiesen eine signifikante Zunahme der Zellgröße auf, was auf eine Rolle des Silacidin-Gens in der Regulierung der Zellgröße schließen lässt.

Durch Nawaly, Tsuji, und Matsuda (2020) erfolgte die Etablierung der Cas9n-vermittelten Mutagenese in *Thalassiosira pseudonana*, welche präzise und relativ kurze biallelische Indels mit minimalen off-Target Effekten ermöglicht. Bei der Cas9-Nikase (Cas9n) handelt es sich um eine modifizierte Version des Cas9-Enzyms, welche nur Einzelstrangbrüche induziert und so die Anzahl von off-Target Effekten reduziert. In der Studie konnte das Gen der θ Carboanhydrase (*θca3*) erfolgreich durch Cas9n und paired-single-guide-RNAs ausgeknockt werden.

Volvox carteri

Ortega-Escalante et al. (2019) gelang erstmals die Generierung einer CRISPR/Cas9-vermittelten Mutagenese in der Grünalge *Volvox carteri*. Die CRISPR/Cas9-Komponenten wurden als Transgene in die Zellen eingebracht, wobei die Expression des SpCas9-Gens über einen induzierbaren Nitratreduktase-Promotor reguliert wurde. Als Target dienten die Gene *glsA*, *regA* und *invA*, da sich entsprechende knock-out-Mutanten phänotypisch gut erkennen lassen. Die Mutageneseeffizienz betrug dabei zwischen 0,01 % und 100 %. Anschließend wurde die Veränderung der Mutageneseeffizienz in Bezug auf eine konstitutive Cas9-Expression untersucht. Im Falle einer konstitutiven Expression der Endonuklease konnten jedoch keine Mutanten detektiert werden.

2.2.3.2 Steigerung der Lipidproduktion

Die Herstellung von Biodiesel aus Ölen hat als erneuerbare Energiequelle sowie als klimaneutraler Kraftstoff in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Eine der besten

Optionen zur Herstellung dieser Stoffe ist die Nutzung von Mikroalgen. Mikroalgen nutzen Sonnenlicht als Quelle für Stoffwechselenergie und können auf atmosphärisches CO₂ als Kohlenstoffquelle zurückgreifen, um daraus Öl zu synthetisieren. Die volumetrische Produktivität von Öl durch Mikroalgen ist jedoch immer noch gering. Eine gentechnische Erforschung und Modifikation der Mikroalgen zur Verbesserung der Ölsynthese ist daher einer der Schwerpunkte in der Mikroalgen-Biotechnologie (Ranjbar und Malcata 2022).

Chlamydomonas reinhardtii

Durch Kao und Ng (2017) wurde erstmals die CRISPRi-Methode zur Regulation der Genexpression in Mikroalgen etabliert (vgl. Grundlagenforschung). Durch die CRISPRi-induzierte Hemmung des *pepc1*-Gens konnte eine Steigerung der Lipidproduktion um 94,2 % bzw. eine Erhöhung des Lipidgehalts um 74,4 % in *Chlamydomonas reinhardtii* erreicht werden. Das Protein PEPC1 fungiert dabei als Regulator des Kohlenstoff-Stoffwechsels, einem mit der Lipidsynthese konkurrierender Stoffwechselweg.

In einer Studie von Kim et al. (2018) wurde eine Lysophosphatidsäure-Acyltransferase (*lpaat2*) in *Chlamydomonas reinhardtii* analysiert. Es konnte beobachtet werden, dass die Acyltransferase im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und eine prokaryotische Substratpräferenz besitzt. Die Ergebnisse der RNAi-vermittelten Repression des *lpaat2*-Gens deuten darauf hin, dass dieses Enzym für die Triacylglycerol (TAG)-Akkumulation im Falle eines Stickstoffmangels von Bedeutung ist.

Nguyen et al. (2020) nutzen die CRISPR/Cas9-Methode zum knock-out des *gdp8*-Gens aus der Familie der multifunktionalen Esterase/Lipase/Thioesterase (ELT). Die Inaktivierung dieses, am Abbau von Fettsäuren beteiligten Gens führte zu einer Hemmung des Lipidkatabolismus. Daraus hervorgehend konnte ein Anstieg der zellulären Lipidakkumulation von 22 auf 28 % und eine Veränderung in der FA-Zusammensetzung beobachtet werden.

Luo et al. (2021) untersuchten die Rolle von drei Cullins (CUL) in der Lipidbiosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* mittels RNAi. Cullins sind die molekulare Basis von Cullin-RING E3-Ubiquitin-Ligasen (CRL). Der knock-down der Gene *cul2* und *cul4* führte zu einem Anstieg des Lipid- und TFA-Gehalts, aber bedingte auch eine Abnahme der Biomasse. Im Falle des Gens *cul3* konnte hingegen nur eine leichte Veränderung des Lipid- und TFA-Gehalts beobachtet werden. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde die Vermutung angestellt, dass CUL2 und CUL4 vermutlich als Regulatoren der Lipidakkumulation fungieren.

In *Chlamydomonas reinhardtii* wurde durch einen CRISPR/Cas9-vermittelte knock-out die physiologische Bedeutung der genetischen Kompensation bei der TAG-Biosynthese unter abiotischen Stress untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden verwandten Gene *dggt1* (Typ-2-Diacylglycerol-Acyltransferase-1) und *pdat* (Phospholipid:Diacylglycerin-Acyltransferase) unter abiotischen Stressbedingungen eine genetische Komplementation auslösen können, welche zu einer Erhöhung des TAG-Gehalts zur Energiespeicherung führt (Lee et al. 2022).

Song et al. (2022) gelang die Generierung einer *Chlamydomonas reinhardtii*-Doppelmutante zur Produktion von mit Pigmenten-angereichertem Öl. Ein gleichzeitiger, CRISPR/Cas9 RNP-vermittelter knock-out der Gene *zep* (Zeaxanthin-Epoxidase) und *agp* (ADP-Glucose-Pyrophosphorylase) führt zu einer um 81 % höheren Produktivität von Makulapigment-angereichertem Öl als der herkömmliche zweistufige Prozess.

Chlorella sp.

Von Lin et al. (2019) wurde erstmals ein Bericht zum gene editing mittels CRISPR-Cas9 in der Alge *Chlorella vulgaris* veröffentlicht. Die Algen wurden mit einem (auf dem *Agrobacterium tumefaciens*-basierenden) Plasmid transformiert, welches die CDS des Cas9 mit sgRNA enthält. Durch einen erfolgreichen knock-down des Omega-3-Fettsäure-Desaturase-Gens (*fad3*) konnte eine Steigerung des Lipidgehalts um 46 % erreicht werden.

Lin et al. (2022) etablierten zwei neue Ansätze des CRISPR-Cas-vermittelten gene editings in der Mikroalge *Chlorella sorokiniana*: Die Genregulation über CRISPRa-VP64 (CRISPRa) und die Kopplung von CRISPRi und ASGARD (Adaptive Single Guide Assisted Regulation DNA). Beide Ansätze konnten von den Autor*innen erfolgreich zur Steigerung der Lipid- und Proteinproduktion eingesetzt werden.

Coccomyxa sp.

In der Studie von Takahashi et al. (2018) wurden durch den knock-out des ATP: α -D-Glucose-1-Phosphat-Adenylyltransferase-Gens (*agpl*) in *Coccomyxa sp.* stärkeleise Mutanten generiert. Während stärkeleise Mutanten in anderen Grünalgen (z. B. *Chlamydomonas*) zu einer höheren Lipidproduktivität führten, konnte dieser Zusammenhang hier nur teilweise bestätigt werden. Zwar konnte ein signifikant höherer Lipidhalt beobachtet werden, aber die Wachstumsrate nahm unter bestimmten Kultivierungsbedingungen im Vergleich zum WT ab. Die Autor*innen bezeichneten die Unterdrückung der Stärkebiosynthese zur Steigerung der Lipidproduktivität in Mikroalgen folglich als eine riskante Strategie, da diese zu einer geringeren Biomasseproduktivität führen kann.

Lobosphaera incisa

Lobosphaera incisa ist eine Grünalge, welche die langkettige, mehrfach ungesättigte Omega-6-Fettsäure (LC-PUFA) Arachidonsäure (ARA) in Triacylglycerolen (TAG) anreichert. Durch Kugler et al. (2019) wurden mittels RNAi *Lobosphaera incisa*-knock-down-Linien erzeugt. In der Studie sollte der knock-down des 5-Desaturase-Gens erfolgen, welcher in anderen Studien zur Akkumulation der DGLA (eine seltene Omega-6-LC-PUFA) führte. Es konnten zwei transgene Linien erzeugt werden, welche Veränderungen in ihrem LC-PUFA-Profil, ihrer ARA-Biosynthese-Genexpression und ihrer Lipidklassenverteilung zeigten. Während die erste jedoch eine Mutation in einem anderen Gen (6-Elongase-Gen) trug, wurde für die zweite der genaue genetische Hintergrund nicht ermittelt (vermutlich Mutation im 12-Desaturase-Gen). Die Mutanten besaßen unter anderem eine verringerte Fähigkeit TAG unter Stickstoff-Mangel zu akkumulieren.

Nannochloropsis sp.

Von Ajjawi et al. (2017) wurden per RNA-seq-Analyse 20 Transkriptionsfaktoren als mutmaßliche negative Regulatoren der Lipidproduktion in *Nannochloropsis gaditana* identifiziert. Mittels CRISPR-Cas-vermittelten gene editings konnten anschließend 18 dieser 20 Transkriptionsfaktoren erfolgreich mutiert werden. Der knock-out eines zum pilzlichen Zn(II)2Cys6-homologen Transkriptionsfaktors führte dabei zu einer Verdoppelung der Lipidproduktion.

In einer Studie von Ma et al. (2017) konnte mittels RNAi ein Pyruvatdehydrogenasekinase-Gen (*pdk*) in *Nannochloropsis salina* erfolgreich charakterisiert werden. Aus anderen Studien ist dabei bekannt, dass die Pyruvatdehydrogenasekinase als negativer Regulator der Pyruvatdehydrogenase wirkt, welche wiederum die Umwandlung von Acetyl-CoA in Pyruvat zur Fettsäurebiosynthese katalysiert. Der knock-down des *pdk*-Gens führte zu einem umgeleiteten

Kohlenstofffluss in Richtung Triacylglycerol (TAG)-Synthese, einem Anstieg der TAG-Akkumulation, einem Rückgang der membranpolaren Lipide und einer Veränderung des Fettsäureprofils.

Verruto et al. (2018) etablierten ein markerloses gene editing auf der Grundlage der Cre-Rekombinase und der Cas9-Nuklease in *Nannochloropsis gaditana* (vgl. 2.2.3.1 Grundlagenforschung). Unter anderem konnte in der Studie eine Verdopplung der Lipidproduktivität erreicht werden, indem die Expression des ZnCys-Gens durch eine gezielte Insertion in den 5'-UTR verringert wurde.

Des Weiteren konnte die Lipidbiosynthese in *Nannochloropsis salina* mittels Hochdurchsatz-Screening und Genom-Editierung optimiert werden. Dafür erfolgte die Identifizierung eines Gens, das im Falle einer Genunterbrechung mit einer erhöhten Lipidbiosynthese in Zusammenhang steht. Aus einer (durch Insertionsmutagenesetechnik konstruierten) Bibliothek an Mutanten wurde eine Mutante mit schnellerer Wachstumsrate und einem erhöhten Gehalt an Fettsäuremethylester isoliert, was zu einer um 75 % gesteigerten Fettsäuremethylester-Produktivität führte. Durch einen reverse genetic-Ansatz konnte die Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase-Domäne der Trehalose-6-Phosphat-Synthase als das in der Mutante defekte Gen identifiziert werden. Zusätzlich erfolgte die Überexpression von mehreren Fettsäure-Desaturasen (FAD) mittels CRISPR/Cas9 in zuvor identifizierten Transkriptions-Hotspots. Entsprechende Mutanten wiesen eine Steigerung der Biosynthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) auf (Ryu, 2020).

Durch dieselbe Arbeitsgruppe Ryu et al. (2021) wurde ein Jahr später das Toolkit für das CRISPR/Cas9-vermittelte gene editing in *Nannochloropsis salina* erweitert. Es konnte ein „Safe Harboring“-Transgen-Expressionssystem für *Nannochloropsis* entwickelt werden, indem ein CRISPR/Cas9-vermitteltes knock-in in einen vorher identifizierten Transkriptions-Hotspot erfolgte. Durch dieses „Safe Harboring“-System werden das positionsbedingte Transgen-Silencing und die instabile Expression aufgrund von Positionseffekten umgangen. Der knock-in des fad12-Gens (12-Fettsäure-Desaturase) in einen Transkriptions-Hotspot führte dabei zu einer signifikant höheren Expression als bei zufälliger Integration in das Genom. Es konnte eine vierfach höhere Produktion von Linolsäure (LA, Produkt von FAD12) beobachtet werden sowie eine daraus resultierende 1,5-fache Erhöhung der Eicosapentaensäure (EPA).

Phaeodactylum tricornutum

Wang et al. (2017) konnten mit Hilfe von RNAi ein Gen identifizieren, welches für das Lipidtröpfchen (LD)-assoziierte Protein (LDP1) in *Phaeodactylum tricornutum* codiert. Der knock-down dieses Gens führte sowohl zu einer Reduzierung des Lipid- und Triacylglycerol (TAG)-Gehalts, als auch zu einer Verringerung der Lipidtröpfchengröße. Im Gegensatz dazu erhöhte die Überexpression des ldp1-Gens den Lipidgehalt, die LD-Größe und die Expression von Schlüsselgenen der Biosynthese von Triacylglycerinen und Fettsäuren.

Von Hao et al. (2018) konnten in *Phaeodactylum tricornutum* die Triacylglycerol-Produktion mittels TALEN-basierter Mutagenese erhöht werden. Als Target wurde das Hotdog-Fold-Thioesterase-Gen (tes1) gewählt, welches eine Rolle bei Homöostase freier Fettsäuren in Plastiden spielt. Die Inaktivierung dieses Gens führte zu einem 1,7-fachen Anstieg des TAG-Gehalts und einer Veränderung des Fettsäureprofils.

In der Studie von Hao et al. (2022) wurde die CRISPR/Cas9-Methode zum knock-out der langkettigen Acyl-CoA-Synthetasen (LACS)-Familie in *Phaeodactylum tricornutum* verwendet.

Dabei wurden Mutanten für die LACS-Gene *acsl1-acsl5* generiert und in Hinblick auf ihre Substratspezifitäten gegenüber verschiedenen Fettsäuren (FA) und subzellulären Lokalisationen untersucht. Besonders herausgestellt wurden die Gene *acsl3* und *acsl5*. Das ACSL3 ist in den Mitochondrien lokalisiert. Entsprechende Mutanten haben ein beeinträchtigtes Wachstum, einen reduzierten TAG-Gehalt und ein verändertes FA-Profil. Das ACSL5 ist hingegen im Peroxisom lokalisiert, entsprechende Mutanten haben eine verringerte Wachstumsrate und molekulare Veränderungen von PC und TAG. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass *acsl3* an der Synthese von Speicherlipiden und *acsl5* an der Kontrolle der Zusammensetzung von Acyl-CoAs für die Lipidsynthese beteiligt ist.

Tetraselmis sp.

Chang et al. (2020) erreichten eine Erhöhung der Lipid-Produktion durch CRISPR/Cas9-RNP-vermittelte Mutagenese in *Tetraselmis sp.*. Da die Kohlenhydrat- und Lipidbiosynthese konkurrierende Stoffwechselwege sind, konnte die Lipidproduktion durch eine Hemmung der Kohlenhydratsynthese erhöht werden. Dafür erfolgte der knock-out des wichtigsten regulatorischen Enzyms im Stärkesyntheseweg, der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP). AGP-Mutantenlinien zeigten einen leichten Wachstumsrückgang bei einer 2,7-fachen Steigerung der Lipidproduktion.

2.2.3.3 Steigerung der Pigmentproduktion

Mikroalgen enthalten auf natürliche Weise eine Reihe von Pigmenten. Zu den häufigsten Mikroalgenpigmenten zählen dabei lichtsammelnde Pigmente wie Chlorophylle und Phycobiline sowie lichtschützende Carotinoide. Durch ihre antioxidativen Eigenschaften sind Pigmente ein nützlicher Rohstoff in der Ernährungs- und pharmazeutischen Industrie, finden aber auch im Bereich der Kosmetikaproduktion Anwendung. Die Produktion von Pigmenten durch Mikroalgen gilt dabei als eine umweltfreundliche Alternative zu synthetischen Farbstoffen. Eine vergleichsweise geringe metabolische Ausbeute und hohe Produktionskosten stellen jedoch nach wie vor Hindernisse dar. Gentechnische Methoden zur Optimierung der Mikroalgen-Pigmentproduktion können dabei zur Steigerung der Kommerzialisierung dienen (Srivastava et al. 2022).

Chlamydomonas reinhardtii

In einer Studie von Baek et al. (2018) wurde die DNA-freie CRISPR-Cas9 RNP-vermittelte Mutagenese in *Chlamydomonas reinhardtii* zur Steigerung der Pigmentproduktion genutzt. Der knock-out des Zeaxanthin-Epoxidase-Gens führte zu einem signifikant höheren Gehalt an Zeaxanthin (56-fach) sowie einer höheren Zeaxanthin-Produktivität (47-fach). Eine Fütterung von Hennen mit dieser knock-out Mutante ergab eine Anreicherung von Lutein (2-fach) und Zeaxanthin (2,2-fach) in den Eiern.

Mittels RNAi konnte eine funktionelle Analyse der Plastid-terminalen Oxidasen (PTOX) in *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgen (vgl. 2.2.3.4 Zusammenfassung weiterer Anwendungen). Der knock-down des *ptox2*-Gens führte dabei zu einer gesteigerten Akkumulation des Pigments Astaxanthin (Li et al. 2020c).

Song et al. (2020) gelang durch CRISPR-Cas9 eine Manipulation des *Chlamydomonas reinhardtii*-Stoffwechsels. Mittels CRISPR-Cas9-RNP-vermitteltem knock-in wurde eine Doppelmutante generiert, die eine Mutation im Lycopin-Epsilon-Cyclase-Gen (Mutation bedingt eine Eliminierung eines Zweigs der Xanthophyll-Biosynthese) und im Zeaxanthin-Epoxidase-Gen aufweist. Ein knock-out dieser beiden Gene führte zu einer Steigerung der Zeaxanthin-Ausbeute

um 60 %. Durch eine Optimierung des Mediums konnte diese anschließend sogar auf 78 % erhöht werden.

Dieselbe Arbeitsgruppe generierte zudem eine *Chlamydomonas reinhardtii*-Doppelmutante zur Produktion von mit Makulapigmenten-angereichertem Öl (Song et al. 2022).

Thalassiosira pseudonana

In *Thalassiosira pseudonana* führte die Zugabe von Phloroglucinol zu einer Aktivierung der cis-Zeatin- und Brassinolid-Signalwege und somit zur Synthese von Fucoxanthin. Für eine funktionelle Untersuchung erfolgte der CRISPR-Cas9-vermittelte knock-out von Schlüsselenzymgenen im cis-Zeatin-Syntheseweg, was zu einer signifikanten Verringerung des Wachstums und des Fucoxanthingehalts führte. Ähnliche Beobachtungen konnten auch durch eine Behandlung mit einem Brassinolid-Syntheseinhibitor gemacht werden. Die cis-Zeatin- und Brassinolid-Signalwege konnten in der Studie als unabhängige Induktoren der Fucoxanthin-Synthese identifiziert und durch Phloroglucinol beeinflusst werden (Liu et al. 2022e).

2.2.3.4 Zusammenfassung weiterer Anwendungen

Chlamydomonas reinhardtii

Wie schon im Absatz 2.2.3 Steigerung der Pigmentproduktion berichtet wurde, nutzen Li et al. (2020c) die RNAi-Methode zur funktionellen Analyse der Plastid-terminalen Oxidasen (PTOX) in *Chlamydomonas reinhardtii*. Durch den knock-down des *ptox1*-Gens wurde eine signifikante Steigerung der Wasserstoffproduktion beobachtet. Zudem war die Expression unter Starklicht erhöht, was auf eine Rolle der PTOX in der Stressregulation schließen lässt.

Von Cazzaniga et al. (2020) wurde die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese zur Untersuchung der Photosystem-II-Antennenkomplexe CP26 und CP29 in *Chlamydomonas reinhardtii* genutzt. Es wurden sowohl Einzel-, als auch Doppelmutanten ohne monomere Antennen generiert. Das Fehlen des CP26- und CP29-Komplexes in den knock-out-Linien beeinträchtigte die photosynthetische Effizienz sowie den Lichtschutz und verhinderte die Induktion des nicht-photochemischen Quenchings (NPQ). Aufgrund dieser Ergebnisse rieten die Autor*innen dazu an, dass monomere Antennenuntereinheiten wegen ihrer wesentlichen Rolle bei der Lichtumwandlungseffizienz und den Lichtschutzmechanismen möglichst nicht editiert werden sollten.

In einer Studie von Fei et al. (2021) wurde mittels RNAi *Chlamydomonas*- und *Chlorella*-Stämme erzeugt, die als Larvizide zur Bekämpfung der Mückenart *Aedes aegypti* dienen können. Dafür erfolge die Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella vulgaris*, mit einem 3-HKT-RNAi-Expressionsplasmid (3-HKT: 3-Hydroxykynurenin-Transaminase-Gen in *Aedes aegypti*). Eine Fütterung der Mücken mit den transgenen *Chlamydomonas*-Algen führte in einem Kleinversuch zu einer Sterblichkeitsrate zwischen 60 % und 100 % und in einem groß angelegten Fütterungsexperiment erwachsener Mücken ebenfalls zu 100 %. Im Falle der Fütterung mit transgenen *Chlorella*-Algen lag die Sterblichkeitsrate hingegen im Bereich von 6,7 % bis 43 %. Die Fütterung mit transgenen Mikroalgen stellt folglich einen Weg zur Bekämpfung von Mückenpopulationen dar.

Von Takusagawa et al. (2021) wurde das CRISPR/Cas9-System für die funktionelle Charakterisierung des HBD1-Proteins in *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet. Der CRISPR/Cas9-vermittelte knock-out des *hbd1*-Gens führte zu einer Streuung der Chloroplasten-Nukleotide, wobei das Einführen eines intakten *hbd1*-Gens in die Zelle wieder zur Komplementation des Phänotyps führte. Es wurde daher die Vermutung angestellt, dass HBD1-Protein eine Rolle in der Organisation der Chloroplasten-Nukleotide spielt.

Durch Asadian et al. (2022) wurde der Transkriptionsfaktor Cia5 in *Chlamydomonas reinhardtii* mittels CRISPR/Cas9 ausgeknockt. Der knock-out des cia5-Gens führte zu einer geringeren Entnahme von CO₂ aus der Atmosphäre.

Desmodesmus sp.

Durch eine Regulierung der Antennengröße der Lichtsammelkomplexe konnte die Lichtschutzkapazität der Grünalge *Desmodesmus sp.* verbessert werden. Über einen reverse genetic-Ansatz wurde zuerst das lhcb-Gen identifiziert, dessen Repression zu weniger Photonen in der Elektronentransportkette und so zu einer gesteigerten Lichtschutzkapazität führte. Anschließend wurde das Gen lhcbm mittels CRISPR/Cas9 ausgeknockt. Entsprechende knock-out-Mutanten weisen ebenfalls eine erhöhte Lichtschutzkapazität auf, indem sie zusätzliche Lichtenergie über einen nicht-photochemischen Löschweg (Quenching) abführen (Hu et al. 2020a).

Nannochloropsis sp.

Das gene editing mittels RNAi führt zur allgemeinen Produktivitätssteigerung bei hohen CO₂-Konzentrationen in *Nannochloropsis oceanica*. Durch den RNAi-Mechanismus konnten zwei unabhängige Mutanten mit einem knock-down des ca2-Gens (Carboanhydrase - Schlüsselkomponente des Kohlenstoffkonzentrationsmechanismus) generiert werden, wobei die Transkriptmenge um 65 % bzw. 52 % reduziert wurde. Entsprechende Mutanten wiesen (vor allem bei hohen CO₂-Konzentrationen) neben einem verringerten Kohlenstoffkonzentrationsmechanismus eine erhöhte Kohlenstoffassimilation, höhere pH-Toleranz und -Homöostase sowie eine verstärkte Photosynthese- und Wachstumsrate auf (Wei et al. 2019).

In einer Studie von Gee und Niyogi (2017) wurde die gerichtete homologe Rekombination zur Mutation des Carbonic Anhydrase 1-Gens (cah1) in *Nannochloropsis oceanica* verwendet. Im Falle einer geringen CO₂-Konzentration zeigten entsprechende cah1-Mutanten schwere Wachstums- und Photosynthesedefekte. Zusammen mit den weiteren Erkenntnissen aus der Studie konnte das cah1-Gen als wesentlicher Bestandteil des Kohlenstoffkonzentrationsmechanismus identifiziert werden.

Phaeodactylum tricornutum

In einer Studie von Stukenberg et al. (2018) wurden zwei am Phosphattransport beteiligte Gene in *Phaeodactylum tricornutum* mittels CRISPR/Cas9-Mutagenese ausgeschaltet. Die Expression des Cas9-Enzyms wurde dabei über einen induzierbaren Nitratreduktase-Promotor reguliert. Die Mutageneseeffizienz betrug im Falle des vtc2-Gens 50 % und im Falle des Gens pho4 60 %.

Die Plasmid-basierte CRISPR/Cas9-Methode wurde in *Phaeodactylum tricornutum* zur Mutation des Phosphor-Stressregulators PtPSR (Phaeodactylum tricornutum Phosphorus Hunger Response) genutzt. Dieser wurde zuvor per in silico-Analyse identifiziert und anhand der molekularen, genetischen und biochemischen Charakterisierung von ptpsr-Mutantenlinien charakterisiert. Der knock-out führte dabei zu einer verringerten Induktion von Phosphor-Stress-Antwort-Genen, nahezu vollständigem Verlust der alkalischen Phosphatase-Aktivität und verringertem Phospholipidabbau. PtPSR konnte so als wichtiger Transkriptionsfaktor für P-Absorption, Phospholipid-Umbau und Zellwachstum bei der Anpassung an P-Stress identifiziert werden (Sharma et al. 2020).

2.2.3.5 Aufführung einiger Übersichtsartikel

In einem Review von Poliner et al. (2018) wurden die Fortschritte von genetischen Werkzeugen und die dadurch entstehenden Möglichkeiten behandelt. Die Autor*innen beschränkten sich dabei auf die Gattung *Nannochloropsis*. Es wurden folgende gene editing-Methoden aufgeführt: RNAi, HR, CRISPR-Cas und die zufällige Insertionsmutagenese. Ziel der gentechnischen Veränderung sei die Erhöhung der Biomasse oder die Steigerung der Produktion von Lipiden, um die Effizienz der Alge für die Biotechnologie zu steigern. Erreicht werden könne dies, indem man Biosynthesewege positiv beeinflusst oder konkurrierende Wege hemmt. Die Autor*innen zeigten dabei Gene auf, deren Editierung zu einer gesteigerten Effizienz führte sowie TFs, deren Engineering die Veränderung eines ganzen Stoffwechselweges bewirken können. Zudem wurde die Bedeutung markerfreier Strategien oder die Verwendung von auxotrophen Markern zur Selektion angesprochen, welche im Falle einer Übertragung der Stämme auf das Freiland nötig sind.

Ein Übersichtsartikel von Charoonnart et al. (2018) bietet eine Übersicht über die Anwendung der Mikroalgen-Biotechnologie in der Aquakultur, wobei er sich vor allem auf die Bekämpfung von aquatischen Krankheiten fokussiert. Die potenziellen Anwendungen von Mikroalgen bei der Krankheitsbekämpfung wurden dabei in drei Punkte aufgeteilt: (1) Mikroalgen als gesundheitsförderndes Futtermittel (Gute Verdaulichkeit und hoher Gehalt an Proteinen, Lipiden und essentiellen Nährstoffen). (2) In einigen Mikroalgen natürlich vorkommende antimikrobielle Verbindungen/Biomoleküle, die als Immunstimulanzien dienen können. (3) Die Möglichkeit, Mikroalgen genetisch so zu editieren, dass diese „funktionelle Futtermittelzusatzstoffe“ produzieren können (Fischwachstumshormone, antibakterielle Mittel, Impfstoffe und virusgerichtete interferierende RNA-Bestandteile). Als Methode für die genetische Editierung wurde hierbei das CRISPR-System aufgeführt. Zudem wurden mit der Mikroalgen-Biotechnologie verbundene Probleme und Risiken herausgearbeitet (Regulatorien und Vorschriften, ökologisches Risiko, Mikroalgen als virale Vektoren, horizontaler Gentransfer, öffentliche Akzeptanz) und teilweise entsprechende Lösungsansätze angeführt (Trocknen der Algen, Verwendung von Stämmen, die in der natürlichen Umgebung nicht wachsen/konkurrieren können (z. B. auxotroph oder paarungsdefekt), Vermeiden von Antibiotika-basierte Markern, funktionelle Schutzmaßnahmen im Transgen (z. B. orthogonales Stopcodon/tRNA-Systems)).

Die Autor*innen Fu et al. (2019) arbeiteten die Fortschritte in der Forschung und der biotechnologischen Anwendung der letzten 40 Jahre innerhalb der Gruppe der Mikroalgen heraus. Zudem erfolgt eine Auflistung von Arten, welche bereits für das gene editing zur Verfügung stehen (durch ein vollständig sequenziertes Genom und eine bereits etablierte Transformations-Methode). Die meisten dieser Arten gehören dabei zur Abteilung der Chlorophyta, gefolgt von Kieselalgen aus der Abteilung Ochrophyta. Neben den TALENs fand die CRISPR-Cas Methode hier besondere Beachtung, wobei sich das Review auf zwei Varianten der Nuklease (SpCas9 und Cpf1/Cas12a) beschränkt. Genauer betrachtet wurden zwei verschiedene Mikroalgen-Arten, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Phaeodactylum tricornutum*. Der Fokus lag zum Zeitpunkt des Reviews vor allem auf der Manipulation des Kohlenstoffflusses zur Erhöhung der Triacylglycerol-, Fettsäure- oder Carotinoid-Produktion sowie der Steigerung der photosynthetischen Effizienz. Des Weiteren wurde die Wichtigkeit der Bereitstellung von Genominformationen und Forschungswerkzeugen für Arten, die nicht als Modellorganismus dienen, sich jedoch gut für industrielle Anwendungen eignen würden, herausgestellt.

Ebenfalls aus dem Jahr 2019 stammt ein Review über die Verwendung des CRISPR/Cas-Systems zur Editierung des Genoms in Mikroalgen von Zhang et al. (2019). Die Autor*innen

befassten sich dabei sowohl mit den bisher angewandten Transformations-Methoden sowie Strategien für die Expression der Cas9-Endonuklease und der sgRNA in Mikroalgen, als auch mit der Anwendung des CRISPR/Cas-Systems zur Baseninsertion oder zum knock-out, knock-in oder zur Repression von Genen. Zum Zeitpunkt des Reviews war die CRISPR-Cas9-vermittelte Mutagenese nur in ein paar Modellmikroalgen wie *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum* und *Nannochloropsis oceanica* etabliert. Die Autor*innen betonten hierbei ebenfalls das Potential des CRISPR-Cas-Systems auch für andere Mikroalgen-Arten außerhalb der Modellorganismen.

Das Review von Ng et al. (2020) befasst sich mit der Genombearbeitung und den Anwendungen von synthetischer Biologie in Bezug auf das Metabolic Engineering von Mikroalgen und Cyanobakterien. Die Autor*innen legten ihren Fokus dabei auf die CRISPR-Cas-Methode (Cas9, Cas12a, Cfp1, RNP, CRISPRi) und befassten sich mit den Arten *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricornutum* und *Nannochloropsis* sp.. Zudem stellten sie Anwendungsgebiete wie die Fixierung von CO₂, die Erzeugung von Biokraftstoffen und die Produktion von Pigmenten, Lipiden und anderen Stoffen vor. Durch das Metabolic Engineering kann dabei eine Steigerung der Leistungsfähigkeit und der Effizienz der Produktion erreicht werden.

Das Review von Fajardo et al. (2020) beschäftigt sich sowohl mit den klassischen Techniken zur Transformation und Expression von Transgenen als auch mit den modernen Techniken für das Gen-Silencing und die DNA-Editierung, wobei es viele Vertreter der Gruppe der Mikroalgen aufführt. Mikroalgen seien aufgrund ihres Potenzials für die Herstellung von Biokraftstoffen und anderen Moleküle von großem Interesse. Es wurden die Methoden RNAi, ZFNs, TALENs und CRISPR für das gene editing aufgeführt, wobei die Autor*innen die CRISPR-Methode als bessere Alternative zu ZFNs und TALENs bewerteten. Des Weiteren wurden weiterführende Methodiken des CRISPR-Cas Systems, wie CRISPRa, CRISPRi oder die Verwendung von CRISPR-Cas-RNPs dargestellt.

Die Autor*innen Kumar et al. (2020) fassten die Fortschritte, aber auch die Herausforderungen des Mikroalgen-Bioengineering für industrielle Anwendungen zusammen. Die Autor*innen gaben dabei eine Übersicht über (1) Mikroalgen, für welche vollständige oder nahezu vollständige Genomdaten vorliegen und (2) einen Überblick über molekulare Werkzeuge und Techniken, die für ihre Gentechnik zur Verfügung stehen. Als Methoden für das gene editing wurden dabei TALENs, ZFNs und CRISPR aufgeführt, wobei die Autor*innen auf wissenschaftliche Arbeiten in den Arten *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum* und *Nannochloropsis oceanica* Bezug nahmen. Des Weiteren wurden Anwendungen des gene editings in Mikroalgen zusammengefasst: Verbesserung von der Photosyntheserate und Biomasseproduktion, Steigerung der Lipidproduktion sowie der Produktion von Biomolekülen und anderen Produkten. Schlussendlich führten die Autor*innen eine Risikobewertung durch und stellten Fragen zur Regulation an, die im Falle einer industriellen Anwendung von gentechnisch veränderten Algen auftreten.

2.2.3.6 Auswahl nGVO-Mikroalgen

Auch wenn die Anwendung von gentechnisch veränderten Mikroalgen sich bisher größtenteils auf das Labor beschränkt, gibt es ein paar Vorversuche und Ausblicke für eine Nutzung dieser Algen im Freiland. Industrielle Anwendung finden bisher vor allem Arten der Gattungen *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Nannochloropsis* und *Phaeodactylum*. Im Falle der Arten *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella vulgaris* gibt es zusätzlich Studien, die über die Anwendung

in der Industrie hinausgehen (Abb. 4, Tab. 3). Wie in diesem Kapitel berichtet, wurde die Art *Chlamydomonas reinhardtii* dabei beispielsweise an Hühner verfüttert, um deren Eier mit wertvollen Pigmenten anzureichern. In einem weiteren Bericht wurden die Arten *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella vulgaris* als Larvizid gegen schädliche Mückenarten eingesetzt, wobei die Verwendung von *Chlamydomonas reinhardtii* deutlich effektiver war.

Unsere Recherche hat ergeben, dass die meisten Publikationen zu gentechnisch veränderten Mikroalgen sich auf *Chlamydomonas reinhardtii* beziehen und diese Art am vielversprechendsten für eine Anwendung im Freiland ist (Abb. 4). Auf der Grundlage unserer Ergebnisse und der Tatsache, dass *Chlamydomonas reinhardtii* in vielen deutschen Gewässern vorkommt, schlagen wir diese Art als nGVO-Beispielart für limnische Systeme vor.

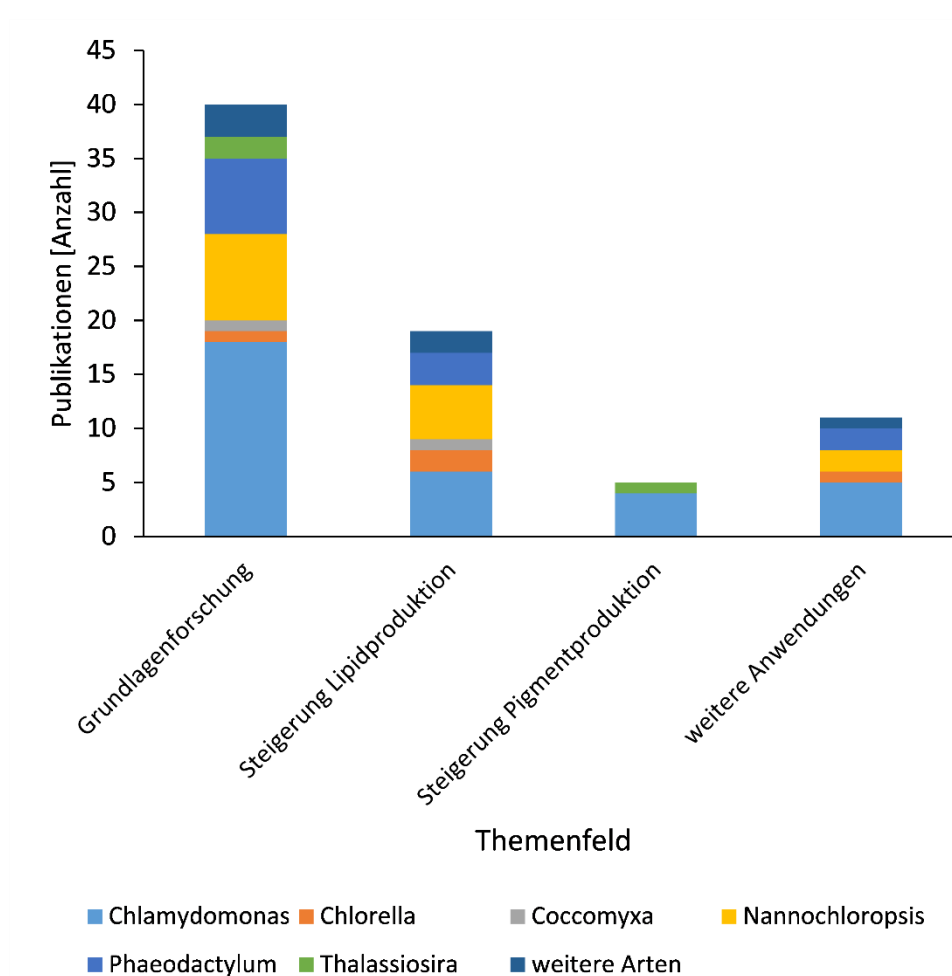


Abb. 4: Verteilung der selektierten Publikationen zur gene editing-Thematik auf die verschiedenen Mikroalgen-Gattungen. Graphische Darstellung der Anzahl von Publikationen, die im Rahmen der Recherche zu den Algen gefunden wurden nach Gattungen und Themenfeldern. Gattungen, die weniger als 2 Publikationen umfassen, werden als „weitere Arten“ abgebildet.

Tab. 3: Tabellarische Zusammenfassung der Verteilung sowie eine Aufschlüsselung der Gattungen von Mikroalgen, aus denen sich die Darstellung „weiterer Arten“ zusammensetzt.

	Grundlagenforschung	Steigerung Lipidproduktion	Steigerung Pigmentproduktion	weitere Anwendungen
<i>Chlamydomonas</i>	18	6	4	5
<i>Chlorella</i>	1	2		1
<i>Coccomyxa</i>	1	1		
<i>Nannochloropsis</i>	8	5		2
<i>Phaeodactylum</i>	7	3		2
<i>Thalassiosira</i>	2		1	
weitere Arten	3	2		1
<i>Desmodesmus</i>				1
<i>Euglena</i>	1			
<i>Lobosphaera</i>		1		
<i>Picochlorum</i>	1			
<i>Tetraselmis</i>		1		
<i>Volvox</i>	1			

2.2.3.7 Steckbrief von *Chlamydomonas reinhardtii*

Bei der Art *Chlamydomonas reinhardtii* handelt es sich um eine einzellige Grünalge, die zur Familie der Chlamydomonadaceae innerhalb der Ordnung Volvocales gehört. Die Alge ist ca. 10 Mikrometer groß, hat eine ovale Körperform und ist von einer Zellwand umgeben, die aus Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen besteht. Sie hat nur einen Chloroplasten, der becherförmig ist und einen Pyrenoiden umschließt. *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt zwei Flagellen, welche am Vorderpol der Alge sitzen und der Alge zur Fortbewegung dienen. Die Richtung der Fortbewegung basiert dabei auf dem Prinzip der Phototaxis. Die Phototaxis von *Chlamydomonas reinhardtii* beruht auf dem Augenfleck der Alge, einem lichtsensitiven Apparat, mit welchem die Alge die Lichtrichtung und -intensität bestimmen kann. Der Augenfleck befindet sich oberhalb des Zelläquators der Alge, hat einen Durchmesser von 1 Mikrometer und ist aufgrund von eingelagerten Carotinoiden orange gefärbt. Die lichtgesteuerte Ausrichtung von *Chlamydomonas reinhardtii* dient zur Schaffung der optimalen Lichtverhältnisse für die Photosynthese. Neben der phototrophen Lebensweise ist es der Alge ebenfalls möglich heterotroph zu leben. Als Lebensraum dienen der Alge alle limnischen Systeme, jedoch kommt sie vor allem in nährstoffreichen Kleingewässern vor. *Chlamydomonas reinhardtii* ist dabei auf der ganzen Welt verbreitet. In der Regel vermehrt sich die Alge vegetativ durch Zellteilung. Zusätzlich ist es *Chlamydomonas reinhardtii* möglich in den sexuellen Lebenszyklus zu wechseln. Bestimmte Faktoren wie z.B. schlechte Umweltbedingungen begünstigen diesen Wechsel, der zur Ausbildung einer diploiden, überdauerungsfähigen Zygote führt (Dutcher 2022; Hallmann 2019).

Chlamydomonas reinhardtii gilt als idealer Modellorganismus für die Grundlagenforschung und die Biotechnologie. Die Alge lässt sich einfach kultivieren, und die Kultivierung ist relativ kostengünstig. Dabei kann sie sowohl mit organischem Kohlenstoff ernährt werden, oder bei Bereitstellung einer Lichtquelle photoautotroph wachsen. Durch das Vorhandensein von vollständigen Sequenzdaten für alle drei Genome (Kerngenom, Chloroplastengenom und Mitochondriengenom) und die Fülle an bereits etablierten molekularen Techniken eignet sich *Chlamydomonas reinhardtii* gut für genetische Studien. Dadurch, dass sie die meiste Zeit im vegetativen Lebenszyklus und somit haploid vorliegt, gilt die Alge zudem als gut mutierbar. Zusätzlich besitzt sie einen kurzen Generationszyklus, so dass die Generierung und Anzucht von mutierten Stämmen nicht viel Zeit in Anspruch nehmen. Für die Biotechnologie ist *Chlamydomonas reinhardtii* zudem von Bedeutung, da sie essentielle Stoffe wie Wasserstoff, Lipide oder Pigmente produziert und sich zur Herstellung von Biotreibstoffen und Biopharmazeutika eignet.

2.2.4 Gentechnisch veränderte Fische

Die Entstehung der Fische begann vor mehr als 500 Millionen Jahren. Heutzutage werden mehr als die Hälfte der weltweit lebenden Wirbeltiere den Fischen zugeordnet. Ihre Taxonomie zeichnet sich durch eine große Vielfalt aus, die über 30.000 Arten umfasst. Die Gruppe der Fische zeigt zudem eine hohe Anpassungsfähigkeit in Bezug auf ihre Anatomie, Physiologie sowie verhaltensbezogene und ökologische Faktoren. Durch diese Anpassungsfähigkeit ist es ihnen möglich, eine beeindruckende Vielfalt an Lebensräumen zu bewohnen. Dabei werden bis heute fast alle aquatischen Lebensräume von Fischen besiedelt. Seen, Flüsse oder Meere innerhalb verschiedener Extreme - von tropischen Sümpfen bis hin zum eisbedeckten Polarmeer dienen den Fischen als Lebensraum (Helfman 2009; Nelson 2016).

Fische sind für den Menschen von großer Bedeutung. Sie dienen dem Menschen als wichtiges Grundnahrungsmittel, in der Sportfischerei und bilden durch die Fangfischerei und die Aquakultur einen wichtigen Zweig der Wirtschaft. Gerade für die kommerzielle Nutzung ist dabei eine genetische Modifizierung von großer Bedeutung. Durch moderne gene editing-Methoden kann zum Beispiel eine Steigerung der Effizienz erreicht werden, indem das Wachstum beschleunigt, die Körpermasse erhöht oder der Gehalt wertvoller Fettsäuren gesteigert wird. Zudem können diese Methoden zur Generierung einer Resistenz gegen bestimmte virale oder bakterielle Krankheiten dienen.

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die Entwicklung und die Anwendung solcher molekularen Techniken zur genetischen Editierung von Fischen.

2.2.4.1 Grundlagenforschung

Für die verschiedensten Fischarten wurden bereits einige grundlegende Forschungen zur Geneditierung betrieben. In diesem Bericht beziehen wir uns dabei jedoch nur auf die Forschung der letzten sechs Jahre (ausgehend vom Zeitpunkt der Recherche (2023)).

Acipenser ruthenus

Chen et al. (2018b) etablierten in dieser Studie die TALEN- und CRISPR-Editierungsmethode in *Acipenser ruthenus* (Sterlet). Anfänglich wurde dafür das exogene gfp-Reportergen (green fluorescent protein) eingebracht und anschließend mittels TALEN, CRISPR/Cas9-mRNA und CRISPR/Cas9-RNP ausgeschaltet. Es bedurfte dabei einer Optimierung der Injektionskonzentration, um ein möglichst effektives Verhältnis zwischen Überlebens- und Mutationsrate zu erhalten. Im Fall des TALEN- und CRISPR/Cas9-RNP-vermittelten knock-outs wurde eine hohe

Mutageneseeffizienz erreicht (93 % bzw. 91-94 %), im Gegensatz zur CRISPR/Cas9-mRNA-vermittelten Mutagenese (46-55 %). Die Überlebensraten waren bei einem CRISPR/Cas9-RNP- oder CRISPR/Cas9-mRNA-vermittelten knock-out sehr hoch (94 % bzw. 88-92 %), wohingegen sie bei der Verwendung von TALEN deutlich abnahm (74 %). Die CRISPR/Cas9-RNP-vermittelte Mutagenese stellte sich daher als die effektivste Methode heraus und wurde im weiteren Verlauf der Studie angewendet. So wurde anschließend das endogene No-Tail-Gen (*ntl*) mittels CRISPR/Cas9-RNP mutiert. Es konnte eine hohe Mutationseffizienz (bis zu 83%) bei geringer Toxizität erreicht werden. Mutierte P0-Embryonen zeigten den erwarteten Phänotyp (gebogene Wirbelsäule und verdrehter Schwanz). Zusätzlich wurde ein weiteres endogenes Gen, *dickkopf1* (*dkk1*) erfolgreich mutiert.

Oncorhynchus mykiss

Au (2020) untersuchte den knock-down von Genen durch lange dsRNAs (RNAi) in *Oncorhynchus mykiss*-Zelllinien unter zwei Aspekten: Der Bestimmung der optimalen dsRNA-Konzentration und der Fähigkeit der dsRNAs Gen-Silencing zu vermitteln. Als Target wurden die exogenen Gene *gfp* und *luc* (Luciferase) sowie die endogenen Gene *ifn1* (type-I interferon) und *myc* (MYC proto-oncogene) gewählt. Der knock-down des überexprimierten *gfp*-Gens war teilweise möglich und führte zu Abnahme eines Teils der Fluoreszenz, bedarf jedoch weiterer Optimierungen. Im Falle des induzierbaren Luciferase-Gens war eine Interferenz durch lange dsRNAs uneingeschränkt möglich. Das durch dsRNA-vermittelte Silencing der Luciferase stellt dabei ein mögliches Reportersystem für zukünftige Studien dar. Für die endogenen Gene *ifn1* und *myc* konnte hingegen kein Silencing nachgewiesen werden. Als entscheidende Faktoren der Gen-Silencing-Effizienz haben sich die dsRNA-Vorbehandlung, die dsRNA-Konzentration (Interferonreaktion bei zu hoher Konzentration) und die dsRNA-Länge herausgestellt.

In der Studie von Zoppo et al. (2021) wurde erstmals eine monoklonale CRISPR/Cas9-editierte *Oncorhynchus mykiss*-Zelllinie etabliert. Dafür wurde das *cyp1a1*-Gen, das für das Cytochrom P450 (Familie 1, Unterfamilie A, Polypeptid 1) codiert, mittels RNP-basiertem CRISPR/Cas9-Ansatz in der Regenbogenforellenzelllinie RtgutGC ausgeknockt. Durch die Entwicklung einer Methode zur anschließenden Isolierung editierter Einzelzellklone konnte die, durch den CRISPR/Cas9-vermittelten knock-out geschaffene genetische Heterogenität überwunden werden.

Gratacap et al. (2020) optimierten das CRISPR-Cas9 vermittelte gene-editing in verschiedenen Salmonidenarten. Als Target wurde das *slc45a2*-Gen (Solute Carrier Family 45 Member 2) ausgewählt. Dieses Gen ist an der Pigmentierung beteiligt, sodass sich Individuen mit einem knock-out in diesem Gen optisch leicht vom WT unterscheiden lassen. Das *slc45a2*-Gen wurde mittels Cas9 bzw. Cas12a RNP-sgRNA-Komplex in SHK-1- und ASK-Zelllinien des Atlantischen Lachses (*Salmo salar*), RTG2-Zelllinien der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und CHSE-214-Zellen des Königsalchses (*Oncorhynchus tshawytscha*) ausgeknockt. Die Mutageneseeffizienz betrug im Falle des Cas9-RNPs über 90% und für den Cas12a-RNP-vermittelten knock-out über 60 %.

Salmo salar

In der Studie von Straume et al. (2020) wurde die CRISPR/Cas9-vermittelte Homologie-gesteuerte Reparatur (homology directed repair, HDR) unter Verwendung von Sense- (S), Antisense- (AS) und doppelsträngigen (ds) Oligodesoxynukleotid-(ODN)-Matrizen im Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) etabliert. Dabei wurden verschiedene Templates, Konzentrationen, Homologie-armlängen und Strangkomplementaritäten für den knock-in eines FLAG-Elements in das

slc45a2-Gen getestet. Die Effizienz, Genauigkeit und Art der Integrationen wurde anschließend mittels NGS (Next Generation Sequencing) untersucht. Die durchschnittliche HDR-Effizienz betrug 3,0–6,7 %, wobei Effizienzen bis zu 27 % erreicht werden konnten. Die HDR-Effizienz war bei Verwendung von AS- höher als bei S- und ds-ODNs und abhängig von der Template-Konzentration, aber nicht von der Länge der Homologiearme. Die Position der Indels war hingegen abhängig von der ODN-Polarität. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Integration des FLAG-Elements über den SDSA (synthesis-dependent strand annealing) - Reparaturweg erfolgt.

Dieselbe Arbeitsgruppe optimierte die CRISPR/Cas9-induzierte homologiegesteuerte Reparatur (HDR) durch asymmetrische Oligonukleotid (ODN)-Donoren im Lachs (*Salmo salar*) in einer weiteren Studie. Dabei erfolgte der knock-in eines FLAG-Elements in die Target-Gene *dnd* (dead end, primordial germ cell survival factor gene) und *slc45a2* mit Hilfe von CRISPR/Cas9 und AS-ODNs. Es konnte eine Mutageneseeffizienz von bis zu 59,2 % erreicht werden, bei einer Effizienz perfekter HDR bis zu 32,7 % (durchschnittliche Effizienz 7,6 %) für das *dnd*-Gen und bis zu 36,7 % (durchschnittliche Effizienz 13,6 %) für das *slc45a2*-Gen. Die durchschnittliche HDR-Frequenz mit asymmetrische ODNs ist somit ~ 2,7-mal höher als bei der Verwendung von symmetrischen ODNs in der vorherigen Studie. Die HDR-Effizienz war erneut abhängig von der Template-Konzentration. Da eine zu hohe Konzentration zur Toxizität führte, wurde jedoch empfohlen, die geringstmögliche Konzentration zu verwenden (Straume et al. 2021a).

Im selben Jahr führten Straume et al. (2021b) zudem einen Austausch von einzelnen Nukleotiden (SNR, single nucleotide replacements) mittels CRISPR/Cas9-induzierter HDR und unter Verwendung von AS-ODNs durch. Dabei wurde präzises SNR zum Einfügen eines vorzeitigen Stoppcodon in das *dnd*-Gen verwendet, wobei eine Effizienz bis zu 59,2 % erreicht wurde. Zusätzlich wurde ein FLAG-Element in das *slc45a2*-Gen und das *dnd*-Gen inseriert. Die HDR-Effizienz betrug hierbei bis zu 36,7 bzw. 32,7 %. Es konnte somit beobachtet werden, dass das SNR effizienter als das knock-in eines FLAG-Elements ist. Die HDR-Effizienz ist folglich nicht nur abhängig von der Template-Konzentration, sondern auch umgekehrt proportional zur Größe der Insertion.

Datsomor et al. (2022) entwickelten in dieser Studie eine Methode zur Isolierung und genetischen Manipulation von primären Hepatozyten aus *Salmo salar*. Leberzellen wurden deshalb gewählt, weil die Leber das Stoffwechselzentrum darstellt. Entsprechende gene editing-Studien können somit dem Verständnis von Stoffwechselprozessen und der Optimierung der Wachstumsrate, des Gesamtfettgehalts und Omega-3-Gehalts dienen. Die Transfektionseffizienz von primären Hepatozytenzellen betrug dabei 46 %. Beim anschließenden CRISPR/Cas9-vermittelten knock-out des p53-Gens (tumor protein p53) konnte in den transfektierten Zellen eine Mutageneseeffizienz von 60 % erreicht werden.

Salmo trutta

Madureira et al. (2019) führten in dieser Studie einen knock-down des Gens *pparα* (peroxisome proliferator-activated receptor α) mittels RNAi in Hepatozyten der Bachforelle (*Salmo trutta*) durch. Es konnte ein knock-down des Gens mit einer Effizienz von 70 % erreicht werden, der zu einer signifikanten Reduktion der Volumendichte von Peroxisomen führte, die Expression potenzieller Zielgene jedoch nicht beeinflusste. Des Weiteren wurde die Wechselwirkung mit einer östrogenen Verbindung (17 α -Ethinylestradiol, EE2) und einem PPAR α -Agonisten (Wy-14643, Wy) untersucht. EE2 bedingt normalerweise eine Verringerung der Peroxisom-Volumendichte. Dieser Effekt war in den untersuchten PPAR α -Mutanten aufgehoben.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass PPAR α Bb für die Reduktion der Peroxisom-Volumendichte benötigt wird und EE2 vermutlich ein nachgeschaltetes Target von PPAR α reguliert. Hingegen zeigt das wy-Gen normalerweise keinen Einfluss auf die Peroxisom-Morphologie, in PPAR α -Mutanten kompensierte es aber die Volumenabnahme der Peroxisomen. Auf der Grundlage der Ergebnisse wurde vermutet, dass PPAR α an der dynamischen Regulierung der peroxisomalen Größe und Form beteiligt ist.

2.2.4.2 Genetische Editierung der Keimzellen

Die Editierung von Genen, die mit der Entwicklung von Keimzellen assoziiert sind, findet in verschiedenen Gebieten Anwendung und kann zur Sterilität der Fische oder sogar zur vollständigen Geschlechtsumkehr führen. Grundlegende Forschungen nutzten diesen Ansatz zum Beispiel zur Aufschlüsselung der Entwicklung der Keimzellen. So ist es möglich, regulatorische Faktoren zu identifizieren, die Entstehung und Differenzierung von Keimzellen nachzuvollziehen oder mit den Keimzellen-assoziierte Gene zu charakterisieren (Gan et al. 2021). Entsprechende Ergebnisse können anschließend anwendungsbezogenen Studien als Grundlage dienen. Bei Fischen beschäftigen sich solche anwendungsbezogenen Studien zum Beispiel mit der Generierung keimzellloser Individuen zur Arterhaltung. Innerhalb mancher Gattungen gibt es dabei schneller und langsamer wachsende Arten. Ist eine Art durch beispielsweise Überfischung oder den Verlust des Lebensraumes vom Aussterben bedroht, kann dem Aussterben durch gezielte Züchtung dieser Fische entgegengewirkt werden. Bei Arten, die einen sehr langen Generationszyklus haben und erst spät geschlechtsreif werden kann es dabei sinnvoll sein, eine schneller wachsende und früher geschlechtsreife Art innerhalb dieser Gattung zur Leihmutterschaft zu verwenden. Für die Transplantation von fremden Keimzellen und der Produktion der artverwandten Fische ist jedoch eine Sterilität des Individuums Voraussetzung (Baloch et al. 2019). Die Generierung von keimzelllosen Fischen kann des Weiteren zur Verhinderung der Einkreuzung von Zuchttieren in Wildtierpopulation dienen. Dieser Aspekt stellt ein großes Umweltproblem der Aquakultur da, da die genetische Integrität der Wildtier-Population durch die Einkreuzung von Zuchtfischen gestört wird (Güralp, 2020). Mit der Sterilität geht zudem das Ausbleiben der Geschlechtsreife einher. Diesen Aspekt macht sich dabei die Aquakultur zu Nutze. Durch das Ausbleiben der Geschlechtsreife wird die vorzeitige Reifung von Fischen umgangen. Entsprechende Individuen weisen ein ungehemmtes Wachstum auf und ergeben somit größere Filets (Kleppe et al. 2022). Ein weiterer Ansatz zur Effizienzsteigerung in der Aquakultur ist die Erzeugung von monosexuellen Populationen, bei welchem der Geschlechtsdimorphismus bestimmter Arten genutzt wird. Durch moderne gene editing-Methoden kann dabei eine Geschlechtsumkehrung induziert werden, die zu einer rein weiblichen, schneller wachsenden Population führt (Zhai et al. 2022).

Im folgenden Abschnitt werden verschiedene Studien aufgeführt, die eine Editierung der Keimzellen durchführen und für verschiedene Aspekte nutzen.

Acipenser ruthenus

Störe sind aufgrund von Überfischung und Eingriffen in ihre natürlichen Lebensräume vom Aussterben bedroht. Der Sterlet (*Acipenser ruthenus*) ist die Stör-Art mit dem schnellsten Fortpflanzungszyklus und könnte als Wirt für die Produktion von spät geschlechtsreifen Störarten dienen. Dafür ist jedoch das Vorhandensein von sterilen Individuen erforderlich. Baloch et al. (2019) stellten in dieser Studie einen Ansatz vor, der den CRISPR/Cas9-vermittelten knock-out des *dnd1*-Gens nutzt. Das *dnd1*-Gen ist essenziell für die Bildung und Migration von Urkeimzellen (Primordial Germ Cells (PGCs)). Die anfängliche Mutageneseeffizienz betrug 55 %.

Allerdings konnte ein Anstieg der Mutations- und Überlebensrate um mehr als 90 % erreicht werden, wenn ein Cas9-RNP anstelle von Cas9-mRNA injiziert wurde (Chen et al., 2018b). Der knock-out des *dnd1*-Gens führte zur Fehlmigration und dem Fehlen von PGCs in den Embryonen und eignete sich zur Generierung eines sterilen Sterlet-Wirts zur Leihmutterschaft.

Carassius gibelio

In der Studie von Gan et al. (2021) wurde das CRISPR/Cas9-vermittelte gene editing zur Untersuchung der funktionellen Divergenz von Foxl2-Homöologen (forkhead (FKH) box (Fox) protein subfamily) in *Carassius gibelio* genutzt. Mitglieder dieser Foxl2-Familie spielen eine zentrale Rolle bei der Eierstockentwicklung. Zu Beginn wurden drei divergente foxl2-Homöologene (*foxl2a-B*, *foxl2b-A* und *foxl2b-B*) identifiziert und mittels CRISPR/Cas9 ausgeknockt. Anschließend wurden das Geschlechterverhältnis, die histologische Struktur der Keimdrüsen und die Veränderungen der entwicklungsbedingten Genexpression der Keimdrüsen während der Oogenese untersucht. Der knock-out des *foxl2a-B*-Gens führte dabei zum Stillstand der Eierstockentwicklung bis hin zur vollständigen Geschlechtsumkehr. Das Ausschalten der Homöologene *foxl2b-A* und *foxl2b-B* bedingte die Depletion von Keimzellen. Zusammen mit den anderen Ergebnissen dieser Studie deuten die funktionellen Unterschiede darauf hin, dass *foxl2b-A* und *foxl2b-B* kooperieren, um die Follikulogenese und Gonadendifferenzierung zu regulieren, wohingegen *foxl2a-B* eine Funktion in der Oogenese entwickelt hat.

Wang et al. (2022a) untersuchten mittels CRISPR/Cas9-vermitteltem knock-out zweier homologer Gene *gsdf-A* und *gsdf-B* (gonadal somatic cell-derived factor) die Keimzellentwicklung in *Carassius gibelio*. Der knock-out von einem der beiden Gene führte dabei zur partiellen Geschlechtsumkehr von Männchen zu Weibchen, wobei eine kompensatorische Expression des jeweils anderen Homöologs auftrat. Der gleichzeitige knock-out beider Gene bedingte hingegen eine vollständige Geschlechtsumkehr. Anhand dieser und weiterer Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass *gsdf-A* und *gsdf-B* die männliche Differenzierung durch Hemmung der *cyp19a1a*-Transkription kooperativ regulieren.

Cyprinus carpio

Die Studie von Song et al. (2019) ist die erste zur Anwendung von RNAi im lebenden *Cyprinus carpio*. Als Target wurde das *igf3*-Gen gewählt, von welchem bekannt ist, dass es eine Rolle bei der Keimdrüsenentwicklung von Knochenfischen spielt. Durch den knock-down sollte dabei untersucht werden, welche Rolle *igf3* genau spielt und ob es die Expression langer nicht-kodierender RNAs (lncRNAs) in Gonaden beeinflusst. Mittels RNAi konnte eine Hemmung der *igf3*-mRNA-Expression um 87,4 % erreicht werden. Anschließend wurde eine RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) der Gonade durchgeführt und beobachtet, dass durch den *igf3*-knock-down 124 lncRNAs und 353 mRNA differentiell exprimiert werden.

Anhand dieser Daten zum *igf3*-knock-down wurde die Rolle des *igf3* bei der Keimdrüsenentwicklung in *Cyprinus carpio* von derselben Arbeitsgruppe weiter untersucht (Song et al. 2021a). Der knock-down führte dabei zur Hemmung der Keimdrüsenentwicklung und der Entwicklung von Eierstöcken und Hoden.

Die Studie von Zhai et al. (2022) nutzt die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese zur Produktion einer rein weiblichen *Cyprinus carpio*-Population. Da weibliche Karpfen schneller wachsen, kann die Generierung einer monosexuellen Fisch-Population für die Aquakulturindustrie von Vorteil sein (vgl. 2.2.4.3 Untersuchung und genetische Optimierung entwicklungs-bezogener Aspekte). Das *17a1*-Gen (17 α -methyltestosterone) wurde als Target gewählt und mittels

CRISPR/Cas9-vermittelter Mutagenese ausgeknockt, um neomale Fische zu erzeugen. Neomale Karpfen-Männchen (17a1-/- und XX-Genotyp) wurden selektiert und mit WT-Weibchen (17a1+/+XX-Genotyp) gepaart. Die Kreuzung ergab ausschließlich weibliche Nachkommen (17a1+/- XX-Genotyp), welche eine normale Entwicklung von Keimdrüsen zu Eierstöcken aufwiesen.

Oncorhynchus mykiss

Fujihara et al. (2022) nutzten den CRISPR/Cas9-vermittelten knock-out des *dnd1*-Gens zur Generierung von keimzelllosen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Die Kreuzung von heterozygoten F1-*dnd*-Mutanten ergab einen Anteil von 25 % homozygoter *dnd*-knock-out-Mutanten in der F2-Generation. Entsprechende homozygote Mutanten besaßen anfangs die gleiche Anzahl an primordialen Keimzellen (PGCs). Die Anzahl der PGCs nahm jedoch stetig ab, bis hin zum vollständigen Fehlen der Keimzellen nach einem Jahr. Entsprechende keimzelllose, homozygote *dnd*-Mutanten können von Spendern stammende Spermien und Eier produzieren und sind somit ein geeigneter Empfänger für die Keimzelltransplantation.

Salmo salar

Die genetische Einkreuzung von gezüchteten Lachsen (*Salmo salar*) in Wildpopulationen stellt ein großes Umweltproblem der Lachsaquakulturindustrie dar. Eine Möglichkeit diese Einkreuzung zu verhindern ist die Verwendung von sterilen Fischen für die Aquakultur. In der Studie von Güralp et al. (2020) wurde der knock-out des *dnd*-Gens zur Generierung von keimzelllosem Lachs genutzt. Das aus dem knock-out resultierende Fehlen von Keimzellen verhinderte die Reproduktion. In der Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die Co-Injektion von Lachs-*dnd*-mRNA zur "Rettung" der Keimzellproduktion führen kann. Die Zugabe von Wt-*dnd*-mRNA verhinderte dabei, dass PGCs zu somatischen Zellen transdifferenzieren. Entsprechende Fische zeigten eine normale Entwicklung von Hoden und Eierstöcken, die Keimzellen enthalten. Der hier vorgestellte Ansatz stellt eine Möglichkeit zur Produktion von keimzelllosen Nachkommen durch eine Vererbung der Sterilität genetisch steriler Lachse dar.

In der Studie von Skaftnesmo et al. (2021) wurden die Auswirkungen des CRISPR/Cas9-vermittelten *stra8* (stimulated by retinoic acid 8) knock-outs auf die männliche Fruchtbarkeit im *Salmo salar* untersucht. In entsprechenden knock-out Zellen waren die spermatogenetischen Tubuli teilweise desorganisiert und es wurde ein siebenfacher Anstieg der Keimzellapoptose beobachtet (insbesondere bei Typ-B-Spermatogonien und Spermatozyten). Im Gegensatz dazu lag eine Zunahme der Produktion von spermatogenen Zysten bei geschlechtsreifen Mutanten vor. Die Transkriptionsrate von Spermatogonie-assoziierten Genen und Genen, die in den Spermatozyten exprimiert werden, war in *stra8*-Mutanten signifikant reduziert. Im Gegensatz zu Säugetieren schloss dennoch eine große Anzahl von Keimzellen die Spermatogenese ab, Spermien wurden produziert, und die Befruchtungsrate war vergleichbar mit der vom WT. Zwar erhöht der *stra8*-knock-out die Keimzellapoptose während der Spermatogenese, jedoch können geschlechtsreife Lachse diesen Zellverlust durch erhöhte Produktion spermatogener Zysten kompensieren und sind so weiterhin in der Lage, funktionelle Spermien zu produzieren.

Kleppe et al. (2022) nutzen in dieser Studie die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese zur Generierung von sterilen Lachsen (*Salmo salar*). Entsprechende Lachse umgehen Probleme der Aquakultur wie die vorzeitige Reifung und die genetische Einkreuzung von gezüchteten Rassen in Wildpopulationen. Zur Produktion steriler Fische wurde das Target-Gen *dnd* sowie das *slc45a2*-Gen ausgeknockt. Die Mutation des *slc45a2*-Gens führt dabei zu einem Phänotyp mit

fehlender Pigmentierung und stellt so ein visuelles Tool für das Screening eines erfolgreichen knock-out dar. dnd-Mutanten und der WT wurden anschließend drei Jahre bis zur Erntegröße gezüchtet und auf verschiedene Faktoren untersucht. Es zeigten sich nur wenige Unterschiede zwischen Mutante und WT. Die Menge an Omega-3-Fettsäuren in Filets war beispielsweise gleich, jedoch war der relative Gehalt an Omega-3-Fettsäuren höher als bei WT-Männchen. Die Körperwachstumsrate, der Konditionsfaktor und die Lebergröße waren hingegen bei WT-Fischen signifikant höher, was im Beginn der Pubertät begründet liegt. Bei einer Verschiebung des Ernte-Zeitpunkts konnten hingegen größere Filets im Falle der Mutante erreicht werden, da durch Ausbleiben der Geschlechtsreife ein ungehemmtes Wachstumspotenzial vorlag. Aufgrund der Verhinderung genetischer Integration mit Wildpopulationen bei keimzelllosen Lachsen, der Vermeidung von reifungsassoziierten Problemen und der Möglichkeit größere Filets zu produzieren könnten sterilen Lachse vorteilhaft für die Aquakultur sein.

In der Studie von Almeida et al. (2022) wurde ebenfalls die genetische Sterilisation von Zuchtlachsen (*Salmo salar*) untersucht, um eine genetische Einkreuzung in Wildpopulationen zu verhindern. Dabei wurde die N-Domäne des Argonautenproteins piwil1 (Piwi-like protein 1) als Target für einen CRISPR/Cas9-vermittelten knock-out gewählt. Vom piwil1 ist dabei bekannt, dass es in anderen Organismen eine essenzielle Rolle für das Überleben von Keimzellen spielt. Der knock-out führte bei vielen männlichen Individuen zu einem vorübergehenden Keimzellverlust und zu Verzögerungen des Spermatogenesevorgangs, sodass das piwil1-Gen vermutlich an der Spermatogenese beteiligt ist. Dennoch wiesen im späteren Stadium alle Mutanten der F0-Generation Keimzellen auf, durchliefen die Pubertät und wurden fruchtbar. Durch die Kreuzung von mutierten Fischen konnten Individuen mit einer homozygoten Mutation des piwil1-Gens generiert werden. Entsprechende homozygot mutierte Fische wiesen dabei keine Keimzellen auf, während ein heterozygoter knock-out nur die Anzahl der Keimzellen reduzierte. Das Argonautenprotein piwil1 ist somit essenziell für die Bildung von Keimzellen beim Lachs.

2.2.4.3 Untersuchung und genetische Optimierung entwicklungsbezogener Aspekte

Ein weiteres Feld, in welchem die Modifizierung von Genen Anwendung findet, sind entwicklungs-bezogene Aspekte. In der Vergangenheit wurde das gene editing zum Beispiel schon zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der Entwicklung der Pigmentierung oder der Augen- und Kopfentwicklung von Fischen genutzt (Huang et al. 2021; Flamarique et al. 2021). Auch in der Aquakultur werden verschiedene Aspekte der Entwicklung für eine Steigerung der Effizienz mittels gene editing optimiert. Ansätze sind dabei zum Beispiel eine Zunahme der Muskelmasse bzw. des Körpergewichts, eine bessere Muskelqualität, ein schnelleres Wachstum, eine erhöhte Futterraufnahme oder effizientere Energienutzung der Fische (Xia et al. 2021; Mankiewicz et al. 2022).

Studien, welche die Editierung von Genen zur Untersuchung oder Optimierung der Entwicklung in Fischen nutzen, werden in den nachfolgenden Absätzen aufgeführt.

Acipenser ruthenus

Stundl et al. (2022) nutzten die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese zur funktionellen Untersuchung der Gene tyr (Tyrosinase, an der Melaninproduktion beteiligt) und shh (Sonic Hedgehog, pleiotroper Entwicklungsregulator) in *Acipenser ruthenus*. In der Studie konnten biallelische Mutationen mit einer Effizienz von 30 % bis 40 % erreicht werden. Der knock-out des tyr-Gens führte dabei zu einem Larvenalbinismus ohne andere erkennbare Entwicklungsdefekte. Dadurch dass sich der Mutanten-Phänotyp visuell leicht vom WT-Phänotyp unterscheiden

lässt, wird das tyr-targeting als potenzielle positive Kontrolle für zukünftige Studien vorgeschlagen. Der knock-out des shh-Gens führt wiederum zu Defekten in einem breiten Spektrum embryonaler und larvaler Gewebe und Strukturen. Die Sterblichkeitsrate lag zudem bei über 30 %. Der shh-Entwicklungsregulator spielt somit eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung von Geweben und Organsystemen.

Carassius gibelio

In der Studie von Huang et al. (2021) in *Carassius gibelio* sollte die Funktion des p85 α -Gens untersucht werden. Das Gen codiert für die p85 α -Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), wobei die PI3K-Signalübertragung eine unverzichtbare Rolle im Stoffwechsel und in der Energiehomöostase spielt. Mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode wurde ein heterozygoter knock-out von p85 α erreicht. Entsprechende knock-out Mutanten zeigten einen signifikanten Anstieg im somatischen Wachstum, der Lipidverwertung und der Futterverwertungseffizienz. Der knock-out des p85 α -Gens wurde daher als mögliche Strategie für die Aquakultur vorgeschlagen.

Ctenopharyngodon idella

Xia et al. (2021) führten einen RNAi-vermittelten knock-down der Gene *tgf- β 1* (transforming growth factor beta 1) und *smad4* (SMAD family member 4) in *Ctenopharyngodon idella* durch. In einer vorherigen Studie wurde gezeigt, dass beide Gene die Typ-I-Kollagenexpression im Muskel von mit Ackerbohnen gefütterten Graskarpfen regulieren können. Kollagen Typ I hat dabei einen positiven Einfluss auf Fischmuskelqualität. In dieser Studie sollte hingegen untersucht werden, ob sich die Ergebnisse auch auf gewöhnliche Graskarpfen, die mit normalem Futter gefüttert werden, übertragen lassen. Der knock-down des *tgf- β 1*- und *smad4*-Gens führte jeweils zu einer Herunterregulation des Kollagen Typ I mRNA-Spiegels. Zusätzlich erhöhte ein gleichzeitiger knock-down der beiden Gene die Abnahme der Kollagen Typ I-Expression signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass *tgf- β 1*- und *smad4*-Gene die Typ-I-Kollagenexpression in Graskarpfenmuskeln regulieren und folglich auch einen Einfluss auf die Fischmuskelqualität haben.

Cyprinus carpio

Aufgrund seiner Nutzung als Speisefisch ist eine Zunahme der Skelettmuskelmasse und eine Verbesserung des Wachstums für den Karpfen (*Cyprinus carpio*) wünschenswert. Shahiet al. (2022) nutzten in dieser Studie den CRISPR/Cas9-RNP-vermittelten knock-out des *mstnba*-Gens (myostatin a), das für einen negativen Regulator des Wachstums und der Entwicklung der Muskulatur codiert. Es konnte eine Mutageneseeffizienz von bis zu 95 % ohne sichtbare Off-Target-Effekte erreicht werden. Der knock-out des *mstnba*-Gens führte dabei zu einer signifikanten Zunahme des Körpergewichts sowie der Körperbreite und -länge. Zusätzlich konnte eine Erhöhung der Dichte der Skelettmuskelfasern um 51,4 % sowie eine Zunahme der Muskelmasse durch Hyperplasie (49,5 % Zunahme der Myofaserzahl) bzw. Hypertrophie (11 % Zunahme des Myofaserdurchmessers) erreicht werden.

In der Studie von Zhai et al. (2022) wurde der Geschlechtsdimorphismus im Wachstum genutzt, um eine Effizienzsteigerung für die Aquakultur zu erreichen (vgl. 2.2.4.2 Genetische Editierung der Keimzellen). Die Generierung einer rein weiblichen *Cyprinus carpio*-Population durch den knock-out des *17a1*-Gens (17 α -methyltestosterone) führte dabei zu einer durchschnittlichen Zunahme des Körpergewichts um 6,60 % (8 nach Befruchtung) bzw. 32,66 % (12 nach Befruchtung).

Oncorhynchus mykiss

In der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) wurden die beiden duplizierten igfbp-2b-Gene (insulin-like growth factor binding protein) igfbp-2b1 und igfbp-2b2 durch CRISPR/Cas9-RNP-vermittelte Mutagenese funktionell untersucht (Cleveland et al. 2018). Der knock-out der beiden Gene führte ungefähr 8 und 10 Monate nach dem Schlüpfen zu einer Reduzierung des Körpergewichts und der Gabellänge. Zwischen 10 und 12 Monaten nach dem Schlüpfen trat jedoch eine kompensatorische Wachstumsreaktion auf, die der Wachstumsverzögerung in den Mutanten entgegenwirkte.

Die Studie aus dem Jahr 2020 von Cleveland knüpft an diese Ergebnisse an. Da ausgewachsene Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in der vorhergehenden Studie keine veränderte Wachstumsleistung zeigten, wurden die Komponenten des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF)/IGFBP-Systems in den Mutanten analysiert. Dafür wurde der knock-out der igfbp-2b-Gene (insulin-like growth factor binding protein) weiter untersucht. Der knock-out führte zu einer 35 %-igen Verringerung des Serum-IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), welche durch eine verringerte Expression des IGF-1-Binding Proteins $\alpha 2$ und einer erhöhten Expression des IGF-1-Rezeptors kompensiert wird. Die dadurch erreichte Steigerung der IGF-1-Signalisierungskapazität gleicht somit die Reduktionen des Serum-IGF-1 aus und hält die IGF-1-Signalübertragung auf einem für den Ernährungszustand angemessenen Niveau. igfbp-2b spielt somit zwar eine Rolle bei Regulation der IGF-1-Konzentration, jedoch hat der knock-out aufgrund der kompensatorischen Wirkung anderer Gene des IGF/IGFBP-Systems keinen Einfluss auf das Wachstum oder das Gewicht der Regenbogenforelle.

Flamarique et al. (2021) nutzten das CRISPR/Cas9-System um die Entwicklung der visuellen Wahrnehmung von Wirbeltieren an der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) zu untersuchen. Der knock-out des Gens des sws1-Opsins (short-wavelength sensitive 1) führte dabei zu einer Vielzahl von Entwicklungsfehlern, wie Kopf- und Augenmissbildungen und Fehlbildungen innerhalb des Auges. Obwohl sws1 nur in den einzelnen Zapfen von Wildfischen exprimiert wird, waren alle Photorezeptortypen betroffen. Visuelle Opsin-Gene können somit neben der Phototransduktion auch an regulatorischen Prozessen beteiligt sein, die der Photorezeptor-Differenzierung vorausgehen.

Leptin ist ein pleiotropes Hormon, welches den Appetit und den Stoffwechsel reguliert. In der Studie von Mankiewicz et al. (2022) wurde die Leptin-Signalübertragung in *Oncorhynchus mykiss* untersucht. Dafür wurden die Gene des Leptin-Rezeptors (LepR), lepra1 und lepra2 mittels CRISPR/Cas9-RNP-vermittelter Mutagenese ausgeknockt, und die Auswirkungen wurden charakterisiert. Entsprechende Mutanten zeigten einen hyperphagen Phänotyp, der ein höheres Körpergewicht, eine schnellere Wachstumsrate und einen höheren Konditionsfaktor bedingte. Der Leptin-Rezeptor spielt somit eine Schlüsselrolle im Leptin-Signalweg und beeinflusst die Nahrungsaufnahme sowie die Lipid- und Energiemobilisierung in der Regenbogenforelle.

2.2.4.4 Untersuchung und genetische Optimierung des Lipidmetabolismus

Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LC-PUFAs) sind für ein normales Wachstum und eine normale Entwicklung von Wirbeltieren, den Menschen eingeschlossen, von großer Bedeutung. Zusätzlich spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Linderung von entzündlichen, kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen. Während LC-PUFAs in Landtieren und von ihnen erzeugten Produkten fehlen oder nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind, stellen Meereslebewesen eine einzigartige Quelle für diese Nährstoffe dar. Aufgrund dessen sind

Fische als essenzielles Grundnahrungsmittel von großer Bedeutung für den Menschen. LC-PUFA sind dabei nicht nur für die menschliche Gesundheit essenziell, sondern gewährleisten auch ein normales Wachstum und eine normale Entwicklung der Fische selbst (Xie et al. 2021).

Die endogene Produktion dieser Fettsäuren variiert zwischen den Arten stark und ist bei den Süßwasser- und Salmonidenarten besonders hoch. Neben der Biosynthese wird der LC-PUFA-Gehalt auch durch die Ernährung der Fische beeinflusst. Um den steigenden Bedarf an LC-PUFA-reichem Fisch zu decken, gewann die Verwendung von pflanzlichen Ölen als Fischfutter in der Aquakultur in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Da pflanzliche Öle nur Vorläufer dieser essenziellen Fettsäuren enthalten, führt die reine Fütterung mit Pflanzenölen zu einem niedrigeren LC-PUFA-Gehalt der Filets. Für eine effektive Produktion von fettsäurehaltigen Fischen hat die Untersuchung der Regulation sowie die Optimierung der LC-PUFA-Biosynthese unter der Verwendung von gene editing-Methoden erheblich an Bedeutung gewonnen (Datsomor et al. 2019a; Jin et al. 2020).

Im folgenden Abschnitt werden Studien aufgeführt, die sich mit diesem Aspekt beschäftigen sowie solche, die dem Verständnis des Zusammenhangs von Lipidmetabolismus und anderen zellulären Prozessen (wie dem Immunsystem oder oxidativen Stress) dienen.

Ctenopharyngodon idella

In *Ctenopharyngodon idella* wurden die beiden, an der Triglycerid (TG)-Synthese beteiligten Gene *dgat1a* und *dgat1b* (diglyceride acyltransferase 1a und 1b) untersucht (Sun et al. 2020b). Dafür wurde die NF- κ B-Untereinheit p65 als potenzieller Regulator der beiden Gene identifiziert und mittels RNAi in CIK-Zellen gehemmt. Durch den knock-down wurde die Expression des *dgat1b* signifikant verringert, und es konnte eine Abnahme der TG-Akkumulation beobachtet werden. Somit ist NF- κ B p65 an der Lipidakkumulation beteiligt, indem es die *dgat1b*-induzierte TG-Synthese reguliert (2.2.4.5 Untersuchung und genetische Optimierung der Immunreaktion).

Oxytetracyclin (OTC) und Kupfer verschmutzen aquatische Ökosysteme. In der Studie von Xu et al. (2021a) sollte die Toxizität der Mischung aus OTC und Kupfer auf den Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) untersucht werden. Die Anwesenheit dieser beiden Schadstoffe erhöhte die Expression des *nrf2*-Gens signifikant. Das *nrf2*-Gen codiert für den Nuclear factor E2-related factor 2 und vermittelt die Regulierung von oxidativem Stress und Fettstoffwechsel. Der induzierte oxidative Stress steigerte die *nrf2*-Rekrutierung zum SREBP-1-Promotor und diese erhöht die SREBP-1-vermittelte Lipogenese. Zusätzlich wirkte ein knock-down des *nrf2*-Gens mittels RNAi der, durch die OTC- und Kupfer-Behandlung bestehenden, differenziellen Aktivität von mehreren antioxidativen Enzymen entgegen. *nrf2* fungiert somit als wichtiger antioxidativer Regulator, der oxidativen Stress mit dem lipogenen Metabolismus verbindet.

Oncorhynchus mykiss

In der Studie von Sun et al. (2022a) wurde die Regulation des $\Delta 6$ fads2-Gens ($\Delta 6$ -Fettsäureacyl-Desaturase) in *Oncorhynchus mykiss* untersucht. Die $\Delta 6$ -Fettsäureacyl-Desaturase ist dabei an der Synthese von langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren beteiligt. Neben Fütterungsexperimenten und Expressionsstudien wurden auch die Auswirkungen des RNAi-vermittelten knock-downs des *c/ebp α* -Gens (CCAAT/enhancer-binding protein α) und des *gata3*-Gens (GATA binding protein 3) auf *fads2* untersucht. Der knock-down führte zu einer signifikanten Verringerung der $\Delta 6$ fads2-Expression. *c/ebp α* und *gata3* wirken somit als direkte

Regulatoren des $\Delta 6$ fads2-Gens und liefern Erkenntnisse über molekulare Regulationsmechanismen der LC-PUFA-Biosynthese.

Salmo salar

In der Studie von Datsomor et al. (2019) wurden die Funktionen von Fettacyl-Desaturasen (fads2) sowie deren Redundanz im Lachs (*Salmo salar*) untersucht. Dafür wurden Mutanten mit einem knock-out der $\Delta 6$ fads2-a, $\Delta 6$ fads2-b, $\Delta 6$ fads2-c und $\Delta 5$ fads2-Gene bzw. mit einem knock-down der Gene $\Delta 6$ fads2-b und $\Delta 6$ fads2-c mittels CRISPR-Cas9 generiert. Dabei konnte herausgefunden werden, dass $\Delta 6$ -Fads2-Enzyme die Entsättigung verschiedener Fettsäuren vermitteln und Srebp-1 (Sterolregulationselement-bindenden Protein 1) ein wichtiger Transkriptionsregulator der LC-PUFA-Biosynthese ist, dessen Expression durch die LC-PUFA-Synthese sowie die LC-PUFA-Zusammensetzung der Nahrung kontrolliert wird.

Der Atlantische Lachs (*Salmo salar*) kann mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) durch Elovl2 (very long chain fatty acyl elongases) und Fads (fatty acyl desaturases) in begrenztem Umfang synthetisieren. Dieser Vorgang ist Voraussetzung für nachhaltige Verwendung von Pflanzenölen in Fischfutter. Die Nutzung von pflanzlichen Ölen nimmt in der Aquakultur immer mehr an Bedeutung zu, da derzeitige Fischölquellen den steigenden Bedarf an Omega-3-PUFAs nicht decken können. In einer weiteren Studie von Datsomor et al. (2019b) sollten daher die molekularen Mechanismen der PUFA-Biosynthese und -Regulierung weiter untersucht werden. Dafür wurde ein knock-out des elovl2-Gens mittels Crispr/Cas9 durchgeführt. Der knock-out dieses Gens führte dabei zu einer verringerten Synthese der mehrfach ungesättigten Arachidonsäure, wodurch die Expression von lipogenen Genen beeinflusst wurde. Das Gen elovl2 spielt somit eine wichtige Rolle in der PUFA-Synthese und dient zur Umwandlung von Fettsäuren aus Pflanzenölen, sodass es als potenzieller Zuchtmarker für die Aquakultur vorgeschlagen wird.

Die Studie von Jin et al. (2020) befasst sich ebenfalls mit dem reduzierten LC-PUFA-Gehalt in *Salmo salar* durch die Einführung von Pflanzenöl im Zuchtlachsfutter. Da die LC-PUFA-Synthese neben den Vorläuferfettsäuren in der Nahrung und auch vom genetischen Potenzial der Lachse abhängt, wurden Gene der LC-PUFA-Synthese untersucht. Zu den Schlüsselgenen der LC-PUFA-Synthese gehören die $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Fettacyl-Desaturasen. Mittels CRISPR/cas9 wurden entsprechende Gene ausgeknockt, und die Auswirkungen des knock-outs wurden untersucht. Es konnten dabei eine differentielle Expression von Genen der Lipidstoffwechselwege der Leber beobachtet werden sowie eine Hochregulierung von srebp1-Genen (ein wichtiger Transkriptionsregulator des Lipidstoffwechsels) und Downstream-Genen, die an der de-novo-Synthese von Fettsäuren, der β -Oxidation von Fettsäuren und der Lipogenese beteiligt sind.

2.2.4.5 Untersuchung und genetische Optimierung der Immunreaktion

Das Auftreten von Krankheiten ist ein großes Problem in der Aquakultur, welches zu hohen finanziellen Verlusten und zu Tierleid führt. Derzeitige Methoden zur Bekämpfung von aquatischen Erkrankungen beruhen meistens auf Antibiotika oder Impfstoffen. Während die Verwendung von Antibiotika nicht nachhaltig ist, sind derzeitige Impfstoffe bisher nicht sehr wirksam (Semple und Dixon 2020).

Für die Entwicklung effektiver Impfstoffe ist ein tiefgehendes Verständnis der Fischimmunologie von großer Bedeutung. Ein wirksamer Ansatz ist die Verwendung von gene editing Methoden. Diese Techniken können dabei nicht nur zur Entschlüsselung des Immunsystems,

sondern auch zur Generierung einer Immunität gegen bestimmte Krankheiten auf genetischer Basis dienen.

In den folgenden Absätzen werden Studien aufgeführt, welche die Editierung von Genen zur Untersuchung der Grundlagen des Immunsystems in Fischen oder für die Erzeugung von Immunitäten nutzen.

Carassius gibelio

In der Studie von Mou et al. (2022) wurde der Funktionsunterschied von zwei duplizierten Viperin-Homöologen (viperin-A und viperin-B) mithilfe von CRISPR/Cas9 in *Carassius gibelio* untersucht. Der knock-out von viperin-A betraf dabei hauptsächlich immunbezogene Signalwege, während der knock-out von viperin-B Autophagie-assoziierte Signalwege beeinflusste. Der gleichzeitige knock-out beider Gene führte hingegen zu einem vollständigen Verlust der Resistenzfähigkeit gegen CaHV (C. auratus Herpesvirus). Die beiden Homöologen sind somit kooperativ an der antiviralen Reaktion gegen CaHV beteiligt, wobei viperin-B zusätzlich eine Funktion im Zusammenhang mit der Autophagie entwickelt hat.

Ctenopharyngodon idella

Zu dem nachfolgenden Abschnitt zu *Ctenopharyngodon idella* ist anzumerken, dass die verwendeten gene editing-Techniken ausschließlich in Zelllinien erfolgten und jeweils nur einen kleinen Teil der Methodik der jeweiligen Studie ausmachen.

Huang et al. (2017) untersuchten die Funktion des p53-Gens (p53 tumor suppressor) in *Ctenopharyngodon idella*, welches zusammen mit NF- κ B und PKR (protein kinase R) an der antiviralen Reaktion beteiligt ist. Der RNAi-vermittelte knock-down des p53-Gens verringerte die Expression von PKR signifikant. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die p53-Transkription wiederum durch NF- κ B reguliert wird. p53 ist somit der zentrale Vermittler zwischen der NF- κ B- und PKR-Transkription innerhalb der antiviralen Immunantwort.

In der Studie von Xu et al. (2017) wurden die Gene *zdhhc1* (zinc finger DHHC-type containing 1) und *sting* (stimulator of IFN gene) im Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) funktionell untersucht. Die Gene codieren für ER (Endoplasmatisches Retikulum) - assoziierte Transmembranproteine, die eine Rolle bei der Reaktion auf virale DNA-Infektionen spielen, indem sie IRF3 (interferon regulatory transcription factor) aktivieren. Der knock-down des *sting*-Gens mittels RNAi führte zur Hemmung der Expression von Interferonen (IFN) und *zdhhc1*. Der RNAi-vermittelte knock-down von *zdhhc1* verringerte ebenfalls die IFN-Expression signifikant, zeigte aber keine Wirkung auf die *sting*-Expression. *sting* und *zdhhc1* vermitteln somit die Immunreaktion auf Viren, indem sie IRF3 aktivieren und schließlich die IFN-Expression auslösen. Dabei ist eine Expression von *sting* für die Interferon-Aktivierung durch *zdhhc1* notwendig.

Der Graskarpfen-Reovirus (GCRV) verursacht eine hämorrhagische Krankheit und beeinträchtigt so die Graskarpfenzucht (*Ctenopharyngodon idella*). Ein Gen, das eine Rolle in den antiviralen Immunantworten spielt, ist das Gen *Igp2* (Laboratory of genetics and physiology 2). In der Studie von Rao et al. (2017) wurden die Regulationsmechanismen als Antwort auf eine GCRV-Infektion in CIK-Zellen identifiziert. Der knock-down von *Igp2* mittels RNAi verstärkte dabei die Immunantworten durch IFNs, NF- κ Bs und IRF3/7. *Igp2* dient somit als negativer Regulator der antiviralen Signalübertragung in der Ruhephase während des frühen Stadiums einer GCRV-Infektion.

In der Studie von Dang et al. (2017) wurde das *masp-1*-Gen (mannan-binding lectin-associated serine protease-1) in *Ctenopharyngodon idella* untersucht, dessen Immunfunktion bei Fischen

bis dahin unklar war. Der RNAi-vermittelte knock-down des masp-1 Gens in CIPH-Zellen führte zu einer signifikanten Abnahme der CD59-Expression (protectin), welches zur Gruppe der CRPs (complement regulatory protein) gehört. Nach einer *Aeromonas hydrophila*-Infektion lag das Expressionsniveau beider untersuchten CRP-Gene (CD59 und IL1-b) sowie das von IFN in den knock-down Zellen unter dem Expressionsniveau im WT. masp-1 spielt folglich eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität, indem es Immunantworten gegen *A. hydrophila* vermittelt.

Im darauffolgenden Jahr untersuchten Dang et al. (2018a) das mbl-Gen (Mannose-binding lectin) in *Ctenopharyngodon idella*. mbl ist das Startmolekül des Lektinweges, der die angeborene und die adaptive Immunität miteinander verbindet und einen der vier Signalwege des Komplementsystems darstellt. Durch den knock-down des mbl-Gens in Graskarpfen-Leberzellen konnte gezeigt werden, dass mbl die bakterielle Immunantwort reguliert, indem es die Komplementkaskade und die IFN-Aktivierung induziert.

In einer weiteren Studie von Dang et al. (2018b) erfolgte die Identifizierung und anschließende Charakterisierung eines Bf/C2-Homologs Bf/C2b in *Ctenopharyngodon idella*. Der RNAi vermittelte knock-down des bf/c2b-Gens führte zur verringerten Expression aller Komplementsystem-bezogenen Gene und zur Unterdrückung der Immunantwort bei einer bakteriellen Infektion. Somit spielt Bf/C2b eine Rolle im Komplementsystem und in der angeborenen Immunität.

Yu et al. (2018) nutzten die RNA-Interferenz zur Charakterisierung der Funktion des tbk1-Gens (TANK-binding kinase 1) in *Ctenopharyngodon idella*. Aus anderen Studien ist bekannt, dass tbk1 als Mediator der IRF7-Aktivierung (IFN regulatory factor) im Falle einer Pathogeninfektion fungiert. Der RNAi-vermittelte knock-down des irf7-Gens führte dabei zu einer Hemmung der isg-Expression (interferon-stimulated genes). Die Kinase TBK1 reguliert somit über IRF7 die isg-Transkription im Zuge der Immunantwort.

Gegen den Graskarpfen-Reovirus (GCRV) gibt es bisher keine wirksamen Methoden zur Vorbeugung und Behandlung, wobei die Entwicklung solch einer wirksamen antiviralen Behandlung durch das Vorhandensein verschiedener GCRV-Genotypen erschwert wird. In der Studie von Ma et al. (2018) wurde ein Ansatz für eine Resistenz gegen eine Genotyp-unabhängige GCRV-Infektion getestet, der auf dem knock-out des jam-A-Gens (Junctional Adhesion Molecule-A) mittels CRISPR-Cas9 beruht. Der knock-out führte zu einer Reduzierung der GCRV-Infektion für zwei verschiedene GCRV-Genotypen in Graskarpfen-Nierenzellen. Dabei konnte eine Unterdrückung des zytopathischen Effekts und der Replikation von GCRV in entsprechenden knock-out Zellen beobachtet werden.

Li et al. (2018b) nutzten die RNAi-Methode zur funktionellen Untersuchung des samhd1-Gens (Sterile Alpha Motif and Histidine-Aspartate Domain 1) in *Ctenopharyngodon idella*. Der knock-down dieses Gens hemmte die Expression von Interferonen, sodass samhd1 vermutlich als Aktivator der angeborenen Immunantwort fungiert.

Wang et al. (2018a) untersuchten in dieser Studie die Funktion des stat3-Gens (Signal transducer and activator of transcription 3) in *Ctenopharyngodon idella*. Der RNAi-vermittelte knock-down des stat3-Gens in CIK-Zellen erhöht die Phosphorylierung von eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2). Im Gegensatz dazu unterdrückt der knock-down des pkr-Gens, welches für einen Interaktionspartner von stat3 codiert, die eIF2 α -Phosphorylierung. Somit konnte gezeigt werden, dass STAT3 über die Interaktion mit PKR die Phosphorylierung von eIF2 α reguliert.

Fang et al. (2018) erzeugten mittels RNAi *Ctenopharyngodon idella*-Zellen mit einem knock-down der Gene gadd45aa und gadd45-ab (growth arrest and DNA damage-inducible 45). Durch den knock-down des gadd45aa-Gens wurde dabei die Expression von il8 (Interleukin-8) signifikant gehemmt. Der gadd45ab-knock-down führte sowohl zu einer signifikant verringerten Expression des il8-, als auch des jnk- (c-Jun N-terminal kinases) und des erk-Gens (extracellular-signal regulated kinases). Somit konnten beide Gene als aktivierende Immunfaktoren identifiziert werden, die eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielen.

In der Studie von Chu et al. (2018) wurde das nlrp1-Gen (NLR Family Member X1) in *Ctenopharyngodon idella* funktionell untersucht. Der knock-down des nlrp1-Gens in CIK-Zellen führte dabei zu einer Erhöhung der Expression von irf3, irf7 und ifn-1, sodass nlrp1 vermutlich als negativer Regulator der Interferon-Expression bei angeborenen Immunantworten fungiert.

In der Studie von Rao et al. (2018) wurde das hmgb1b-Gen (high-mobility group box 1b) als Hitzeschockprotein70-abhängiges (HSP70), pro-autophagisches Protein in *Ctenopharyngodon idella* identifiziert. Der knock-down beider Gene mittels RNAi zeigte, dass HMGB1b eine antivirale Funktion besitzt, indem es eine ROS-induzierte Autophagie als Reaktion auf eine GCRV-Infektion vermittelt. Zudem konnte beobachtet werden, dass HSP70 diese HMGB1b-vermittelte Autophagie-Initiation negativ reguliert.

Ji et al. (2018) nutzten die RNAi-Methode zum knock-down des tlr19-Gens (pivotal pattern recognition receptors 19) in *Ctenopharyngodon idella*. Die Studie identifizierte dabei das tlr19-Gen als Teil der Anti-GCRV-Immunantwort, dass die Zellen vor einer GCRV-Infektion schützt und gleichzeitig die Replikation von GCRV hemmt.

Fang et al. (2019) führten einen RNAi-vermittelten knock-down zur Funktionsanalyse des gadd45g-Gens (growth arrest and DNA damage-inducible 45 γ) in *Ctenopharyngodon idella* durch. Die Ergebnisse legen dabei nahe, dass gadd45g eine Rolle bei der Immunreaktion auf eine *Aeromonas hydrophila*-Infektion spielt, indem es die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen induziert.

In der Studie von Weng et al. (2019) wurde das rsk2-Gen (ribosomal protein S6 kinase alpha 3) in *Ctenopharyngodon idella* untersucht. rsk2 codiert dabei für ein Protein im MAPK-Signalweg, der ein Teil des angeborenen Immunsystems ist. Ein RNAi-vermittelter knock-down des rsk2-Gens reduzierte dabei die Expression eines negativen Regulators der Apoptose, BCL-2 (B-cell lymphoma 2). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Funktion von RSK2 innerhalb des Immunsystems darin besteht, die Zellapoptose durch die Expression von bcl-2 zu hemmen.

Wu et al. (2019) nutzten den RNAi-vermittelten knock-down zur Funktionsanalyse des irak4-Gens (IL-1R-associated kinase 4) in *Ctenopharyngodon idella*. Anhand der Ergebnisse dieser Studie konnte gezeigt werden, dass IRAK-4 die Aktivität von IRF5 (Interferon regulatory factor 5) innerhalb der Immunantwort nur indirekt reguliert.

Xu et al. (2019a) konnten in dieser Studie die Funktion von samhd1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1) bei der Induktion der Apoptose und der Hemmung der Proliferation von GCRV in *Ctenopharyngodon idella* identifizieren. Durch verschiedene RNAi-Ansätze konnte dabei gezeigt werden, dass die Expression von samhd1 durch die Interferonregulationsfaktoren IRF3 und IRF9 reguliert wird.

Chu et al. (2019b) untersuchten ein Mitglied der IRAK-Familie (IRAK-M (Interleukin-1 receptor-associated kinase M)), die eine wichtige Rolle bei der MyD88-abhängigen/TLR-Signalübertragung im angeborenen Immunsystem in *Ctenopharyngodon idella* spielt. Ein knock-down des

irak-M-Gens mittels RNAi führte dabei zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate von Interleukinen und des Tumornekrosefaktors α (TNF- α). Somit konnte gezeigt werden, dass die Kinase IRAK-M an der Immunregulation beteiligt ist, indem sie als negativer Regulator von Entzündungs-assoziierten Zytokinen fungiert.

Luo et al. (2019) konnten im selben Jahr einen weiteren negativen Regulator der mit entzündungsassoziierten Zytokinen in *Ctenopharyngodon idella* identifizieren. Der knock-down des Gens der E3-Ubiquitin-Ligase RNF144B (Ring Finger Protein 144 B) führte dabei zu einem signifikanten Anstieg der Expression von Entzündungszytokinen.

In einer Studie von Xu et al. (2019) wurde das Gen *stk38* (Serine/threonine kinase 38) in *Ctenopharyngodon idella* in Bezug auf seine Rolle bei der angeborenen Immunantwort untersucht. Anhand eines RNAi-vermittelten knock-downs konnte dabei gezeigt werden, dass STK38 die Expression des Interferon-1 durch eine Dephosphosphorylierung der GSK3 β -Kinase reguliert.

Zhu et al. (2019) nutzten die RNAi-Methode zum knock-down des *batf3*-Gens (Basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3) in *Ctenopharyngodon idella*. In dieser Studie konnte dabei gezeigt werden, dass BATF3 die Expression von verschiedenen Interleukinen reguliert und somit eine regulative Rolle bei der Immunantwort spielt.

In der Studie von Zhong et al. (2019) wurde die Kinase IKK β (I κ B kinase β) funktionell in *Ctenopharyngodon idella* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass IKK β über den NF- κ B-Signalweg einem ER-Stressinduzierten Zelltod entgegenwirken kann. Zudem wurde der Transkriptionsfaktor XBP1S (X-boxbinding protein 1) als Interaktionspartner von IKK β identifiziert. Der RNAi-vermittelte knock-down des *xbp1*-Gens beeinflusste die *ikk β* -Expression hingegen nicht. Die Kinase IKK β könnte somit eine vermittelnde Funktion besitzen und über die Interaktion mit XBP1 zur Verbindung zwischen der angeborenen Immunität und dem zellulären Stress beitragen.

Hu et al. (2020b) untersuchten in dieser Studie die Funktion des *ddx41*-Gens (DEAD-Box-Polypeptid 41) in *Ctenopharyngodon idella*. Anhand eines knock-downs mittels RNAi konnte gezeigt werden, dass DDX41 über den STING-IRF7-vermittelten Signalweg zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort führt.

Chen et al. (2020) nutzten die RNA-Interferenz zum knock-down des *nrf2*-Gens in *Ctenopharyngodon idella*. In der Studie konnte dabei gezeigt werden, dass nrf2 die Expression der Häm-Oxygenase 1 als Reaktion auf oxidativen Stress hochreguliert und so die Überlebensfähigkeit der Zellen steigert.

In der Studie von Qi et al. (2020) in *Ctenopharyngodon idella* konnte über einen RNAi-vermittelten knock-down gezeigt werden, dass die Expression des *bcl-xl*-Gens (B-cell lymphoma-extra large) durch den NF- κ B-Signalweg reguliert wird. Zudem konnte die anti-apoptotische Funktion von Bcl-xl identifiziert werden, bei welcher es mit Bax2 interagiert und dessen apoptotische Aktivität hemmt.

Der knock-down der Gene *irak1* und *stat3* mittels RNAi führte jeweils zu einer verringerten Expression des entzündungshemmenden Interleukin-10 in *Ctenopharyngodon idella* (Xie et al. 2020). In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass IRAK1 und STAT3 ein Dimer bilden und so die Interleukin-10-Expression im Falle einer Infektion aktivieren.

Über einen RNAi-vermittelten knock-down konnte in der Studie von Hu et al. (2020c) in *Ctenopharyngodon idella* gezeigt werden, dass das Protein PACT (PKR activating protein) die

Translokation von p65 vom Zytoplasma in den Zellkern über die Proteinkinase R (PKR) induziert. PACT aktiviert somit durch einen PKR-abhängigen Mechanismus die Apoptose und die NF- κ B-assoziierte Immunantwort.

In dieser Studie von Li et al. (2020b) wurde die Funktion des traf6-Gens (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) in *Ctenopharyngodon idella* untersucht. Durch einen knock-down des traf6- und des irf5-Gens (interferon regulatory factor 5) konnte belegt werden, dass der Faktor TRAF6 an der Immunantwort beteiligt ist, indem er IRF5 aktiviert und so die Expression des Interferon 1 (IFN1) steigert.

Jiang et al. (2020) nutzen die RNAi-Methode zur Untersuchung der Funktion des irf9-Gens (Interferon Regulatory Factor 9) in *Ctenopharyngodon idella*. In dieser Studie konnte dabei gezeigt werden, dass IRF9 zur Apoptose und zur angeborenen Immunität beiträgt, indem es die SIRT1-p53-Achse hemmt.

Sun et al. (2020b) untersuchten anhand der Gene dgat1a und dgat1b (diglyceride acyltransferase) sowie der NF- κ B-Untereinheit p65 das Zusammenspiel zwischen Immunität und Fettstoffwechsel in *Ctenopharyngodon idella* (vgl. 2.2.4.4 Untersuchung und genetische Optimierung des Lipidmetabolismus). Diese Studie zeigte dabei, dass der NF- κ B-Signalweg an der Lipidakkumulation beteiligt ist, indem es die dgat1b-induzierte TG-Synthese induziert.

Ji et al. (2020) generierten mittels RNAi einen knock-down der Gene tlr22a und tlr22b des Rezeptorproteins TLR22 (Toll-like receptor 22) in *Ctenopharyngodon idella*. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass TLR22a und TLR22b bei antiviralen Immunantworten antagonisieren und so das Gleichgewicht der Immunantworten aufrechterhalten. Dabei fördert TLR22a die antivirale Immunantwort, während TLR22b den gegenteiligen Effekt zeigt.

In der Studie von Wu et al. (2021b) erfolgte die Untersuchung des Mechanismus und der Wirkung des tollip-Gens (Toll-interacting protein) auf den MyD88-NF- κ B-Signalweg des *Ctenopharyngodon idella*-Immunsystems. Durch einen RNAi-vermittelten knock-down des tollip-Gens konnte dabei gezeigt werden, dass Tollip die Expression von TNF- α verringert, dadurch die MyD88-induzierte Aktivierung von NF- κ B unterdrückt und so die Immunantwort hemmt.

Durch den RNAi-induzierten knock-down konnte von Chang et al. (2021) gezeigt werden, dass der Interferon-regulierende Faktor 8 (IRF8) die Interferon 1-Expression durch eine Interaktion mit dem Interferon-regulierenden Faktor 2 (IRF2) in *Ctenopharyngodon idella* hemmt.

Liu et al. untersuchten 2021 die Funktion der Tyrosinkinase TNK1 (thirty-eight-negative kinase 1) in *Ctenopharyngodon idella* und wendete unter anderem die RNA-Interferenz für den knock-down des tkn1-Gens und eines potenziellen Interaktionspartners an. Anhand der Ergebnisse der Studie konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinkinase die ifn1-Expression aktiviert, indem sie den JAK-STAT-Signalweg im Rahmen der Immunantwort reguliert.

Als negativer Regulator der Interferon 1-Expression konnte hingegen die Tyrosinphosphatase SHP2 (Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase 2) in *Ctenopharyngodon idella* identifiziert werden (Lu et al. 2021). In dieser Studie konnte dabei gezeigt werden, dass SHP2 die Hemmung der IFN1-Expression durch eine GSK3 β -Phosphorylierung verursacht. Der RNAi-vermittelte knock-down des shp2-Gens erhöhte hingegen die Expression von ifn1.

In der Studie in *Ctenopharyngodon idella* von Xu et al. (2021b) wurde die Rolle des mre11A-Gens (MRE11 meiotic recombination 11 homolog A) in der Abwehr gegen eine GCRV-Infektion untersucht. Dafür wurde ein RNAi-vermittelter knock-down des mre11A-Gens durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie sprechen dafür, dass Mre11A die angeborene Immunantwort bei

Graskarpfen aktiviert, indem es IFN 1 und ISG15 (Interferon-Stimulated Gene 15) über STING induziert.

Li et al. (2021c) identifizierten die Funktion des nrf2-Gens in *Ctenopharyngodon idella*. Der knock-down des nrf2-Gens führte dabei zur Herunterregulation von verschiedenen antioxidativen Genen. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass NRF2 durch eine Regulierung des Redoxgleichgewichts an der Immunantwort beteiligt ist.

In einer weiteren Studie von Li et al. (2021d) aus demselben Jahr wurde die Funktion der Kinase MST2 ("mammalian sterile 20-like" kinase 2) in *Ctenopharyngodon idella* untersucht. Der knock-down des mst2-Gens mittels RNAi führte zur Verringerung des Expressionsniveaus von nrf2 und mehrerer Antioxidasen. Somit konnte gezeigt werden, dass MST2 an der angeborenen Immunität beteiligt ist, indem es die Redoxhomöostase über den NRF2-ARE-Signalweg reguliert.

Die Studie von Hu et al. (2021) untersuchte die spezifische Rolle des ppp1r3g-Gens (protein phosphatase-1 Homolog im Graskarpfen) bei der antiviralen Reaktion in *Ctenopharyngodon idella*. Der knock-down des ppp1r3g-Gens mittels RNAi führte dabei zu einer signifikanten Erhöhung der ifn1-Expression. Zusammengefasst mit den weiteren Ergebnissen der Studie konnte herausgefunden werden, dass PPP1R3G den Interferon-regulierenden Faktor 3 sowie die Interferon 1-Expression hemmt und so als negativer Regulator der Anti-GCRV-Immunantwort fungiert.

Fan et al. (2021) nutzten die RNA-Interferenz zum knock-down des mxG-Gens (Myxovirus-Resistenzprotein G) in *Ctenopharyngodon idella*. Der knock-down bedingte dabei eine signifikante Hemmung der viralen Replikation und eine Abschwächung des zytopathischen Effekts. Anhand der Ergebnisse dieser Studie konnte dabei vermutet werden, dass die Expression von MxG durch Interferone und Viren induziert wird und Proteine der Immunantwort in einer negativen Rückkopplungsweise abbaut. Somit wurde erstmals ein negativer Regulator in der Mx-Familie identifiziert, dessen Funktion die Aufrechterhaltung der Homöostase und die Vermeidung übermäßiger Immunantworten nach einer Virusinfektion ist.

In der Studie von Yu et al. (2022) konnte mittels RNAi-vermitteltem knock-down gezeigt werden, dass die Kinase NLK2 (nemo-like kinase 2) die IFN-Immunantwort durch eine Unterdrückung der MAVS-IRF3-Sigalkette in *Ctenopharyngodon idella* inhibiert.

Der RNAi-vermittelte knock-down des mif-Gens (Macrophage migration inhibitory factor) in peripheren *Ctenopharyngodon idella*-Blutleukozyten führte zu einer Verringerung der Überlebensfähigkeit der Leukozyten und zur vermehrten Zellapoptose (Wang et al. 2022c). Durch diese Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass MIF eine Rolle bei der Regulierung von Entzündungseigenschaften spielt und für das Überleben von Leukozyten im peripheren Blut notwendig ist.

Cyprinus carpio

In der Studie von Yang et al. (2020) wurde der Effekt des Insektizids Chlorpyrifos auf Karpfen (*Cyprinus carpio*) untersucht. Das Insektizid führte zur Hemmung der Expression von TCR- γ , wodurch der PI3K/AKT/JNK-Weg beeinflusst wurde. Dadurch wurden die Apoptose und die Autophagie in den Lymphozyten des Karpfens induziert. Der RNAi-vermittelte knock-down des tcr- γ -Gens zeigte dabei ebenfalls einen veränderten PI3K/AKT/JNK-Signalweg und die autophagischen Vakuolen in den Lymphozyten. Somit konnte gezeigt werden, dass die

Chlorpyrifos-induzierte Apoptose und Autophagie auf der Störung des TCR- γ -abhängigen PI3K/AKT/JNK-Weges beruhen.

Oncorhynchus mykiss

Kolosov und Kelly (2018) untersuchten den Einfluss der beiden *Oncorhynchus mykiss*-Anguline LSR (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor, Angulin-1) und ILDR2 (immunoglobulin-like domain-containing receptor, Angulin-3) auf die Durchlässigkeit des Kiemenepithels durch den knock-down eines mit Angulinen-assoziierten Gens (tric, tTJ protein tricelluin). Zusammen mit weiteren Daten aus der Studie deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Anguline zu den Barriereeigenschaften des Kiemenepithels beitragen und LSR und ILDR2 unterschiedliche Rollen spielen. Dabei wird vermutet, dass LSR eine Rolle bei der Tric-Rekrutierung spielt, während ILDR2 an der Etablierung von Resistenzeigenschaften der Kiemenepithelien beteiligt ist.

Die Studie von Jang et al. (2019) bezieht sich auf die Pathogenerkennung und die anschließende Immunantwort in Regenbogenforellen, deren Entschlüsselung relevant ist für die Lebensmittelproduktion, das Gesundheitsmanagement in der Aquakultur, die Sportfischerei und die Grundlagenforschung. Im Rahmen dieser Studie wurden dabei die beiden Gene traf6 (TNF Receptor Associated Factor 6) und tak1 (Transforming growth factor β -activated kinase 1) funktionell untersucht, indem ein RNAi-vermittelter knock-down in RTH-149-Zellen aus *Oncorhynchus mykiss* durchgeführt wurde. Die Ergebnisse deuten dabei darauf hin, dass beide Gene eine Schlüsselrolle bei der angeborenen Immunität spielen, indem sie den vorgeschalteten Toll-like-Rezeptoren (TLRs) mit dem nachgeschalteten MAPK- und NF- κ B-Signalweg auf molekularer Ebene verbinden.

Sarais et al. (2021) nutzten die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese in *Oncorhynchus mykiss* CHSE-214-Zellen zur Untersuchung von PIAS-Faktoren (protein inhibitor of activated STAT) in Bezug auf die Immunsignalisierung. Während der CRISPR/Cas9-vermittelte knock-out des exogenen GFP erfolgreich war, konnte keine Mutation in den *pias1*- oder *pias2*-Genen nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass der knock-out dieser Gene eventuell tödlich für die Zellen sein könnte. Anhand einer Überexpressionsstudie konnte jedoch gezeigt werden, dass die beiden PIAS-Faktoren die Transkription von NF- κ B-abhängigen Immungenen modulieren.

Au et al. (2022) gelang in dieser Studie der knock-down von viralen Genen unter Verwendung von sequenzspezifischen, langen dsRNA in *Oncorhynchus mykiss*-Zellen. Lange dsRNA induzieren dabei Typ-I-Interferone, welche den RNAi-Mechanismus hemmen. In dieser Studie konnten jedoch durch lange dsRNA, die mit viralen Gensequenzen übereinstimmen, die Unterdrückung der viralen Replikation für verschiedene Virus-Varianten erreicht werden. Diese Studie stellt somit einen Ansatz zur Hemmung der viralen Proteinsynthese in infizierten *Oncorhynchus mykiss*-Zellen dar.

Salmo salar

Aus vorherigen Studien in *Salmo salar* ist bereits bekannt, dass ein QTL-Locus (Quantitative trait loci) die molekulare Grundlage der genetischen Resistenz gegen das infektiöse Pankreasnekrosevirus (IPNV) bildet. Welche Gene dieser Locus umschließt ist jedoch unklar. Eine weitere Untersuchung dieses Locus ist dabei für eine selektive Zucht von Interesse, um das Auftreten dieser Krankheit zu reduzieren. Die Studie von Pavelin et al. (2021) identifiziert das Gen *nae1* (NEDD-8 activating enzyme 1) als potenziellen Kandidaten, auf dem der QTL-Locus zu Grunde liegt. Während ein CRISPR/Cas9-vermittelter knock-out des zuvor vorgeschlagenen Kandidatengens *cdh1* keinen Einfluss auf die IPNV-Replikation hatte, zeigten *nae1*-knock-out-

Mutanten eine hochsignifikant verringerte IPNV-Replikation. Somit liegt die QTL-vermittelte Resistenz gegen IPNV vermutlich im *nae1*-Gen begründet.

2.2.4.6 Auswahl nGVO-Fische

Anwendungsbezogene Studien, die sich mit gene editing-Techniken in Fischen beschäftigen, beziehen sich auf die Keimzellen, die Entwicklung, den Lipidgehalt der Fische oder deren Resistenz gegen bestimmte Krankheiten (Abb. 5). In dieser Studie wurden nur in Deutschland heimische Fischarten näher betrachtet. Von den Arten *Acipenser ruthenus*, *Carassius gibelio* und *Salmo trutta* gibt es dabei bisher nur wenig anwendungsbezogene Studien, die auf der Geneditierung beruhen. Im Falle der Art *Ctenopharyngodon idellus* wurden sehr viele Studien gefunden, die sich mit der Untersuchung der Immunreaktion auf bestimmte Krankheiten beschäftigen. Dabei handelt es sich jedoch um grundlegende Forschungen zum Immunsystem der Fische, die in isolierten *Ctenopharyngodon idellus*-Zelllinien durchgeführt wurden. Eine Übertragung solcher Versuche auf *Ctenopharyngodon idellus*-Individuen existiert bisher nicht und es gibt nur wenige Studien zu genmodifizierten *Ctenopharyngodon idellus*-Mutanten im Freiland. Für die Arten *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss* und *Salmo salar* wurden bereits Studien durchgeführt, die der Effizienzsteigerung in der Aquakultur, einer Erhöhung des Gehaltes von wertvollen Fettsäuren, der Sterilität der Fische oder der Resistenz gegen bestimmte Krankheiten dienen.

Das *Salmo salar*-Vorkommen in Deutschland ist in der Vergangenheit jedoch sehr stark zurückgegangen. Trotz vieler Bemühungen wird es noch lange dauern, bis sich der Lachsbestand in deutschen Fließgewässern erholt hat. Zum jetzigen Zeitpunkt ist der atlantische Lachs daher nicht als Beispielart geeignet. Die Arten *Cyprinus carpio* und *Oncorhynchus mykiss* würden sich hingegen beide als nGVO für heimische, limnische Systeme eignen. Da für die Art *Oncorhynchus mykiss* bisher deutlich mehr Studien vorliegen, welche sich mit der genetischen Editierung der Fische beschäftigen, haben wir uns für diese Art entschieden.

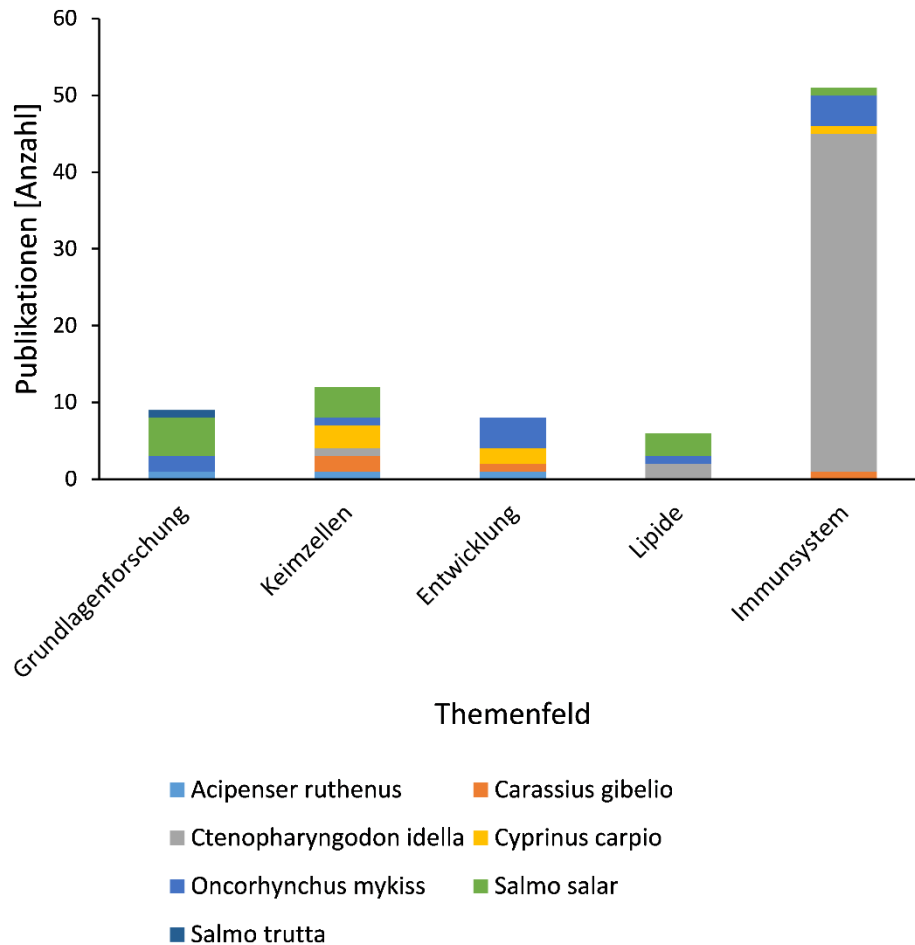


Abb. 5: Verteilung der selektierten Publikationen zur gene editing-Thematik auf die verschiedenen Fisch-Arten. Graphische Darstellung der Anzahl von Publikationen, die im Rahmen der Recherche zu den Fischen gefunden wurden nach Arten und Themenfeldern.

2.2.4.7 Steckbrief von *Oncorhynchus mykiss*

Bei der Art *Oncorhynchus mykiss* handelt es sich um die Regenbogenforelle, einen Fisch der Familie der Salmonidae innerhalb der Ordnung Salmoniformes. Dieser, ursprünglich aus Nordamerika stammende Fisch, wurde Ende des 19. Jahrhunderts als Nutzfisch nach Deutschland gebracht. Er ist in Deutschland weit verbreitet, bevorzugt aber sauerstoffreiche Gewässer mit niedrigen Wassertemperaturen. Die Regenbogenforelle erreicht eine Körperlänge von bis zu 80 cm, bei einem Gewicht von bis zu zehn kg. Ihre Lebenserwartung beträgt maximal sieben Jahre, diese hängt jedoch von den örtlichen Gegebenheiten, wie z. B. der Wasserqualität ab. Die Geschlechtsreife erreichen die Fische mit ungefähr zwei Jahren. Das Maul der Regenbogenforelle ist endständig, die Kopfform leicht abgerundet und die Schwanzflosse ist leicht gegabelt. Sie ist blau-grün oder olivgrün gefärbt, mit einem rötlichen Streifen entlang der Seite und dunklen Punkten an den Flossen. Ihre Färbung kann jedoch zwischen Unterarten oder in Abhängigkeit von der Umgebung variieren. Die Regenbogenforelle zählt zu den Raubfischen und ernährt sich in der Natur von Insekten sowie deren Larven, Krebstieren, Schnecken, Würmern, Kaulquappen und kleinen Fischen. Aufgrund einer interspezifischen Nahrungskonkurrenz verdrängt die Regenbogenforelle die einheimische, kleinere und weniger agile Bachforelle. Ein weiteres Problem, was mit der Einführung der Regenbogenforelle in deutsche Ökosysteme aufgetreten ist, ist das Auftreten verschiedener Fischkrankheiten. Trotzdem ist die

Regenbogenforelle ein viel genutzter Fisch in der Aquakultur und der Sportfischerei (Klinkhardt 2022).

Die Regenbogenforelle gehört zu den am besten untersuchten Fischen weltweit (Helfman 2009). Das Genom der Regenbogenforelle ist bereits vollständig sequenziert. Es liegt eine Reihe an etablierten molekularen Techniken für diese Art vor, wodurch die Art sich gut für genetische Studien eignet. Die Regenbogenforelle stellt zudem einen oft gewählten Modellorganismus innerhalb der Knochenfische dar, der zur Untersuchung von Grundlagen aber auch von anwendungsbezogenen Aspekten dient.

2.3 Literaturreview zu kausalen populationsgenetischen Zusammenhängen und Expositionspfaden von nGVO

Die Beschreibung von Expositionspfaden und von Wirkungszusammenhängen stößt bei neuen gentechnisch veränderten Organismen auf Schwierigkeiten, da in limnischen Systemen bisher keine Freilandexperimente beschrieben wurden (Okoli et al., 2022). Die hier zusammengefassten Ergebnisse der Literaturrecherche beruhen daher im Wesentlichen auf allgemeinen ökologischen Zusammenhängen, Modellstudien und Risikobewertungen.

2.3.1 *Anopheles gambiae*

In Experimenten in großen Käfigen mit gentechnisch veränderten Mücken der Art *Anopheles gambiae* fanden Hammond et al. (2021), dass sich das Gene-drive-Element innerhalb eines Jahres vollständig in der Population verbreitete, ohne dass sich Resistenzen gegen das gene drive ausbildeten. Es kam zu einer schnellen Abnahme fruchtbarer Weibchen und zu einer raschen Verbreitung des homozygoten gene drives. In dieser Studie wurde das doublesex-Gen von *A. gambiae* mit CRISPR verändert.

Adolfi et al. (2020) beobachteten in Käfigexperimenten eine effiziente Änderung der Population von *A. gambiae* mit ≥ 95 % der Population, die das gene drive nach fünf bis elf Generationen besaßen. Funktionale Resistenzgene wirkten der Ausbreitung des gene drive nicht entgegen. Das mit CRISPR veränderte target dieser Studie war das kynurenine-hydroxylase-Gen.

In einer Modellstudie simulierten Hoermann et al. (2022) die Ausbreitung eines gene drive in einer Population von *A. gambiae*. Nach zwei Jahren Simulationszeit erreichte das gene drive seine maximale Verbreitung. Durch die Wirkung funktionaler Resistenzgene nahm die Verbreitung nach vier Jahren Simulationszeit auf 50 % ab.

Yao et al. (2022) untersuchten anhand von *A. coluzzii* die räumliche Ausbreitung eines gene drives. Männliche transgene Mücken waren weniger mobil als Wildtypmücken. Konstante Mortalitätsraten und die Annahme passiver Diffusion für die Ausbreitung in einem Modell erwiesen sich als realistisch, die experimentellen Ergebnisse zu reproduzieren. Nach sieben Monaten waren transgene Männchen aus der Population verschwunden. In dieser Studie wurde das männliche Geschlechtsgen so verändert, dass transgene Männchen steril wurden.

Bei Underdominance gene drives bewirkt die Freisetzung einer gewünschten Homozygote über eine Schwellenhäufigkeit deren Verbreitung in einer Population durch den Fitnessnachteil der Heterozygote. Khamis et al. (2018) koppelten ökologische und epidemiologische Dynamiken mit einem Modell von *A. gambiae*, um den Einfluss verschiedener Arten von Underdominance gene drives zu untersuchen. Diese Autor*innen zeigen, dass reine männliche Freisetzungen deutlich größer sein müssen als bisexuelle Freisetzungen. Abnahmen in der genetischen Fitness der manipulierten Homozygoten können die Underdominance-Schwelle

erheblich erhöhen, aber der Paarungserfolg von transgenen Mücken mit Wildtyp-Weibchen (beeinflusst durch einen Mangel an Wettbewerbsfähigkeit oder die Entwicklung von Verhaltensresistenz in der Form aktiver weiblicher Partnerpräferenz) und die Langlebigkeit künstlich gezüchteter Moskitos sind von entscheidender Bedeutung für die Erfolgchancen für die Durchsetzung des gene drives.

In einer vergleichenden Studie untersuchten Roux et al. (2021) Populationen von *A. gambiae* und *A. coluzzii* in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Prädatoren. Der Fraßdruck bewirkte unterschiedliche physiologische Reaktionen in den beiden sehr ähnlichen und konkurrierenden Arten.

Hayes et al. (2018) geben eine Checkliste vor, wie die Freisetzung genetisch veränderter Organsimen ablaufen kann. Sie unterscheiden vier Phasen: 1) Laborexperimente und kleinskalige Untersuchungen, 2) räumlich begrenzte Freilandexperimente und 3) mesoskalige Freilandexperimente.

Olkeba et al. (2021) identifizierten in experimentellen Untersuchungen in Mesokosmen die wichtigsten Prädatoren von *A. gambiae*: Riesenwasserwanzen (Belostomatiden) übten gefolgt von Rückenschwimmern (Notonectiden) den größten Fraßdruck auf *A. gambiae* aus.

Simoni et al. (2020) führten mit CRISPR Genmanipulationen an männlichen Mücken von *A. gambiae* durch. Mit einem numerischen Modell sagten diese Autor*innen voraus, dass nach 10-14 Generationen die Population erloschen sein würde, vorausgesetzt, dass keine Resistenzen gegen die Genmanipulation wirksam wären. Hierbei wurde das doublesex-Gen mit CRISPR-Technologie verändert.

Ein CRISPR–Cas9 gene drive Konstrukt bewirkte vollkommene Sterilität von *A. gambiae*-Mücken (Kyrou et al., 2018). Nach sieben bis elf Generationen erreichte das gene drive eine Prävalenz von 100% in Populationen, die in Käfigen gehalten wurden. Das führte schließlich zum Erlöschen der Populationen.

Peterson und Rolston (2022) führten eine Risikoanalyse von gene drive Experimenten an *A. gambiae* im Rahmen von Freilandexperimenten durch. Diese Autor*innen fassten mögliche primäre Effekte auf das Ökosystem wie folgt zusammen: 1) Toxische Effekte eines genveränderten Proteins auf Larven von *A. gambiae*, 2) toxische Effekte des Proteins auf andere Organsimen, 3) die Population von *A. gambiae* nimmt ab, 4) Populationen anderer Organsimen nehmen ab aufgrund von Toxizität des Stressoren. Mögliche sekundäre Effekte sind 1) der Rückgang der Larvenpopulation von *A. gambiae* führt zu Algenblüten, 2) Die Masse toter Larven von *A. gambiae* führt zu einer Verschlechterung der Gewässergüte, 3) Larven von *A. gambiae* werden durch andere Arten ersetzt, 4) die Abnahme der Larvenpopulation führt zu einer Abnahme der Populationen von Prädatoren, 5) die Räuber-Beute-Beziehungen werden nachteilig gestört, 6) die Abnahme der Larvenpopulation führt zu einer Zunahme von Detritus und von Detritivoren, 7) die Abnahme der Larvenpopulation führt zu einer Abnahme von Detritus und von Detritivoren.

Smidler et al. (2022) führten Genmanipulationen mit CRISPR/Cas an Mücken von *A. gambiae* durch. Hierbei war das target das mit CRISPR veränderte doublesex-Gen. Es konnte mit einem Modell gezeigt werden, dass die iterative Freisetzung genmanipulierter steriler Männchen zu einem nachhaltigen Rückgang der gesamten Population führt.

Connolly et al. (2021) führten eine Analyse möglicher nachteiliger Auswirkungen der Freisetzung gentechnisch veränderter Mücken von *A. gambiae* durch. Mögliche negative Effekte sind

demzufolge: 1) Potenzielle Allergene oder Toxine führen zu einer Abnahme der Räuberpopulation. 2) Potenziell gesteigerte Fitness führt zu einem Rückgang der Population konkurrierender Arten. 3) Ein potenziell erhöhter horizontaler Genfluss erhöht die Dichten von Krankheitserregern auf andere Arten. 4) Ein erhöhter Verzehr durch Raubtiere kann die Populationen anderer Arten verringern. 5) Ersatz für *A. gambiae* durch andere Stechmückenarten kann zu einem Rückgang der Populationen anderer verlinkter Arten führen. 6) Eine verringerte Larvenfitness und -dichte kann zu Änderungen des trophischen Zustands aquatischer Systeme und damit zu Änderungen der Artenzusammensetzung führen. 7) Die potenzielle Toxizität transgener Produkte könnte die Wasserqualität verschlechtern und die Dichte anderer Arten verringern. 8) Dadurch erfolgen auch negative Auswirkungen auf das Trinkwasser. 9) Eine potenziell breitere Toleranz gegenüber Hitze und Feuchtigkeit könnte die Populationsgröße erhöhen und Populationen von Arten verringern, die anfällig für Parasitismus oder konkurrierende Arten sind.

In einer Modellstudie wiesen Champer et al. (2022) darauf hin, dass kombinierte gentechnische Manipulationen mit CRISPR/Cas zu einem labilen Gleichgewicht zwischen dem Wildtyp und transgenen Mücken führen kann. Andere singuläre gentechnische Veränderungen erwiesen sich als effektiv, die Population zu verringern.

Sánchez et al. (2020) entwickelten ein modulares Modell zur Vorhersage der Ausbreitung eines gene drive in einer Population von *A. gambiae*. Das Modell besteht aus einem Vererbungsmodul, einem Populationsmodul und einem Landschaftsmodul, in welchem die räumliche Ausbreitung des gene drive simuliert werden kann. Das Modell MGDrive ist als lizenzfreies Paket in R implementiert.

Ergebnisse von Ellis et al. (2022) zeigen, wie sich selbst eliminierende gene drives ein sicheres Testen von nicht-autonomen Merkmalen durch lokale Populationsänderungen ermöglichen können. Es wurde der zpg-Locus mit CRISPR/Cas9 verändert. Gene drives, die zur Unterdrückung von Populationen bestimmt sind, könnten dazu dienen, nach der Erzeugung von Resistenzen später freigesetzte nicht autonome Gene zu verbreiten. Das würde eine Modifikation von Vektorpopulationen ermöglichen.

2.3.1.1 Fazit

Wirkungszusammenhänge und Expositionspfade von nGV Mücken wurden bisher nur modellhaft und hypothetisch beschrieben. Eine wichtige Rolle bei der Ausbringung von nGV Mücken spielt die Anzahl der eingesetzten Individuen und die mögliche Entwicklung von Resistenzen, welche dem gewünschten Effekt der Ausrottung entgegenwirken. Auswirkungen auf Prädatoren von Mückenlarven können durch Toxine der nGV Mücken hervorgerufen werden. Sowohl Populationen konkurrierender Arten, als auch anderer Arten des jeweiligen Ökosystems können negativ beeinflusst werden. Der Wildtyp kann aussterben, oder es entsteht ein labiles Gleichgewicht zwischen Wildtyp und nGVO.

2.3.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis wird für die Biodüngung in Agrarsystemen eingesetzt (Mahapatra et al., 2022). Diese Autor*innen fassen die Ökosystemleistungen von *Bacillus subtilis* zusammen. Durch die Ausbildung von Biofilmen und die Produktion von Lipopeptiden, Phytohormonen, Auxin und Cytokinin fördert *Bacillus subtilis* die Resilienz von Kulturpflanzen gegen pathogene Keime. Weiterhin besitzt *Bacillus subtilis* mehrere Gene, die Antibiotikaresistenzen kodieren, und es spielt eine wesentliche Rolle im Kohlenstoffkreislauf und in der Denitrifikation. *Bacillus subtilis*

vermindert den horizontalen Transfer von Resistenzgenen anderer Bakterienarten. Die Einbringung von *Bacillus subtilis* in Biofilme beeinflusst die Diversität und Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft.

In einer experimentellen Laborstudie mit genetisch veränderten Stämmen von *Bacillus subtilis*, bei denen das *yitPOM*-Operon gentechnisch verändert wurde, wurde dokumentiert, dass *Bacillus subtilis* Toxine produziert, die lethal auf andere Bakterienarten in Biofilmen wirken (Kobayashi and Ikemoto, 2019). Dadurch verschafft sich *Bacillus subtilis* Wettbewerbsvorteile gegenüber konkurrierenden Bakterienarten.

Bacillus subtilis wirkt gegen pathogene Bakterienarten durch die Produktion von Lipoproteinen (Gayathiri et al., 2022). So unterdrückten mit CRISPR/Cas9 veränderte Stämme von *Bacillus subtilis* die Virulenz von *Rhizoctonia solani* und *Fusarium culmorum* (Rato et al., 2021).

In der frühen Phase der Biofilmentwicklung findet in *Bacillus subtilis* eine koordinierte Hochregulierung von energieliefernden und Biosynthese-Prozessen statt. Nachfolgende Änderungen im Stoffwechsel werden gesteuert durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen und die Aufnahme von Eisen. Diese Änderungen basieren auf Transkriptionsprozessen (Pisithkul et al., 2019).

In einer gemischten Kultur von *Bacillus subtilis* mit *Tetrahymena thermophila* (Konsument) und der Mikroalge *Euglena gracilis* (Produzent) wirkte *T. thermophila* durch Abweiden reduzierend auf die Dichten von *Bacillus subtilis*. Dieser Effekt wurde durch die Gegenwart von *E. gracilis* abgeschwächt (Matsui et al., 2003).

Gentechnisch veränderte Stämme von *Bacillus subtilis* weisen gegenüber Wildtypen einige Defizite auf, wie Earl et al. (2008) in einem Review-Artikel dokumentieren. Dazu gehören das Ausbleiben von Schwärmen (gemeinschaftliche Bewegung von Bakterien zur Ausbreitung) und die mangelnde Fähigkeit, komplexe Biofilme auszubilden. Gentechnisch veränderte Stämme produzieren einen sehr viel höheren Anteil von Zellen im Zustand genetischer Kompetenz als Wildstämme.

2.3.2.1 Fazit

Bacillus subtilis lebt vorwiegend in Biofilmen und ist nur unter bestimmten Umweltbedingungen motil. Es besitzt mehrere Gene, die Antibiotikaresistenzen kodieren, und es spielt eine wesentliche Rolle im Kohlenstoffkreislauf und in der Denitrifikation. *Bacillus subtilis* vermindert den horizontalen Transfer von Resistenzgenen anderer Bakterienarten und produziert allelopathische Substanzen. Gentechnisch veränderte Bakterien dieser Art sind in der Motilität und in der Ausbildung von Biofilmen mit anderen Bakterien eingeschränkt.

2.3.3 *Chlamydomonas reinhardtii*

In einem Review geben Calatrava et al. (2023) eine Übersicht über die ökologischen Funktionen von der Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii*: *Chlamydomonas reinhardtii* ist Beute für eine Vielzahl verschiedener Mikroben, darunter Protisten wie *Paramecium bursaria*, *Tetrahymena vorax* und *Peranema* sowie Bodenbakterien wie *Streptomyces iranensis* und *Pseudomonas protegens*. Das Bakterium *P. protegens* produziert ein Arsenal an Anti-Algen-Verbindungen, Sekundärmetaboliten wie Orfamid A und Protegencin, die morphologische Veränderungen hervorrufen, das Wachstum hemmen und *Chlamydomonas* abtöten können. *S. iranensis* produziert die algizide Verbindung Orfamid A in Gegenwart von *Chlamydomonas*, die durch den flechtenartigen Pilz *Aspergillus nidulans* physikalisch vor dem Algizid geschützt werden

kann. *Chlamydomonas* etabliert unter bestimmten Bedingungen spontane obligate Symbiosen mit Pilzarten. In geschlossenen Systemen unter Beleuchtung mit Glukose und Nitrit verstoffwechselt *Saccharomyces cerevisiae* Glukose, um *Chlamydomonas* mit CO₂ zu ernähren, dass die Hefe mit aus Nitrit produziertem Ammonium versorgt. Der Schlauchpilz *Alternaria infectoria* fixiert Stickstoff, der *Chlamydomonas* in Form von organischem Stickstoff zugeführt werden kann, und beide Arten können langlebige Konsortien bilden. Die Rhizosphärenbakterien *Mesorhizobium japonicum* und *Ensifer meliloti* können *Chlamydomonas* mit Vitamin B12 versorgen, das das Algenwachstum im Austausch gegen Algen-fixiertes C fördert. Stickstoff-mineralisierende Bakterien wie *Methylobacterium spp.* können Aminosäuren und Peptide abbauen, um *Chlamydomonas* mit Ammonium im Austausch gegen das Photosynthese-Glycerin zu versorgen. Außerdem kann das von *Chlamydomonas* produzierte Auxin *Methylobacterium aquaticum* ernähren, was wiederum das Algenwachstum fördert. Schließlich können stickstofffixierende Bakterien wie *Azotobacter chroococcum*, *A. beljerinckii*, *A. agilis* und *A. vine-landii* das *Chlamydomonas*-Wachstum mit fixiertem Stickstoff im Austausch gegen fixierten Kohlenstoff unterstützen. Es hat sich gezeigt, dass *Chlamydomonas* den Kohlenstoffkreislauf mit einer Vielzahl von taxonomisch unterschiedlichen Bakterien, die aus dem Boden isoliert wurden, aufrechterhält. Unter Verwendung geschlossener mikrobieller Ökosysteme, in denen mikrobielle Gemeinschaften hermetisch geschlossen sind und nur mit Licht aufrechterhalten werden, kann *Chlamydomonas* die Bakteriengemeinschaft mit festen Kohlenstoffverbindungen ernähren, welche wiederum Kohlendioxid produziert, um die Algen zu ernähren. Das führt zur Selbstorganisation der Konsortien. *Chlamydomonas* kann die bakterielle Invasion von *T. thermophila*-Kulturen verhindern, indem es die Aggregation in *E. coli* hemmt – ein Abwehrmechanismus zur Vermeidung von Prädation – und somit die Bakterienpopulation kontrolliert, indem der Prädationsdruck auf *E. coli* durch die Ciliaten erhöht wird. Darüber hinaus ernährt *Chlamydomonas* als Primärproduzent nicht nur andere Organismen, indem es fixierten Kohlenstoff sezerniert, sondern auch als Nahrung dient, wenn es lysiert oder von Prädatoren aufgenommen wird. *Chlamydomonas* ist Beute für eine Vielzahl verschiedener Organismen, darunter Rädertierchen wie *Brachionus calyciflorus*, Krebstiere wie *Daphnia*, Protisten wie *Tetrahymena vorax* und *Peranema* sowie Bodenbakterien wie *Streptomyces iranensis* und *Pseudomonas*. Um den Fraßdruck zu vermindern, kann *Chlamydomonas* Zellaggregate von 4-16 Zellen und größere Aggregate von bis zu Tausenden von Zellen bilden. Die Bildung von kleinen Aggregaten ist das Ergebnis aufeinanderfolgender Teilungen, die durch Stress ohne Abbau der Zellwand induziert werden. Das kann durch Prädatoren wie das Rädertierchen *Brachionus calyciflorus* und den Ciliaten *Paramecium tetraurelia* induziert werden. Kairomone, die von *Daphnia* und *Daphnia*-fressenden Fischen produziert werden, können das Verhalten von *Chlamydomonas* ebenfalls verändern, indem sie Phototaxis induzieren. Es wurde festgestellt, dass *Chlamydomonas*-Zellen physikalisch mit den Fadenpilzen *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* interagieren, um den Nährstoffaustausch zu erleichtern. Darüber hinaus können *Chlamydomonas* und der Schlauchpilz *Alternaria infectoria* langlebige Konsortien bilden, die in Abwesenheit einer anderen Stickstoffquelle als atmosphärischem Stickstoff, der vom Pilz fixiert und wahrscheinlich als Aminosäuren an die Alge geliefert wird, bis zu mehreren Jahren bestehen bleiben. Vitamin B12 (Cobalamin) ist ein Enzym-Cofaktor, der nur von Prokaryoten synthetisiert wird, aber mehr als die Hälfte der Mikroalgen benötigt es für das Wachstum. Daher kann dieser Co-Faktor als gemeinsame bakterielle Währung für die Symbiose mit Algen im Austausch gegen Algen-fixierten Kohlenstoff dienen und eine Schlüsselrolle in der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur und -funktion spielen. Nichtsdestotrotz gehen nicht alle B12-produzierenden Bakterien und Algen B12-auxotrophe wechselseitige Beziehungen ein,

was auf eine Artspezifität hindeutet, die auf die freigesetzte B12-Menge oder den von der Alge sekretierten Kohlenstofftyp zurückzuführen sein kann.

Krespach et al. (2020) beschrieben die Wechselwirkungen in einem flechtenartigen Konsortium von *C. reinhardtii* mit dem Pilz *Aspergillus nidulans* und dem algiziden Bakterium *Streptomyces iranensis*. Der Pilz schützte *C. reinhardtii* vor der toxischen Wirkung des bakteriellen Toxins.

Lucker et al. (2022) wiesen auf die Schwierigkeiten hin, gentechnisch veränderte Stämme von *C. reinhardtii* im Labor und im Freiland zu kultivieren. In dieser Studie zielten klassische gentechnische Veränderungen auf die Erhöhung von Photosyntheseraten. Gentechnisch erhöhte Photosyntheseraten resultieren häufig in reduzierter Fitness durch die Bildung von toxischem reaktivem Sauerstoff, wenn die Photosynthese nicht wie herkömmlich reguliert wird.

Tran et al. (2020) fassen die Schwierigkeiten gentechnischer Veränderungen von *C. reinhardtii* wie folgt zusammen: Es bestehen Probleme durch die ungewöhnlich strenge Codon-Nutzung, geringe Transgenexpression und Gen-Silencing, variable Genexpression aufgrund von Positionseffekten und durch das Fehlen von geeigneten molekularen Werkzeugen.

2.3.3.1 Fazit

C. reinhardtii geht verschiedene symbiontische Beziehungen mit einigen Pilzarten ein. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei der Transfer von Vitaminen zur Mikroalge. Einige Bakterienarten produzieren Substanzen, die auf die Mikroalge allelopathisch wirken. Die Ausbildung von Zellaggregaten wird teilweise durch das Fressverhalten von Prädatoren gesteuert. Gentechnische Veränderungen von *C. reinhardtii* sind eingeschränkt durch genomspezifische Charakteristika der Mikroalge.

2.3.4 *Oncorhynchus mykiss*

Haddadi et al. (2018) untersuchten die Auswirkungen von *Oncorhynchus mykiss* auf die benthische Lebensgemeinschaft in der Umgebung von Käfigen mit Regenbogenforellen in der Kaspischen See. Die größte Diversität wurde direkt unterhalb der Käfige gefunden. Dadurch wird ein signifikanter Effekt von *O. mykiss* als Neobiota auf ein benthisches Ökosystem nachgezeichnet. Auf die Diversität anderer Fischarten hatte *O. mykiss* hingegen einen negativen Effekt (Imamura et al., 2020).

Johnson et al. (2021) untersuchten die genetische Zusammensetzung von Fischpopulationen in mehreren nordamerikanischen Flüssen, in denen sowohl Wildtypen, als auch genetisch veränderte Stämme von *O. mykiss* vorkamen. Genetisch veränderte Stämme wurden teilweise regelmäßig als Besatz ausgebracht. Der Besatz führte zu einer Verdrängung von Wildstämmen und zur Ausbildung eines Hybriden. Physikalische Barrieren wie Dämme erwiesen sich als hilfreich, die Ausbreitung hybrider und genetisch veränderter Fische zu verhindern. Diese Autor*innen diskutieren den regelmäßigen Besatz von Flüssen mit genetisch veränderten Fischen als kritisch für den Erhalt von Wildpopulationen.

Kannry et al. (2020) untersuchten die Variation des Genpools von *O. mykiss* in einem kalifornischen Fluss. Sie fanden eine deutliche Trennung von Winter- und Sommeraspekten, die mit strömungsabhängigen Barrieren in den Hauptgabelungen des Flusses korrelierte. Ein Damm wirkte im Sommer als trennende Barriere zweier Populationen.

Die Entfernung von Querbauwerken oder deren Modifikation ermöglicht den Zugang von Populationen von *O. mykiss* zu stromaufwärts gerichteten Bereichen. Dadurch erfolgt eine

Ausbreitung dieser Art, ein Anstieg ihrer Abundanzen und ein Gentransfer zwischen zuvor isolierten Populationen (Knoth et al., 2022).

Okoli et al. (2022) diskutieren die Risiken, die mit einem Entkommen von gentechnisch veränderten Fischen aus Aquakulturen einhergehen. Solche Risiken bestehen a) durch Veränderungen der Populationsgenetik eng verwandter Arten in der Umgebung durch Paarung und Veränderung der genetischen Biodiversität und b) durch Störung des ökologischen Gleichgewichts durch Veränderung des Nahrungsnetzes und Zerstörung von Lebensräumen.

Rossi et al. (2022) untersuchten Populationen von *O. mykiss* in zwei Flüssen im saisonalen Verlauf. Diese Autor*innen nehmen an, dass das hydrologische Regime in Zusammenhang mit der Verfügbarkeit von Nahrungsressourcen und dem saisonalem Mortalitätsrisiko zu einer Diversifikation von Größe, Alter und Auswanderung von *O. mykiss* führten.

Sundaray et al. (2022) diskutieren neue gentechnische Methoden als Biokontrolle von invasiven Fischarten. Sie bewerten gentechnische Veränderungen positiver als herkömmliche Methoden wie Abfischen, physikalische Barrieren, Austrocknen von Gewässern sowie den Einsatz von Parasiten, Prädatoren und Pathogenen.

2.3.4.1 Fazit

O. mykiss lebt in Flüssen und weist ein saisonales Migrationsverhalten auf, das durch Querbauwerke wirksam eingeschränkt werden kann. *O. mykiss* ist in europäischen Flüssen ein Neobiota und kann negative Effekte auf die benthische Artengemeinschaft haben. Gentechnisch veränderte Stämme verdrängen den Wildtyp und bilden mit ihm Hybride. Die Fischart steht in Abwesenheit von Prädatoren wie Fischottern und von Angler*innen an der Spitze der Nahrungskette.

2.4 Modelle kausaler populationsgenetischer und ökologischer Zusammenhänge

Im folgenden Text werden für jede Beispielart je ein Modell zur Darstellung kausaler Zusammenhänge und zur Simulation von Populationsentwicklungen dargestellt. Es war notwendig, für jede Beispielart ein solches deterministisches Modell herzuleiten, da die Beispielarten in der Nahrungskette unterschiedliche Positionen einnehmen. So stehen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Bacillus subtilis* an der Basis der jeweiligen Nahrungsketten, *Anopheles gambiae* nimmt eine intermediäre Stellung ein, und *Oncorhynchus mykiss* steht an der Spitze der natürlichen Nahrungskette (Mensch ausgenommen).

Die Modelle sind deterministisch und bestehen aus gewöhnlichen Differentialgleichungen, die in einem ersten Schritt über Wortmodelle hergeleitet wurden. Die Wortmodelle stellen jeweils eine Auflistung von Je-desto-Beziehungen dar, die positiv oder negativ sein können. Das wird jeweils durch ein Plus- oder Minuszeichen am Ende der Beziehung angegeben.

Aufbauend auf den Wortmodellen wurde für jede Beispielart ein Wirkungsgraph erstellt. Hierin sind positive und negative Wirkungsbeziehungen farblich unterschiedlich markiert, und Zustandsgrößen, Flussgrößen und Parameter erfahren unterschiedliche Darstellungen. Die Wirkungsgraphen dienen der Veranschaulichung der kausalen Zusammenhänge.

Basierend auf den Wortmodellen wurden in einem weiteren Schritt mathematische Modelle aus gewöhnlichen Differentialgleichungen hergeleitet. In diesen mathematischen Modellen wird in jeder Gleichung die zeitliche Änderung einer Zustandsgröße ausgedrückt. Hierbei kommen kinetische Ratenkonstanten zum Tragen, welche die Geschwindigkeit der zeitlichen

Änderungen angeben. Die kinetischen Ratenkonstanten sind mit k_1 , k_2 , k_i , etc. konnotiert. Zusammen mit den Zustandsgrößen wie z. B. $W(t)$, $P(t)$, $nGVO(t)$, $B(t)$ und $K(t)$ zum Zeitpunkt t bilden sie multiplikatorisch Flussgrößen ab, die sich in jeder Differentialgleichung als Summanden aufaddieren.

In einem weiteren Schritt wurden die mathematischen Modelle in einer Software (Dynasys 2.02, Hupfeld Software) numerisch mit dem numerischen Verfahren Runge-Kutta implementiert, das dazu dient, numerische Differentialgleichungsmodelle zu erstellen.

Für die Parametrisierung der Modelle wurden generische Definitionen verwendet, d.h. die Größen der Parameter wurden so gewählt, dass die Simulationen der Modelle realistische Entwicklungen der Populationen darstellen. Eine Kalibrierung und Validierung der Modelle war aufgrund des Fehlens geeigneter unabhängiger Datensätze nicht möglich. Daher sind Sensitivitätsanalysen und Szenarienanalysen notwendig, welche a) die Unsicherheiten der Modelle quantifizieren und b) mögliche unterschiedliche Entwicklungen der Zustandsgrößen in Abhängigkeit von der Parametrisierung aufzeigen. Die Ergebnisse der Sensitivitäts- und Szenarienanalysen werden in einem späteren Bericht dargestellt werden.

Die Modelle unterliegen Vereinfachungen. So erfolgte eine Reduktion auf funktionale Gruppen als Zustandsgrößen, d. h. es wurde im Nahrungsnetz nicht jede Art einzeln erfasst. Hinter den Zustandsgrößen Beute, Konkurrenzart und Prädator verbergen sich jedoch bestimmte Arten oder Artengruppen wie z. B. Algenaufwuchs als Beute für Mückenlarven, *Anopheles coluzzii* als Konkurrenzart für *Anopheles gambiae* und Riesenwasserwanzen oder Vögel als Prädatoren für adulte Mücken und Mückenlarven.

Darüber hinaus können die Modelle keine räumlichen Änderungen darstellen, da sie nicht an räumliche Rechengitter oder Geographische Informationssysteme gekoppelt sind. Der Vorteil von Modellen aus gewöhnlichen Differentialgleichungen ist jedoch ihre Einfachheit und ihre Strukturgültigkeit. Durch letzteres unterscheiden sie sich von datenbasierten Modellen wie künstlichen neuronalen Netzen. Weiterhin sind bei den Differentialgleichungsmodellen im Gegensatz zu datenbasierten Modellen durch Änderungen der Parametrisierungen Szenarienanalysen möglich.

2.4.1 Wortmodelle und Wirkungsgraphen

Im folgenden Text werden für jeden nGVO je ein Wortmodell und ein darauf basierender Wirkungsgraph wiedergegeben (Abb. 6, Abb. 7, Abb. 8, Abb. 9). Plus- und Minuszeichen hinter den Wirkungsbeziehungen der Wortmodelle geben positive bzw. negative Kopplungen an. Die folgende Tabelle fasst als Glossar zusammen, was unter den in den Wortmodellen verwendeten Größen zu verstehen ist (Tab. 4).

Tab. 4: Erläuterungen der in den Wortmodellen verwendeten Begriffe.

Begriff	Größe	Einheit	Beschreibung
Fraß nGVO	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Fraß von nGVO durch einen Prädator. Der Fraß führt zur Vermehrung des Prädators.
Fraß Wildtyp	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Fraß von Wildtyp durch einen Prädator. Der Fraß führt zur Vermehrung des Prädators.

Begriff	Größe	Einheit	Beschreibung
Fraß Beute	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Fraß von Beute durch einen Prädator oder einen nGVO, einen Wildtyp, eine Konkurrenzart. Der Fraß führt zur Vermehrung des Prädatoren, des nGVO, des Wildtyps, der Konkurrenzart.
Fraß Konkurrenzart	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Fraß einer Konkurrenzart durch einen Prädator. Der Fraß führt zur Vermehrung des Prädatoren.
Vermehrungsrate Beute	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Bruttovermehrungsrate der Beute
Vermehrungsrate nGVO	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Bruttovermehrungsrate des nGVO
Vermehrungsrate Wildtyp	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Bruttovermehrungsrate des Wildtyps
Vermehrungsrate Konkurrenzart	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Bruttovermehrungsrate der Konkurrenzart
Gentransfer	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Gentransfer vom nGVO zum Wildtyp. Der Gentransfer führt zu einer Zunahme des nGVO und zu einer Abnahme des Wildtyps
Sterberate Prädator	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Sterberate des Prädatoren als Verlustfunktion
Abwanderung nGVO	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Abwanderungsrate als Verlustfunktion des nGVO
Abwanderung Wildtyp	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Abwanderungsrate als Verlustfunktion des Wildtyps
Abwanderung Konkurrenzart	Flussgröße	[Änderung Zustandsgröße pro Zeiteinheit]	Abwanderungsrate als Verlustfunktion der Konkurrenzart
nGVO	Zustandsgröße	[Anzahl der Individuen]	Gentechnisch veränderte Beispiellarten
Wildtyp	Zustandsgröße	[Anzahl der Individuen]	Wildtyp der Beispiellarten
Beute	Zustandsgröße	[Anzahl der Individuen]	z. B. Algenaufwuchs bei Mückenlarven; Köcherfliegenlarven bei Fischen (Forellenarten)
Konkurrenzart	Zustandsgröße	[Anzahl der Individuen]	z. B. <i>Anopheles coluzzii</i> bei <i>Anopheles gambiae</i> ; andere Bakterienarten im Biofilm bei <i>Bacillus subtilis</i> ; andere planktonische Algenarten bei <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; Bachforelle bei <i>Oncorhynchus mykiss</i> .

Begriff	Größe	Einheit	Beschreibung
Prädatoren	Zustandsgröße	[Anzahl der Individuen]	z. B. Vogelarten oder Riesenwasserwanzen bei Mücken; benthische Organismen wie Wasserschnecken bei Bakterien; Zooplanktonarten bei Algen.
Ökologische Kapazität	Parameter	[Anzahl der Individuen]	Ein Parameter, der die Menge verfügbarer Ressourcen widerspiegelt, welche das Wachstum von Arten an der Basis der jeweiligen Nahrungskette begrenzen; führt zu einem logistischen Wachstum.

2.4.1.1 *Anopheles gambiae*

Für das folgende Wortmodell wird eine neuartige gentechnische Veränderung an *Anopheles gambiae* angenommen, welche zur Verringerung der Fitness z. B. durch eine eingeschränkte Flugfähigkeit führt. In dem Wortmodell sind Auskreuzungen zwischen dem nGVO und dem in freier Natur vorkommenden Wildtyp sowie mögliche Abwanderungen von nGVO, Wildtyp und Konkurrenzart berücksichtigt. Die unterschiedliche Fitness von nGVO, Wildtyp und Konkurrenzart wird im mathematischen und numerischen Modell durch einen Fitnessparameter charakterisiert, der Werte von 0 bis 1 annehmen kann.

- Je mehr Prädatoren, desto mehr Fraß Wildtyp (+)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Fraß Wildtyp (+)
- Je mehr Fraß Wildtyp, desto weniger Wildtyp (-)
- Je mehr Fraß Wildtyp, desto mehr Prädatoren (+)
- Je mehr Prädatoren, desto mehr Fraß GVO (+)
- Je mehr nGVO, desto mehr Fraß nGVO (+)
- Je mehr Fraß nGVO, desto weniger nGVO (-)
- Je mehr Fraß nGVO, desto weniger Prädatoren (+)
- Je höher Fitness Wildtyp, desto weniger Fraß Wildtyp (-)
- Je höher Fitness Wildtyp, desto höher Vermehrungsrate Wildtyp (+)
- Je höher Fitness nGVO, desto weniger Fraß nGVO (-)
- Je höher Fitness nGVO, desto höher Vermehrungsrate nGVO (+)
- Je mehr nGVO, desto mehr Fraß Beute (+)
- Je mehr Fraß Beute, desto weniger Beute (-)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Fraß Beute (+)
- Je mehr Fraß Beute, desto höher Vermehrungsrate Wildtyp (+)
- Je mehr Fraß Beute, desto höher Vermehrungsrate nGVO (+)
- Je höher Fitness Konkurrenzart, desto weniger Fraß Konkurrenzart (-)
- Je höher Fitness Konkurrenzart, desto höher Vermehrungsrate Konkurrenzart (+)
- Je mehr Prädatoren, desto mehr Fraß Konkurrenzart (+)
- Je mehr Konkurrenzart, desto mehr Fraß Konkurrenzart (+)

- Je mehr Fraß Konkurrenzart, desto weniger Konkurrenzart (-)
- Je mehr Fraß Konkurrenzart, desto mehr Prädatoren (+)
- Je mehr Konkurrenzart, desto mehr Fraß Beute (+)
- Je mehr Fraß Beute, desto höher Vermehrungsrate Konkurrenzart (+)
- Das Wachstum der Beute wird durch eine ökologische Kapazität begrenzt.
- Je mehr nGVO, desto mehr Gentransfer (+)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Gentransfer (+)
- Je mehr Gentransfer, desto mehr nGVO (+)
- Je mehr Gentransfer, desto weniger Wildtyp (-)
- Je mehr nGVO, desto mehr Abwanderung nGVO (+)
- Je mehr Abwanderung nGVO, desto weniger nGVO (-)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Abwanderung Wildtyp (+)
- Je mehr Abwanderung Wildtyp, desto weniger Wildtyp (-)
- Je mehr Konkurrenzart, desto mehr Abwanderung Konkurrenzart (+)
- Je mehr Abwanderung Konkurrenzart, desto weniger Konkurrenzart (-)

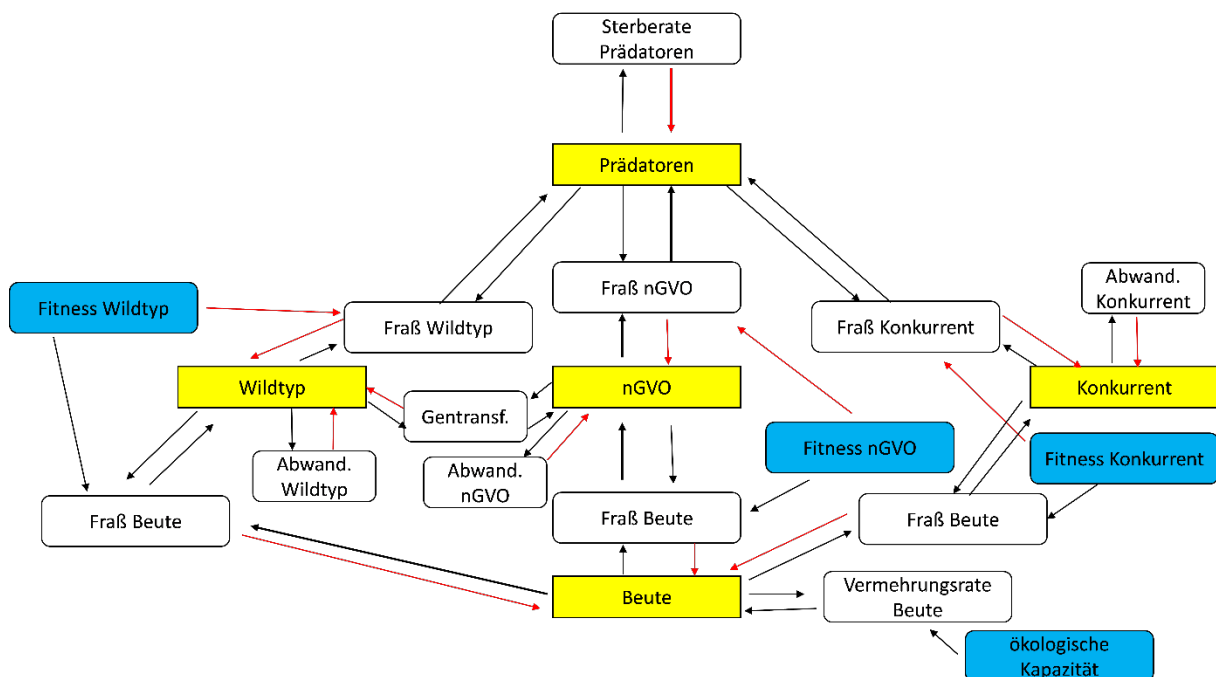


Abb. 6: Wirkungsgraph des Modells von *Anopheles gambiae*. Gelbe Felder sind Zustandsgrößen, weiße Felder sind Flussgrößen, blaue Felder sind Parameter. Schwarze Pfeile zeigen positive Wirkungen an. Rote Pfeile zeigen negative Wirkungen an.

2.4.1.2 *Bacillus subtilis*

Im Wortmodell wird von einer neuen gentechnischen Veränderung an *Bacillus subtilis* ausgegangen, welche durch Steigerung der Fitness zu einer erhöhten Konkurrenzkraft und somit zu einer Steigerung der Vermehrungsrate des nGVO führt. Das Wachstum des nGVO, des Wildtyps und der Konkurrenzart wird jeweils durch eine ökologische Kapazität begrenzt. Ab- und Zuwanderung sind im Modell nicht berücksichtigt, da die betrachteten Bakterienarten sessil in Biofilmen leben.

- Je mehr Wildtyp, desto höher Vermehrungsrate Wildtyp (+)
- Je höher Vermehrungsrate Wildtyp, desto mehr Wildtyp (+)
- Je mehr nGVO, desto höher Vermehrungsrate nGVO (+)
- Je höher Vermehrungsrate nGVO, desto mehr nGVO (+)
- Je mehr Prädatoren, desto höher Fraß Wildtyp (+)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Fraß Wildtyp (+)
- Je mehr Fraß Wildtyp, desto weniger Wildtyp (-)
- Je mehr Fraß Wildtyp, desto mehr Prädatoren (+)
- Je mehr Prädatoren, desto mehr Fraß nGVO (+)
- Je mehr nGVO, desto mehr Fraß nGVO (+)
- Je mehr Fraß nGVO, desto weniger nGVO (-)
- Je mehr Fraß nGVO, desto mehr Prädatoren (+)
- Das Wachstum vom Wildtyp ist durch eine ökologische Kapazität begrenzt.
- Das Wachstum von nGVO ist durch eine ökologische Kapazität begrenzt.
- Je höher Fitness Wildtyp, desto weniger Fraß Wildtyp (-)
- Je höher Fitness Wildtyp, desto höher Vermehrungsrate Wildtyp (+)
- Je höher Fitness nGVO, desto weniger Fraß nGVO (-)
- Je höher Fitness nGVO, desto höher Vermehrungsrate nGVO (+)
- Je mehr Konkurrenzart, desto höher Vermehrungsrate Konkurrenzart (+)
- Je höher Vermehrungsrate Konkurrenzart, desto mehr Konkurrenzart (+)
- Das Wachstum der Konkurrenzart ist durch eine ökologische Kapazität begrenzt.
- Je mehr Prädatoren, desto mehr Fraß Konkurrenzart (+)
- Je mehr Konkurrenzart, desto mehr Fraß Konkurrenzart (+)
- Je mehr Fraß Konkurrenzart, desto weniger Konkurrenzart (-)
- Je mehr Fraß Konkurrenzart, desto mehr Prädatoren (+)
- Je höher Fitness Konkurrenzart, desto weniger Fraß Konkurrenzart (-)
- Je höher Fitness Konkurrenzart, desto höher Vermehrungsrate Konkurrenzart (+)
- Je mehr Wildtyp, desto geringer Fitness Konkurrenzart (-)

- Je mehr nGVO, desto geringer Fitness Konkurrenzart (-)
- Je mehr nGVO, desto mehr Gentransfer (+)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Gentransfer (+)
- Je mehr Gentransfer, desto mehr nGVO (+)
- Je mehr Gentransfer, desto weniger Wildtyp (-)

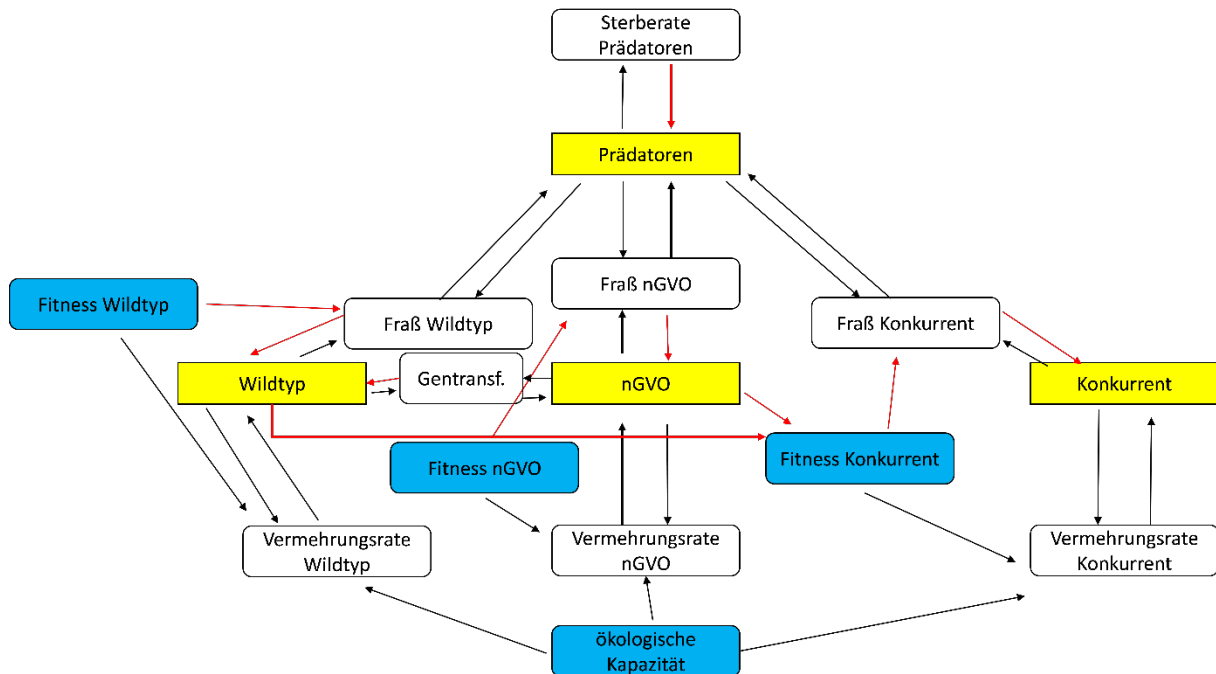


Abb. 7: Wirkungsgraph des Modells von *Bacillus subtilis*. Gelbe Felder sind Zustandsgrößen, weiße Felder sind Flussgrößen, blaue Felder sind Parameter. Schwarze Pfeile zeigen positive Wirkungen an. Rote Pfeile zeigen negative Wirkungen an.

2.4.1.3 *Chlamydomonas reinhardtii*

Im Wortmodell wird von einer neuen gentechnischen Veränderung an *Chlamydomonas reinhardtii* ausgegangen, welche durch Steigerung der Photosyntheseeffizienz zu einer Erhöhung der Fitness und somit zu einer Steigerung der Vermehrungsrate des nGVO führt. Das Wachstum des nGVO, des Wildtyps und der Konkurrenzart wird jeweils durch eine ökologische Kapazität begrenzt. Ab- und Zuwanderung sind im Modell nicht berücksichtigt, da die betrachteten Algenarten planktonisch leben.

- Je mehr Wildtyp, desto höher Vermehrungsrate Wildtyp (+)
- Je höher Vermehrungsrate Wildtyp, desto mehr Wildtyp (+)
- Je mehr nGVO, desto höher Vermehrungsrate nGVO (+)
- Je höher Vermehrungsrate nGVO, desto mehr nGVO (+)
- Je mehr Prädatoren, desto mehr Fraß Wildtyp (+)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Fraß Wildtyp (+)
- Je mehr Fraß Wildtyp, desto weniger Wildtyp (-)

- Je mehr Fraß Wildtyp, desto mehr Prädatoren (+)
- Je mehr Prädatoren, desto mehr Fraß nGVO (+)
- Je mehr nGVO, desto mehr Fraß nGVO (+)
- Je mehr Fraß nGVO, desto weniger nGVO (-)
- Je mehr Fraß nGVO, desto mehr Prädatoren (+)
- Das Wachstum vom Wildtyp ist durch eine ökologische Kapazität begrenzt.
- Das Wachstum von nGVO ist durch eine ökologische Kapazität begrenzt.
- Je höher Fitness Wildtyp, desto geringer Fraß Wildtyp (-)
- Je höher Fitness Wildtyp, desto höher Vermehrungsrate Wildtyp (+)
- Je höher Fitness nGVO, desto geringer Fraß nGVO (-)
- Je höher Fitness nGVO, desto höher Vermehrungsrate nGVO (+)
- Je mehr Konkurrenzart, desto höher Vermehrungsrate Konkurrenzart (+)
- Je höher Vermehrungsrate Konkurrenzart, desto mehr Konkurrenzart (+)
- Je höher Fitness Konkurrenzart, desto geringer Fraß Konkurrenzart (-)
- Je höher Fitness Konkurrenzart, desto höher Vermehrungsrate Konkurrenzart (+)
- Das Wachstum der Konkurrenzart ist durch eine ökologische Kapazität begrenzt.
- Je mehr Prädatoren, desto mehr Fraß Konkurrenzart (+)
- Je mehr Konkurrenzart, desto mehr Fraß Konkurrenzart (+)
- Je mehr Fraß Konkurrenzart, desto weniger Konkurrenzart (-)
- Je mehr Fraß Konkurrenzart, desto mehr Prädatoren (+)
- Je mehr nGVO, desto mehr Gentransfer (+)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Gentransfer (+)
- Je mehr Gentransfer, desto mehr nGVO (+)
- Je mehr Gentransfer, desto weniger Wildtyp (-)

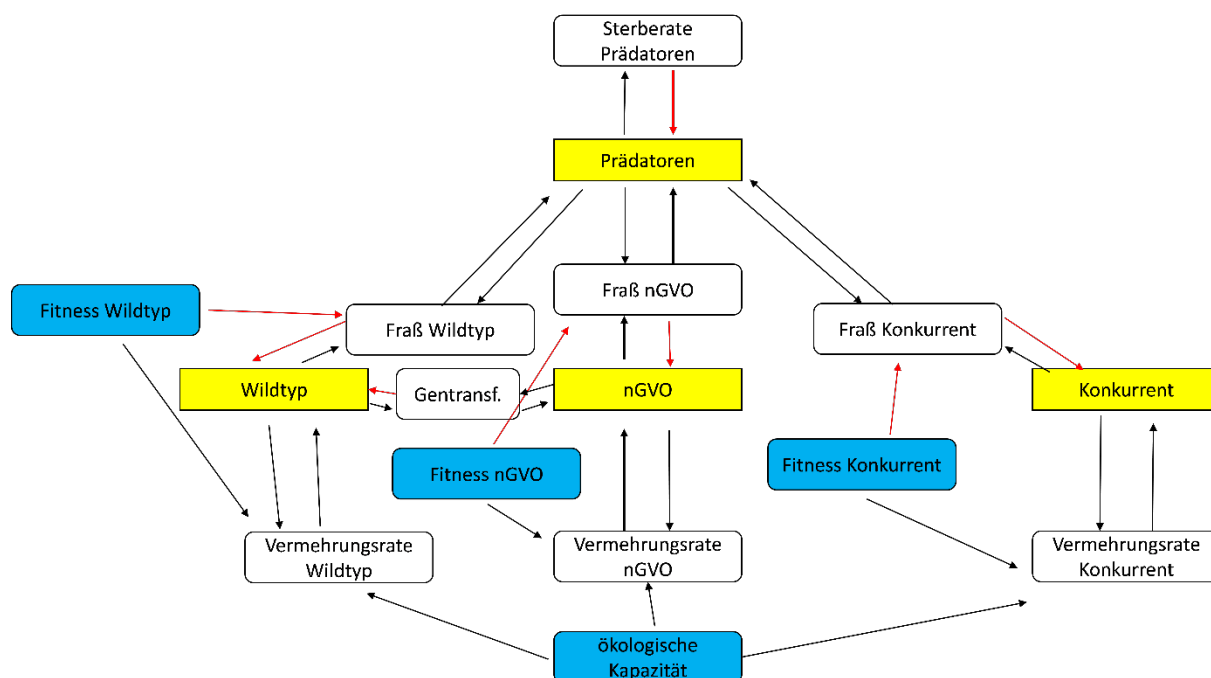


Abb. 8: Wirkungsgraph des Modells von *Chlamydomonas reinhardtii*. Gelbe Felder sind Zustandsgrößen, weiße Felder sind Flussgrößen, blaue Felder sind Parameter. Schwarze Pfeile zeigen positive Wirkungen an. Rote Pfeile zeigen negative Wirkungen an.

2.4.1.4 *Oncorhynchus mykiss*

Im Wortmodell wird von einer neuen gentechnischen Veränderung an *Oncorhynchus mykiss* ausgegangen, welche durch Steigerung der Muskelmasse zu einer Erhöhung der Fitness und somit zu einer erhöhten Konkurrenzkraft und einer Steigerung der Vermehrungsrate des nGVO führt. Im Wortmodell wird zwar der Begriff „Angler“ verwendet, jedoch ist im mathematischen und im numerischen Modell die Entnahme von Fischen durch Angeln nur als einfache Verlustrate implementiert, d. h. der nGVO, der Wildtyp und die Konkurrenzart sind im Modell Topprädatoren.

- Je mehr Angler, desto höher Entnahme Wildtyp (+)
- Je mehr Wildtyp, desto höher Entnahme Wildtyp (+)
- Je höher Entnahme Wildtyp, desto weniger Wildtyp (-)
- Je mehr Angler, desto höher Entnahme nGVO (+)
- Je mehr nGVO, desto höher Entnahme nGVO (+)
- Je höher Entnahme nGVO, desto weniger nGVO (-)
- Je höher Fitness Wildtyp, desto höher Vermehrungsrate Wildtyp (+)
- Je höher Fitness nGVO, desto höher Vermehrungsrate nGVO (+)
- Je mehr nGVO, desto mehr Fraß Beute (+)
- Je mehr Beute, desto mehr Fraß Beute (+)
- Je mehr Fraß Beute, desto weniger Beute (-)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Fraß Beute (+)

- Je mehr Fraß Beute, desto höher Vermehrungsrate Wildtyp (+)
- Je mehr Fraß Beute, desto höher Vermehrungsrate nGVO (+)
- Je höher Fitness Konkurrenzart, desto höher Vermehrungsrate Konkurrenzart (+)
- Je mehr Angler, desto höher Entnahme Konkurrenzart (+)
- Je mehr Konkurrenzart, desto höher Entnahme Konkurrenzart (+)
- Je höher Entnahme Konkurrenzart, desto weniger Konkurrenzart (-)
- Je mehr Konkurrenzart, desto mehr Fraß Beute (+)
- Je mehr Fraß Beute, desto höher Vermehrungsrate Konkurrenzart (+)
- Das Wachstum der Beute ist durch eine ökologische Kapazität begrenzt.
- Je mehr nGVO, desto mehr Gentransfer (+)
- Je mehr Wildtyp, desto mehr Gentransfer (+)
- Je mehr Gentransfer, desto mehr nGVO (+)
- Je mehr Gentransfer, desto weniger Wildtyp (-)

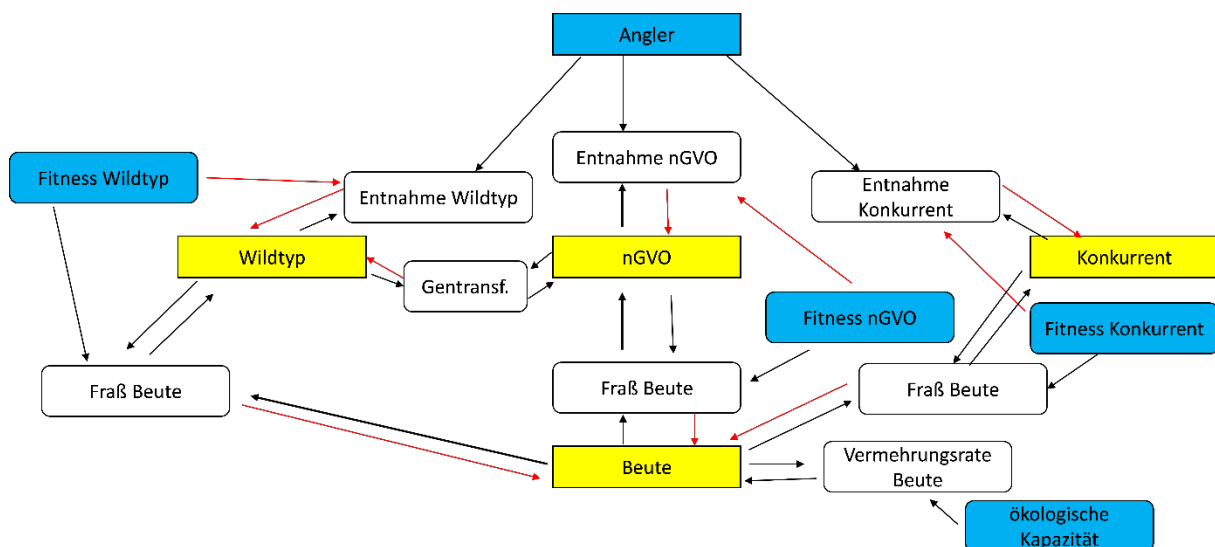


Abb. 9: Wirkungsgraph des Modells von *Oncorhynchus mykiss*. Gelbe Felder sind Zustandsgrößen, weiße Felder sind Flussgrößen, blaue Felder sind Parameter. Schwarze Pfeile zeigen positive Wirkungen an. Rote Pfeile zeigen negative Wirkungen an.

2.4.2 Differentialgleichungsmodelle

In den mathematischen Modellen wird in jeder Gleichung die zeitliche Änderung einer Zustandsgröße ausgedrückt. Hierbei kommen kinetische Ratenkonstanten zum Tragen, welche die Geschwindigkeit der zeitlichen Änderungen in d^{-1} für je einen Prozess angeben. Die kinetischen Ratenkonstanten sind mit k_1 , k_2 , k_i , etc. konnotiert. Kinetische Ratenkonstanten stellen zusammen mit den Fitnessparametern und den ökologischen Kapazitäten Parameter dar, die eingangs der Simulationen einen konstanten Wert zugewiesen erhalten. Zusammen mit den Zustandsgrößen wie $W(t)$, $P(t)$, $nGVO(t)$, $B(t)$ und $K(t)$ zum Zeitpunkt t bilden sie multiplikativ Flussgrößen ab, die sich wiederum in jeder Differentialgleichung als Summanden aufaddieren.

Die anfänglichen Anzahlen der Individuen von Beute ($B(t)$), Wildtyp ($W(t)$), nGVO ($nGVO(t)$), Konkurrenzart ($K(t)$) und Prädator ($P(t)$) wurden so gewählt, dass sie jeweils zwischen Räuber und Beute ein Verhältnis von 1:10 widerspiegeln, wie es in ökologischen Nahrungspyramiden angenommen wird. Die Größen der kinetischen Ratenkonstanten für exponentielles oder logistisches Wachstum oder für exponentiellen Verlust durch Entnahme oder Abwanderung wurden so gewählt, dass sie realistische Änderungen der Flussgrößen innerhalb mehrerer Wochen oder Monate erzeugen. Die kinetischen Ratenkonstanten von Fraß waren hingegen um zwei Größenordnungen kleiner als die vorherigen genannten, da sie für Prozesse zweiter Ordnung gelten, in denen zwei Zustandsgrößen multiplikatorisch miteinander gekoppelt sind.

Die angenommenen gentechnischen Veränderungen spiegeln sich in den Definitionen von Fitnessparametern wider, die sich zwischen 0 und 1 bewegen. So ist das Ziel von Genmanipulationen an *A. gambiae* eine Eindämmung dieser Art, daher würde hierbei in einem entsprechenden Szenario der Fitnessparameter des nGVO mit einem niedrigen Wert versehen werden. Für das Referenzszenario für Mücken wurden indes die Fitnessparameter von Wildtyp, nGVO und Konkurrenzart jeweils gleich definiert, da bisher Freilandexperimente den gewünschten Erfolg einer Eindämmung von *A. gambiae* noch nicht nachweisen konnten. Das Ziel von Genmanipulationen an den anderen drei Beispielarten ist hingegen ihre Nutzung. Daher wurde den Fitnessparametern dieser nGVO in den Referenzszenarien jeweils ein hoher Wert zugewiesen.

2.4.2.1 *Anopheles gambiae*

Im Folgenden sind die gewöhnlichen Differentialgleichungen des Modells von Mücken wiedergegeben. Tab. 5 gibt die Erläuterungen für die in den gewöhnlichen Differentialgleichungen verwendeten Akronyme des Modells wieder. Weiterhin sind die Parametrisierungen bzw. Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario angegeben. Es wird im mathematischen Modell eine neue gentechnische Manipulation angenommen, welche die Flugfähigkeit einschränkt und somit die Fitness des nGVO reduziert. Dies wird im mathematischen Modell durch die Definition eines Fitnessparameters dargestellt. Eine mögliche Beute für Mückenlarven sind Algenaufwuchs oder Detritus. Eine mögliche Konkurrenzart für *A. gambiae* ist *A. coluzzii*. Mögliche Prädatoren von Mückenlarven sind Vögel oder Riesenwasserwanzen.

Tab. 5: Akronyme, Größen und Definitionen der Parameter und Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario des Modells für Mücken.

Akronym	Größe	Einheit	Definition
$B(t)$	Beutepopulation zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	10000
$K(t)$	Population der konkurrierenden Art zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
$nGVO(t)$	nGVO-Population zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
$W(t)$	Wildtyp-Population zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
$P(t)$	Population der Prädatorenart zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	100
k_1	kinetische Ratenkonstante für das Wachstum der Beutepopulation	$[d^{-1}]$	0,01
k_2	kinetische Ratenkonstante für den Fraß der Beute durch die Konkurrenzart	$[d^{-1}]$	0,000005

Akronym	Größe	Einheit	Definition
k ₃	kinetische Ratenkonstante für den Fraß der Beute durch den nGVO	[d ⁻¹]	0,000005
k ₄	kinetische Ratenkonstante für den Fraß der Beute durch den Wildtyp	[d ⁻¹]	0,000005
k ₅	kinetische Ratenkonstante für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädator	[d ⁻¹]	0,00001
k ₆	kinetische Ratenkonstante für den Fraß des nGVO durch den Prädator	[d ⁻¹]	0,00001
k ₇	kinetische Ratenkonstante für den Gentransfer zwischen Wildtyp und nGVO	[d ⁻¹]	0,00001
k ₈	kinetische Ratenkonstante für den Fraß des Wildtyps durch den Prädator	[d ⁻¹]	0,00001
k ₉	kinetische Ratenkonstante für die Sterberate des Prädators	[d ⁻¹]	0,015
K ₁₀	kinetische Ratenkonstante für die Abwanderung der Konkurrenzart	[d ⁻¹]	0,001
K ₁₁	kinetische Ratenkonstante für die Abwanderung des nGVO	[d ⁻¹]	0,001
K ₁₂	kinetische Ratenkonstante für die Abwanderung des Wildtyps	[d ⁻¹]	0,001
ÖK	Ökologische Kapazität für die Beutepopulation	[Anzahl]	20000
F _K	Fitnessparameter der konkurrierenden Art	[-]	0,5
F _{nGVO}	Fitnessparameter des nGVO	[-]	0,5
F _W	Fitnessparameter des Wildtyps	[-]	0,5

$$\frac{dB(t)}{dt} = k_1 \cdot B(t) \cdot \left(1 - \frac{B(t)}{\bar{O}K}\right) - k_2 \cdot F_K \cdot B(t) \cdot K(t) - k_3 \cdot F_{nGVO} \cdot B(t) \cdot nGVO(t) - k_4 \cdot F_W \cdot B(t) \cdot W(t) \quad (1)$$

$$\frac{dK(t)}{dt} = k_2 \cdot F_K \cdot B(t) \cdot K(t) - k_5 \cdot (1 - F_K) \cdot K(t) \cdot P(t) - k_{10} \cdot K(t) \quad (2)$$

$$\frac{dnGVO(t)}{dt} = k_3 \cdot F_{nGVO} \cdot B(t) \cdot nGVO(t) - k_6 \cdot (1 - F_{nGVO}) \cdot nGVO(t) \cdot P(t) + k_7 \cdot nGVO(t) \cdot W(t) - k_{11} \cdot nGVO(t) \quad (3)$$

$$\frac{dW(t)}{dt} = k_4 \cdot F_W \cdot B(t) \cdot W(t) - k_8 \cdot (1 - F_W) \cdot W(t) \cdot P(t) - k_7 \cdot nGVO(t) \cdot W(t) - k_{12} \cdot W(t) \quad (4)$$

$$\frac{dP(t)}{dt} = k_5 \cdot (1 - F_K) \cdot K(t) \cdot P(t) + k_6 \cdot (1 - F_{nGVO}) \cdot nGVO(t) \cdot P(t) + k_8 \cdot (1 - F_W) \cdot W(t) \cdot P(t) - k_9 \cdot P(t) \quad (5)$$

2.4.2.2 *Bacillus subtilis*

Im Folgenden sind die gewöhnlichen Differentialgleichungen des Modells von Bakterien wiedergegeben. Tab. 6 gibt die Erläuterungen für die in den gewöhnlichen Differentialgleichungen verwendeten Akronyme des Modells wieder. Weiterhin sind die Parametrisierungen bzw. Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario angegeben. Im Modell wird von einer Genmanipulation ausgegangen, welche durch Optimierung von Stoffwechselprozessen zu einer Steigerung der Fitness des nGVO führt. Das wird im Modell durch die Definition eines Fitnessparameters ausgedrückt. Mögliche Prädatoren von Bakterien in Biofilmen sind Wasserschnecken. Mögliche Konkurrenzarten von *B. subtilis* sind andere Bakterienarten wie z. B. der Gattung *Pseudomonas*, die in Biofilmen mit *B. subtilis* um Nährstoffe konkurrieren.

Tab. 6: Akronyme, Größen und Definitionen der Parameter und Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario des Modells für Bakterien.

Akronym	Größe	Einheit	Definition
K(t)	Population der konkurrierenden Art zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
nGVO(t)	nGVO-Population zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
W(t)	Wildtyp-Population zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
P(t)	Population der Prädatorenart zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	100
k ₁	kinetische Ratenkonstante für das Wachstum des Wildtyps	[d ⁻¹]	0,01
k ₂	kinetische Ratenkonstante für den Fraß des Wildtyps durch den Prädatör	[d ⁻¹]	0,0001
k ₃	kinetische Ratenkonstante für den Gentransfer zwischen nGVO und Wildtyp	[d ⁻¹]	0,00001
k ₄	kinetische Ratenkonstante für das Wachstum des nGVO	[d ⁻¹]	0,01
k ₅	kinetische Ratenkonstante für den Fraß des nGVO durch den Prädatör	[d ⁻¹]	0,0001
k ₆	kinetische Ratenkonstante für das Wachstum der Konkurrenzart	[d ⁻¹]	0,01
k ₇	kinetische Ratenkonstante für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädatör	[d ⁻¹]	0,0001
k ₈	kinetische Ratenkonstante für die Sterberate des Prädators	[d ⁻¹]	0,05
a ₁	Allelopathiefaktor	[-]	1,2
ÖK	Ökologische Kapazität für das Wachstum des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart	[Anzahl]	2000
F _K	Fitnessparameter der konkurrierenden Art	[-]	0,5
F _{nGVO}	Fitnessparameter des nGVO	[-]	0,6

Akronym	Größe	Einheit	Definition
F_W	Fitnessparameter des Wildtyps	[-]	0,5

$$\frac{dW(t)}{dt} = k_1 \cdot W(t) \cdot \left(1 - \frac{W(t)}{\bar{O}_K}\right) \cdot F_W - k_2 \cdot (1 - F_W) \cdot W(t) \cdot P(t) - k_3 \cdot nGVO(t) \cdot W(t) \quad (6)$$

$$\frac{dnGVO(t)}{dt} = k_4 \cdot nGVO(t) \cdot \left(1 - \frac{nGVO(t)}{\bar{O}_K}\right) \cdot F_{nGVO} - k_5 \cdot (1 - F_{nGVO}) \cdot nGVO(t) \cdot P(t) + k_3 \cdot nGVO(t) \cdot W(t) \quad (7)$$

$$\frac{dK(t)}{dt} = k_6 \cdot K(t) \cdot \left(1 - \frac{K(t)}{\bar{O}_K}\right) \cdot F_K - k_7 \cdot a_1 \cdot (1 - F_K) \cdot K(t) \cdot P(t) \quad (8)$$

$$\frac{dP(t)}{dt} = k_2 \cdot (1 - F_W) \cdot W(t) \cdot P(t) + k_5 \cdot (1 - F_{nGVO}) \cdot nGVO(t) \cdot P(t) + k_7 \cdot (1 - F_K) \cdot a_1 \cdot K(t) \cdot P(t) - k_8 \cdot P(t) \quad (9)$$

2.4.2.3 *Chlamydomonas reinhardtii*

Im Folgenden sind die gewöhnlichen Differentialgleichungen des Modells von Algen wiedergegeben. Tab. 7 gibt die Erläuterungen für die in den gewöhnlichen Differentialgleichungen verwendeten Akronyme des Modells wieder. Weiterhin sind die Parametrisierungen bzw. Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario angegeben. Im Modell wird von einer Genmanipulation ausgegangen, welche durch Steigerung der Photosyntheseraten zu einer erhöhten Fitness des nGVO führt. Das wird im Modell durch die Definition eines Fitnessparameters zum Ausdruck gebracht. Mögliche Prädatoren sind Zooplanktonarten wie Ciliaten oder Daphnien. Mögliche Konkurrenzarten sind andere planktonisch lebende Algenarten solcher Gattungen wie *Scenedesmus* oder *Navicula*.

Tab. 7: Akronyme, Größen und Definitionen der Parameter und Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario des Modells für Algen.

Akronym	Größe	Einheit	Definition
$K(t)$	Population der konkurrierenden Art zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
$nGVO(t)$	nGVO-Population zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
$W(t)$	Wildtyp-Population zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
$P(t)$	Population der Prädatorenart zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	100
k_1	kinetische Ratenkonstante für das Wachstum des Wildtyps	[d ⁻¹]	0,01
k_2	kinetische Ratenkonstante für den Fraß des Wildtyps durch den Prädatoren	[d ⁻¹]	0,0001
k_3	kinetische Ratenkonstante für den Gentransfer zwischen nGVO und Wildtyp	[d ⁻¹]	0,00001

Akronym	Größe	Einheit	Definition
k_4	kinetische Ratenkonstante für das Wachstum des nGVO	$[d^{-1}]$	0,01
k_5	kinetische Ratenkonstante für den Fraß des nGVO durch den Prädator	$[d^{-1}]$	0,0001
k_6	kinetische Ratenkonstante für das Wachstum der Konkurrenzart	$[d^{-1}]$	0,01
k_7	kinetische Ratenkonstante für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädator	$[d^{-1}]$	0,0001
k_8	kinetische Ratenkonstante für die Sterberate des Prädators	$[d^{-1}]$	0,05
ÖK	Ökologische Kapazität für das Wachstum des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart	[Anzahl]	2000
F_K	Fitnessparameter der konkurrierenden Art	[-]	0,5
F_{nGVO}	Fitnessparameter des nGVO	[-]	0,6
F_W	Fitnessparameter des Wildtyps	[-]	0,5

$$\frac{d W(t)}{dt} = k_1 \cdot W(t) \cdot \left(1 - \frac{W(t)}{\ddot{O}K}\right) \cdot F_W - k_2 \cdot (1 - F_W) \cdot W(t) \cdot P(t) - k_3 \cdot nGVO(t) \cdot W(t) \quad (10)$$

$$\frac{d nGVO(t)}{dt} = k_4 \cdot nGVO(t) \cdot \left(1 - \frac{nGVO(t)}{\ddot{O}K}\right) \cdot F_{nGVO} - k_5 \cdot (1 - F_{nGVO}) \cdot nGVO(t) \cdot P(t) + k_3 \cdot nGVO(t) \cdot W(t) \quad (11)$$

$$\frac{d K(t)}{dt} = k_6 \cdot K(t) \cdot \left(1 - \frac{K(t)}{\ddot{O}K}\right) \cdot F_K - k_7 \cdot (1 - F_K) \cdot K(t) \cdot P(t) \quad (12)$$

$$\frac{d P(t)}{dt} = k_2 \cdot (1 - F_W) \cdot W(t) \cdot P(t) + k_5 \cdot (1 - F_{nGVO}) \cdot nGVO(t) \cdot P(t) + k_7 \cdot (1 - F_K) \cdot K(t) \cdot P(t) - k_8 \cdot P(t) \quad (13)$$

2.4.2.4 *Oncorhynchus mykiss*

Im Folgenden sind die gewöhnlichen Differentialgleichungen des Modells von Fischen wiedergegeben. Tab. 8 gibt die Erläuterungen für die in den gewöhnlichen Differentialgleichungen verwendeten Akronyme des Modells wieder. Weiterhin sind die Parametrisierungen bzw. Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario angegeben. Im Modell wird von einer Genmanipulation ausgegangen, welche durch Steigerung der Muskelmasse zu einer erhöhten Fitness des nGVO führt. Das wird im Modell durch die Definition eines Fitnessparameters zum Ausdruck gebracht. Als Konkurrenzart wird die Bachforelle angenommen. Mögliche Beutearten sind Köcherfliegenlarven.

Tab. 8: Akronyme, Größen und Definitionen der Parameter und Anfangsbedingungen für je ein Referenzszenario des Modells für Fische.

Akronym	Größe	Einheit	Definition
B(t)	Beutepopulation zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	1000
K(t)	Population der konkurrierenden Art zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	100
nGVO(t)	nGVO-Population zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	100
W(t)	Wildtyp-Population zum Zeitpunkt t	[Anzahl]	100
k ₁	kinetische Ratenkonstante des Wachstums der Beutepopulation	[d ⁻¹]	0,015
k ₂	kinetische Ratenkonstante für den Fraß der Beute durch die Konkurrenzart	[d ⁻¹]	0,000015
k ₃	kinetische Ratenkonstante für den Fraß der Beute durch den nGVO	[d ⁻¹]	0,000015
k ₄	kinetische Ratenkonstante für den Fraß der Beute durch den Wildtyp	[d ⁻¹]	0,000015
k ₅	kinetische Ratenkonstante für die Sterberate der Konkurrenzart	[d ⁻¹]	0,02
k ₆	kinetische Ratenkonstante für die Sterberate des nGVO	[d ⁻¹]	0,02
k ₇	kinetische Ratenkonstante für den Gentransfer zwischen nGVO und Wildtyp	[d ⁻¹]	0,00001
k ₈	kinetische Ratenkonstante für die Sterberate des Wildtyps	[d ⁻¹]	0,02
ÖK	Ökologische Kapazität für das Wachstum der Beutepopulation	[Anzahl]	2000
F _K	Fitnessparameter der konkurrierenden Art	[-]	0,4
F _{nGVO}	Fitnessparameter des nGVO	[-]	0,6
F _W	Fitnessparameter des Wildtyps	[-]	0,5

$$\frac{dB(t)}{dt} = k_1 \cdot B(t) \cdot \left(1 - \frac{B(t)}{\text{ÖK}}\right) - k_2 \cdot F_K \cdot B(t) \cdot K(t) - k_3 \cdot F_{nGVO} \cdot B(t) \cdot nGVO(t) - k_4 \cdot F_W \cdot B(t) \cdot W(t) \quad (14)$$

$$\frac{dK(t)}{dt} = k_2 \cdot F_K \cdot B(t) \cdot K(t) - k_5 \cdot (1 - F_K) \cdot K(t) \quad (15)$$

$$\frac{dnGVO(t)}{dt} = k_3 \cdot F_{nGVO} \cdot B(t) \cdot nGVO(t) - k_6 \cdot (1 - F_{nGVO}) \cdot nGVO(t) + k_7 \cdot nGVO(t) \cdot W(t) \quad (16)$$

$$\frac{dW(t)}{dt} = k_4 \cdot F_W \cdot B(t) \cdot W(t) - k_8 \cdot (1 - F_W) \cdot W(t) - k_7 \cdot nGVO(t) \cdot W(t) \quad (17)$$

2.4.3 Referenzszenarien

2.4.3.1 *Anopheles gambiae*

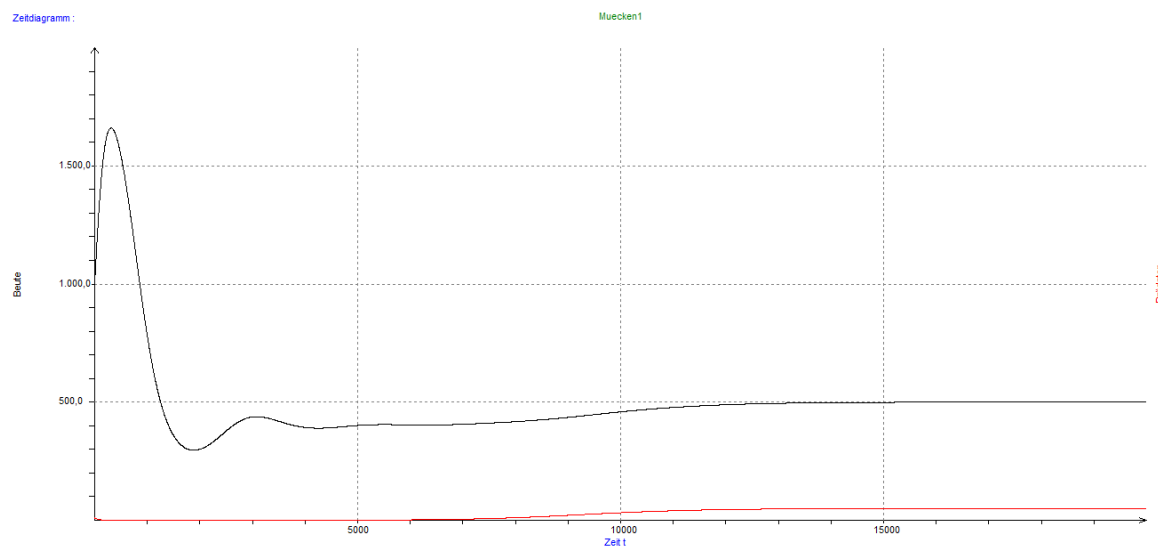


Abb. 10: Ergebnisse des Referenzszenarios für *Anopheles gambiae*. Schwarze Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für eine Beute, rote Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für einen Prädator.

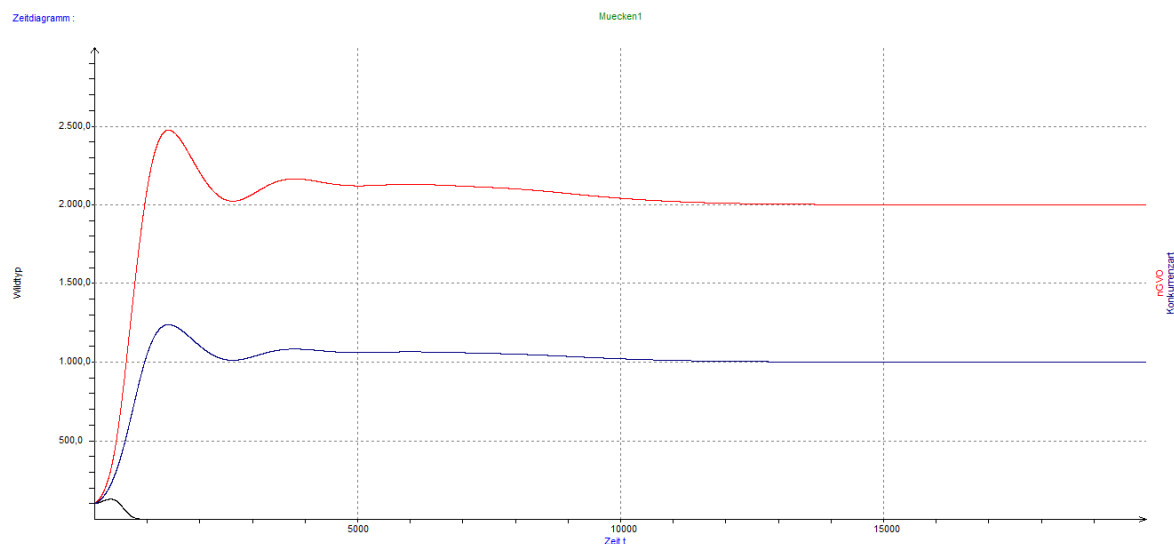


Abb. 11: Ergebnisse des Referenzszenarios für *Anopheles gambiae*. Schwarze Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für den Wildtyp, rote Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für den nGVO, blaue Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für eine Konkurrenzart.

Für das Referenzszenario wurde entgegen der beabsichtigten Ausrottung des Malariavektors eine Parametrisierung gewählt, welche mit einem erhöhten Fitnessparameter des nGVO die Risiken einer Ausbringung von nGV-Mücken aufzeigen soll (vgl. 2.4.1.1). Die Ergebnisse des Referenzszenarios des Mückenmodells stehen daher den gewünschten Effekten entgegen.

Die Zustandsgrößen im Mückenmodell oszillieren schwach (Abb. 10, Abb. 11). Die Oszillationen nehmen sukzessive ab. Das Modell steuert auf einen stabilen stationären Punktattraktor,

einen Strudel, mit den Koordinaten (Beute: 500; Wildtyp: 0; nGVO: 2000; Konkurrent: 1000; Prädator: 50,0) zu. D. h. der Wildtyp von *Anopheles gambiae* stirbt aus. Der nGVO etabliert sich und erreicht höhere Werte als die Konkurrenzart, z. B. *Anopheles coluzzii*.

Das Aussterben des Wildtyps mag aus epidemiologischer Sicht wünschenswert sein, jedoch etabliert sich der nGVO, dessen Veränderung kurzflügelige Individuen hervorruft, auf einem hohen Niveau. Letzteres widerspricht dem eigentlichen Ziel der neuen Gentechniken, Mücken in ihrem Bestand zu reduzieren. Weiterhin ist die Abnahme der Population von *A. coluzzii* aus ökologischer und epidemiologischer Sicht bedenklich, da *A. coluzzii* kein Träger von Plasmodien ist.

Ein künftiges nGVO-Monitoring sollte aufgrund der Populationsdynamiken des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart alle drei Populationen zeitlich und räumlich erfassen. Da der stationäre Punkt schnell erreicht wird, sollte die Frequenz der Erfassungen zumindest anfänglich hoch sein. Dafür sind z. B. kontinuierliche Erfassungen mit Sammelfallen geeignet. Weiterhin sollten neben adulten Mücken auch die Larvenstadien überwacht werden, um die zeitliche Dynamik gut abzubilden. Da zusätzlich mit einer schnellen räumlichen Ausbreitung des nGVO zu rechnen ist, sollte das Monitoring räumlich verteilt und großflächig sein. Hierfür könnten Bürgerwissenschaftler*innen herangezogen werden, um den logistischen Aufwand und die finanziellen Kosten zu minimieren. Da mit den neuen Gentechniken an *A. gambiae* nicht immer morphologische Veränderungen der Mücken einhergehen, ist der Einsatz von neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden sinnvoll.

2.4.3.2 *Bacillus subtilis*

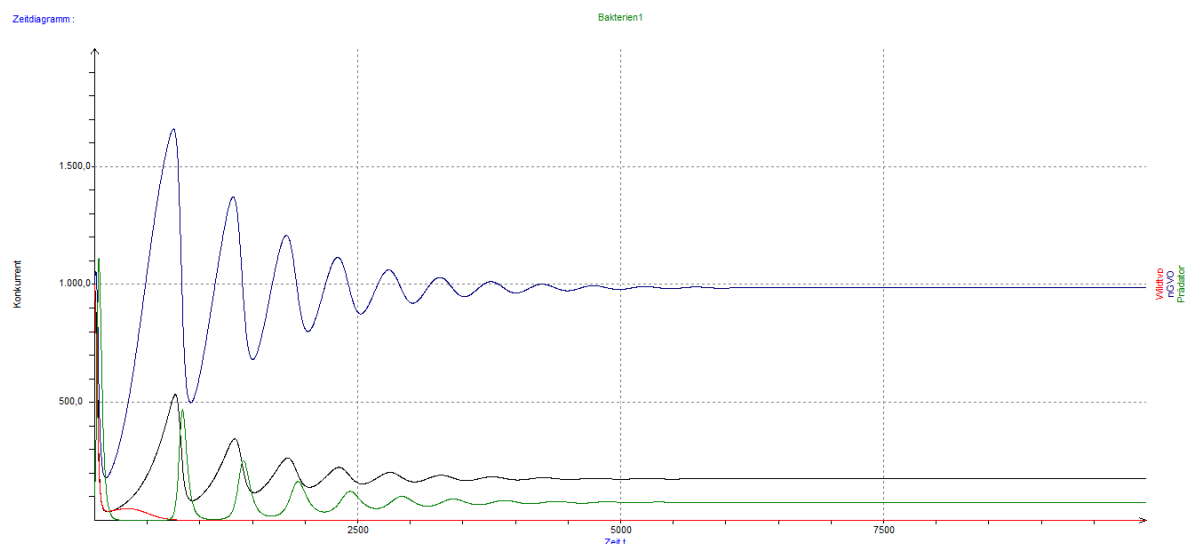


Abb. 12: Ergebnisse des Referenzszenarios für *Bacillus subtilis*. Schwarze Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für eine Konkurrenzart, rote Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für den Wildtyp, blaue Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für den nGVO, grüne Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für einen Prädator.

Die Zustandsgrößen im Bakterienmodell oszillieren (Abb. 12). Die Oszillationen nehmen sukzessive ab. Das Modell steuert auf einen stabilen stationären Punktattraktor, einen Strudel, mit den Koordinaten (Wildtyp: 0; nGVO: 986,5; Konkurrent: 175,7; Prädator: 76) zu. D. h. die nGVO-Variante von *Bacillus subtilis* etabliert sich sehr schnell gegenüber dem Wildtyp, der

ausstirbt. Konkurrierende Arten werden durch Allelopathie und aufgrund geringerer Fitness im Vergleich zum nGVO von diesem zurückgedrängt, sterben aber nicht aus.

Das Aussterben des Wildtyps und die Zurückdrängung der konkurrierenden Art ist ein unbeabsichtigter Eingriff in das benthische Ökosystem, welcher die Stabilität gefährden könnte. Der gewünschte Effekt der durch Gentechniken hervorgerufenen Eigenschaftsänderungen der Bakterien, wird jedoch durch die Etablierung des nGVO erreicht.

Ein künftiges nGVO-Monitoring sollte aufgrund der Populationsdynamiken des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart alle drei Populationen zeitlich und räumlich erfassen. Das Monitoring sollte wegen der schnellen Dynamik nicht nur zeitlich hochauflösend, sondern auch langfristig angelegt sein, da der stationäre Punkt nur langsam erreicht wird. Ein künftiges Monitoring sollte anfänglich auf einzelne Gewässer fokussieren, da benthische Bakterien nur kurzfristig mobil sind und eine schnelle räumliche Ausbreitung des nGVO daher nicht wahrscheinlich ist. Es sollten vorwiegend neuartige molekularbiologische Nachweismethoden zum Einsatz kommen, da andere Methoden wie bildgebende und mikroskopische Verfahren zur Unterscheidung von Bakterienstämmen derselben Art nur wenig geeignet sind.

2.4.3.3 *Chlamydomonas reinhardtii*

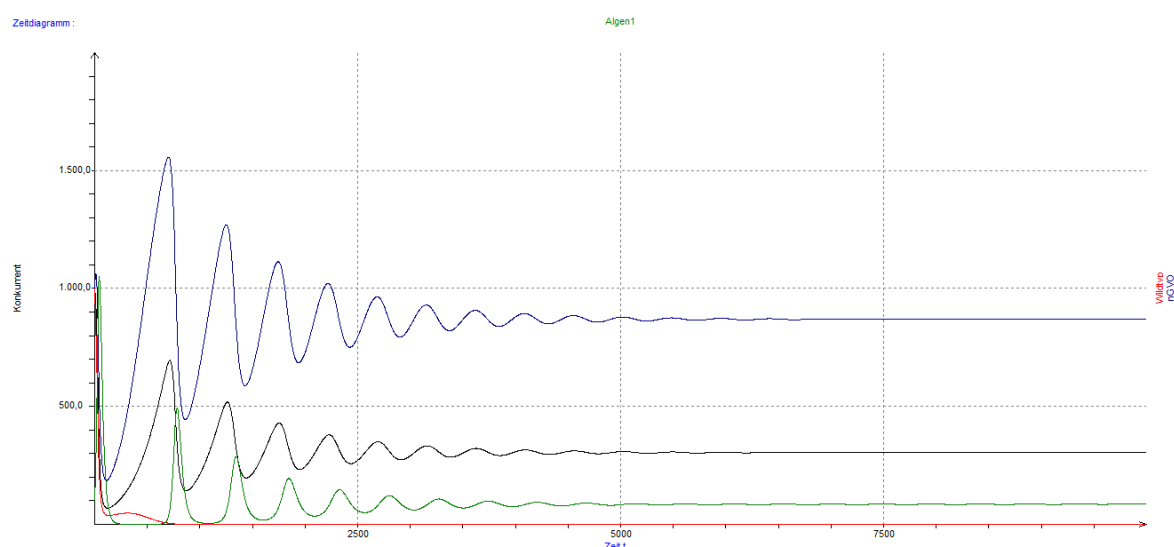


Abb. 13: Ergebnisse des Referenzszenarios für *Chlamydomonas reinhardtii*. Schwarze Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für eine Konkurrenzart, rote Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für den Wildtyp, blaue Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für den nGVO, grüne Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für einen Prädator.

Die Zustandsgrößen im Algenmodell oszillieren (Abb. 13). Die Oszillationen nehmen sukzessive ab. Das Modell steuert auf einen stabilen stationären Punktattraktor, einen Strudel, mit den Koordinaten (Wildtyp: 0; nGVO: 869,5; Konkurrent: 304,3; Prädator: 84,8) zu. D. h. die nGVO-Variante von *Chlamydomonas reinhardtii* etabliert sich sehr schnell gegenüber dem Wildtyp, der ausstirbt. Konkurrierende Arten werden aufgrund geringerer Fitness im Vergleich zum nGVO von diesem zurückgedrängt, sterben aber nicht aus.

Das Aussterben des Wildtyps und die Zurückdrängung der konkurrierenden Art sind unbeabsichtigte Eingriffe in das pelagische Ökosystem, welche seine Stabilität gefährden könnten.

Auch die Etablierung des nGVO in Freilandsystemen würde eher unbeabsichtigt als gezielt erfolgen.

Ein künftiges nGVO-Monitoring sollte aufgrund der Populationsdynamiken des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart alle drei Populationen zeitlich und räumlich erfassen. Das Monitoring sollte wegen der schnellen Dynamik nicht nur zeitlich hochauflösend, sondern auch langfristig angelegt sein, da der stationäre Punkt nur langsam erreicht wird. Ein künftiges Monitoring sollte weiträumig verteilte Probenahmen beinhalten, da planktonische Grünalgen schnell verdriftet werden können. Es sollten vorwiegend neuartige molekularbiologische Nachweismethoden zum Einsatz kommen, da andere Methoden wie bildgebende und mikroskopische Verfahren zur Unterscheidung von Mikroalgenstämmen derselben Mikroalgenart nur wenig geeignet sind.

2.4.3.4 *Oncorhynchus mykiss*

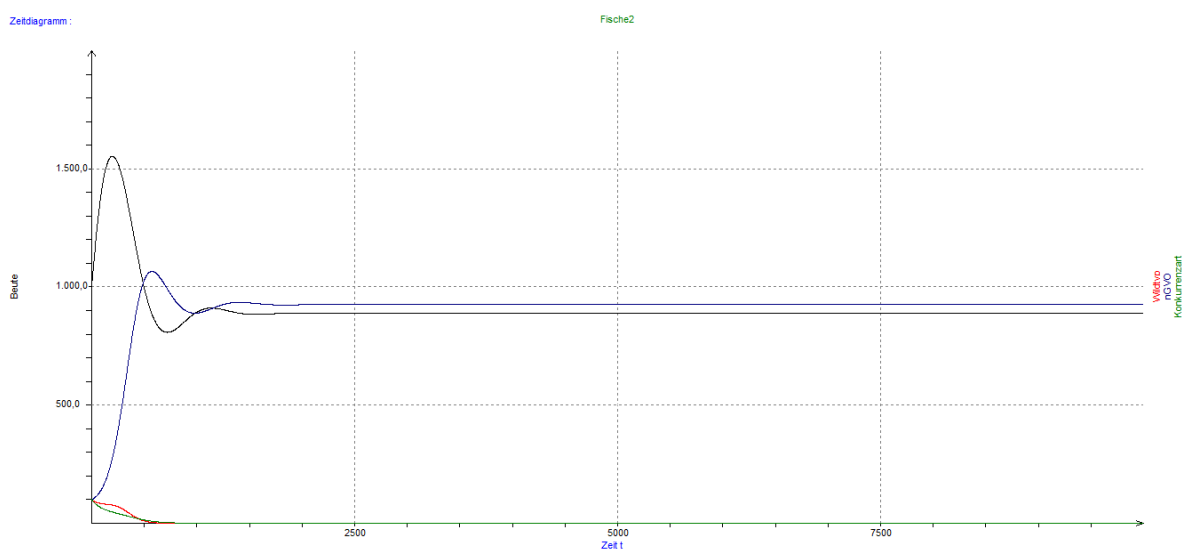


Abb. 14: Ergebnisse des Referenzszenarios für *Oncorhynchus mykiss*. Schwarze Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für eine Beuteart, rote Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für den Wildtyp, blaue Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für den nGVO, grüne Linie: Simulationsergebnisse über die Zeit [d] für eine Konkurrenzart.

Die Zustandsgrößen im Fischmodell oszillieren schwach (Abb. 14). Das Modell steuert auf einen stabilen stationären Punktattraktor, einen Strudel, mit den Koordinaten (Beute: 888,9; Wildtyp: 0; nGVO: 925,9; Konkurrent: 0) zu. D. h. die nGVO-Variante von *Oncorhynchus mykiss* etabliert sich sehr schnell gegenüber dem Wildtyp, der ausstirbt. Die konkurrierende Art, die Bachforelle, stirbt aufgrund geringerer Fitness im Vergleich zum nGVO ebenfalls sehr schnell aus.

Das Aussterben des Wildtyps und der konkurrierenden Art, der Bachforelle, sind unbeabsichtigte Eingriffe in das pelagische Ökosystem, welche dessen Stabilität gefährden könnte. Insbesondere das weitere Zurückdrängen der einheimischen Bachforelle durch nGVO die invasive Regenbogenforelle ist ein aus ökologischer Sicht negativer und unerwünschter Effekt.

Ein künftiges nGVO-Monitoring sollte aufgrund der Populationsdynamiken des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart alle drei Populationen zeitlich und räumlich erfassen. Das Monitoring sollte wegen der schnellen Dynamik zeitlich hochauflösend sein. Die im Vergleich zu

Algen und Bakterien langen Generationszeiten von *O. mykiss* erfordern darüber hinaus ein langfristiges Monitoring. Ein künftiges Monitoring sollte weiträumig angelegt sein, da Forellen ein ausgeprägtes Migrationsverhalten aufweisen. Neben neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden können bildgebende Verfahren in Kombination mit künstlicher Intelligenz sowie Bürgerwissenschaften (Angler*innen) zum Einsatz kommen, um die logistischen und finanziellen Kosten zu minimieren.

2.4.4 Sensitivitätsanalysen

Im Anschluss an die Simulationen der Referenzszenarien wurden lokale Sensitivitätsanalysen durchgeführt. Sie dienen der Bestimmung der Unsicherheiten eines Modells bezüglich der Variation eines Parameters. Für jeden potenziell sensitiven Parameter wurden drei Simulationen benötigt: das jeweilige Referenzszenario diente als Grundlage, eine Simulation wurde mit einer um 10 Prozent erhöhten und eine weitere mit einer um 10 Prozent verringerten Variante eines Parameters berechnet. Anhand folgender Gleichungen wurde anschließend für jede Zustandsgröße die Sensitivität bezüglich eines Parameters ermittelt:

$$S = \frac{x(1,1 \cdot p) - x(p)}{0,1 \cdot p} * \frac{p}{x(p)} \quad (18)$$

$$S = \frac{x(0,9 \cdot p) - x(p)}{-0,1 \cdot p} * \frac{p}{x(p)} \quad (19)$$

- S : Sensitivität [-]
- $x(1,1 \cdot p)$ und $x(0,9 \cdot p)$: Simulationsergebnisse mit dem jeweils veränderten Parameter am stabilen stationären Punkt
- $x(p)$: Simulationsergebnis des Referenzszenarios am stabilen stationären Punkt
- p : Parameterwert.

Die Sensitivitäten des Mückenmodells sind in Tab. 9 wiedergegeben. Folgende Parameter wiesen die höchsten Sensitivitäten auf:

- kinetische Ratenkonstante k_3 für den Fraß der Beute durch den nGVO,
- kinetische Ratenkonstante k_5 für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädator,
- kinetische Ratenkonstante k_6 für den Fraß des nGVO durch den Prädator,
- kinetische Ratenkonstante k_9 für die Sterberate des Prädators,
- Fitnessparameter F_K der konkurrierenden Art,
- Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO.

Tab. 9: Ergebnisse der lokalen Sensitivitätsanalysen des Mückenmodells. Angegeben sind die Sensitivitäten S [%] aller Zustandsgrößen bezüglich der implementierten Parameter p. Sensitivitäten > 50 % sind gelb markiert. Sensitivitäten > 100 % sind orange markiert.

Parameter	nGVO		Wildtyp		Konkurrenzart		Beute		Prädatör	
Variation	10%	-10%	10%	-10%	10%	-10%	10%	-10%	10%	-10%
k ₁	-862,83%	40,00%	0,00%	0,00%	0,00%	40,00%	272,72%	200,00%	1363,60%	1000,00%
k ₂	-741,88%	-453,46%	0,00%	0,00%	1466,60%	907,79%	-227,50%	-10,60%	-817,60%	-37,40%
k ₃	403,55%	848,22%	0,00%	0,00%	-828,08%	-1694,10%	-258,98%	-34,18%	-945,60%	-118,40%
k ₄	8,99%	8,87%	0,00%	0,00%	-17,98%	-17,73%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k ₅	205,47%	102,30%	0,00%	0,00%	-465,37%	-336,21%	54,96%	131,28%	250,20%	642,00%
k ₆	-382,15%	-148,31%	0,00%	0,00%	639,29%	98,04%	125,94%	198,44%	559,00%	992,00%
k ₇	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k ₈	-0,53%	-0,52%	0,00%	0,00%	1,07%	1,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k ₉	66,67%	100,00%	0,00%	0,00%	66,67%	100,00%	-200,00%	-300,00%	-1000,00%	-1500,00%
k ₁₀	405,19%	680,37%	0,00%	0,00%	-809,83%	-1361,80%	-0,56%	1,10%	-28,00%	-309,40%
k ₁₁	-679,73%	-404,90%	0,00%	0,00%	1361,04%	809,43%	-1,64%	0,38%	-93,40%	-372,80%
k ₁₂	-0,77%	-0,77%	0,00%	0,00%	1,54%	1,55%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
ÖK	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	100,00%	500,00%	500,00%
F _K	-754,73%	-476,19%	0,00%	0,00%	1520,34%	957,77%	-262,48%	-10,22%	-1000,00%	-41,40%
F _{nGVO}	416,48%	939,56%	0,00%	0,00%	-846,54%	-1864,03%	-269,56%	-28,80%	-1000,00%	-115,80%
F _W	9,52%	9,38%	0,00%	0,00%	-19,04%	-18,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Die Sensitivitäten des Bakterienmodells sind in Tab. 10 wiedergegeben. Folgende Parameter wiesen die höchsten Sensitivitäten auf:

- kinetische Ratenkonstante k₆ für das Wachstum der Konkurrenzart,
- kinetische Ratenkonstante k₇ für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädatör,
- Allelopathiefaktor a₁,
- Ökologische Kapazität ÖK für das Wachstum des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart,
- Fitnessparameter F_K der konkurrierenden Art,
- Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO.

Tab. 10: Ergebnisse der lokalen Sensitivitätsanalysen des Bakterienmodells. Angegeben sind die Sensitivitäten S [%] aller Zustandsgrößen bezüglich der implementierten Parameter p. Sensitivitäten > 50 % sind gelb markiert. Sensitivitäten > 100 % sind orange markiert.

Parameter	nGVO		Wildtyp		Konkurrenzart		Prädator	
Variation	10%	-10%	10%	-10%	10%	-10%	10%	-10%
k ₁	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,13%	0,00%
k ₂	-0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	-0,06%	0,00%	0,00%	-0,13%
k ₃	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k ₄	69,86%	81,08%	0,00%	0,00%	-261,56%	-302,31%	25,39%	29,34%
k ₅	-99,12%	-104,67%	0,00%	0,00%	33,58%	-21,69%	-2,76%	1,84%
k ₆	-73,04%	-77,03%	0,00%	0,00%	273,17%	288,42%	70,92%	74,87%
k ₇	65,25%	69,99%	0,00%	0,00%	-312,96%	-402,04%	-63,29%	-68,55%
k ₈	34,23%	34,28%	0,00%	0,00%	346,08%	346,03%	-33,29%	-33,42%
a ₁	69,87%	80,93%	0,00%	0,00%	-261,56%	-302,65%	-67,76%	-79,21%
ÖK	65,74%	65,78%	0,00%	0,00%	-246,07%	-246,07%	30,39%	36,84%
F _K	-142,93%	-140,52%	0,00%	0,00%	705,89%	569,16%	139,87%	136,71%
F _{nGVO}	222,34%	230,80%	0,00%	0,00%	-146,00%	-432,09%	14,21%	38,42%
F _W	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,06%	0,13%	0,00%

Die Sensitivitäten des Algenmodells sind in Tab. 11 wiedergegeben. Folgende Parameter weisen die höchsten Sensitivitäten auf:

- kinetische Ratenkonstante k₄ für das Wachstum des nGVO,
- kinetische Ratenkonstante k₆ für das Wachstum der Konkurrenzart,
- kinetische Ratenkonstante k₇ für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädator,
- Fitnessparameter F_K der konkurrierenden Art,
- Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO,
- Ökologische Kapazität ÖK für das Wachstum des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart.

Tab. 11: Ergebnisse der lokalen Sensitivitätsanalysen des Algenmodells. Angegeben sind die Sensitivitäten S [%] aller Zustandsgrößen bezüglich der implementierten Parameter p. Sensitivitäten > 50 % sind gelb markiert. Sensitivitäten > 100 % sind orange markiert.

Parameter	nGVO		Wildtyp		Konkurrenzart		Prädator	
Variation	10%	-10%	10%	-10%	10%	-10%	10%	-10%
k ₁	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%
k ₂	-0,02%	-0,03%	0,00%	0,00%	-0,03%	-0,03%	0,12%	0,00%
k ₃	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k ₄	79,66%	90,71%	0,00%	0,00%	-181,87%	-207,34%	32,92%	35,28%
k ₅	-114,49%	-124,40%	0,00%	0,00%	60,00%	27,04%	-9,91%	-5,19%
k ₆	-82,02%	-87,91%	0,00%	0,00%	187,13%	200,70%	63,59%	67,48%
k ₇	68,70%	69,58%	0,00%	0,00%	-233,50%	-288,44%	-52,38%	-53,68%

Parameter	nGVO		Wildtyp		Konkurrenzart		Prädatör	
k_8	50,00%	49,95%	0,00%	0,00%	214,31%	214,27%	-38,11%	-38,23%
ÖK	50,17%	49,96%	0,00%	0,00%	-114,12%	-114,35%	34,92%	42,24%
F_K	-149,22%	-156,86%	0,00%	0,00%	489,83%	416,69%	114,56%	120,34%
F_{nGVO}	264,65%	259,82%	0,00%	0,00%	-171,16%	-339,73%	31,03%	65,01%
F_W	0,03%	0,02%	0,00%	0,00%	0,03%	0,03%	0,00%	-0,12%

Die Sensitivitäten des Fischmodells sind in Tab. 12 wiedergegeben. Folgende Parameter wiesen die höchsten Sensitivitäten auf:

- kinetische Ratenkonstante k_1 des Wachstums der Beutepopulation,
- kinetische Ratenkonstante k_3 für den Fraß der Beute durch den nGVO,
- kinetische Ratenkonstante k_6 für die Sterberate des nGVO,
- Ökologische Kapazität ÖK für das Wachstum der Beutepopulation,
- Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO.

Tab. 12: Ergebnisse der lokalen Sensitivitätsanalysen des Fischmodells. Angegeben sind die Sensitivitäten S [%] aller Zustandsgrößen bezüglich der implementierten Parameter p . Sensitivitäten > 50 % sind gelb markiert. Sensitivitäten > 100 % sind orange markiert.

Parameter	nGVO		Wildtyp		Konkurrenzart		Beute	
Variation	10%	-10%	10%	-10%	10%	-10%	10%	-10%
k_1	99,99%	100,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k_2	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k_3	74,38%	135,81%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	-90,91%	-111,11%
k_4	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k_5	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k_6	-200,01%	-200,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,01%	100,00%
k_7	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
k_8	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
ÖK	182,00%	222,23%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
F_K	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
F_{nGVO}	322,31%	506,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	-227,27%	-277,78%
F_W	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Die Ergebnisse der lokalen Sensitivitätsanalysen ermöglichen Rückschlüsse auf die Unsicherheit des jeweiligen Modells bezüglich der Variation eines Parameters. Es wird hierbei jedoch kein Modellverhalten im Sinne der zeitlichen Entwicklungen von Zustandsgrößen beschrieben. Daher sind Schlussfolgerungen bezüglich eines künftigen nGVO-Monitorings auf der Basis der Ergebnisse der Sensitivitätsanalysen nur sehr schwer möglich. Die Ergebnisse der Sensitivitätsanalysen dienen vor allem der Auswahl der zu variierenden Parameter in den Szenarienanalysen, d. h. hierfür wurden die Parameter ausgewählt, für die das jeweilige Modell die höchsten Sensitivitäten aufweist. Tabelle 21 im Anhang gibt für jedes Modell eine Rangfolge der Parameter gemäß den Sensitivitäten wieder.

2.4.5 Szenarienanalysen

Aufbauend auf den Sensitivitätsanalysen erfolgte für jedes der vier Modelle eine Szenarienanalyse. Sie hatte zum Ziel, Vorhersagen zur Ausbreitung des jeweiligen nGVO und deren Wirkung auf andere Arten zu treffen, d. h. es wurde simuliert, welche Änderungen der Populationen im Ökosystem erfolgen, wenn ein sensibler Parameter erhöht oder erniedrigt wird. Es wurde für jede Beispielart ein Referenzszenario festgelegt und davon ausgehend je sechs Szenarien errechnet, wobei jene Parameter gegenüber dem Referenzszenario verändert wurden, die bezüglich aller Zustandsgrößen die höchsten Sensitivitäten aufwiesen. Tab. 13 fasst für die vier Modelle die Grundannahmen der jeweiligen Szenarienanalysen zusammen.

Tab. 13: Annahmen von jeweils sechs Szenarien für die Modelle der vier Beispielarten. Das jeweilige Referenzszenario wird als Szenario 1 konnotiert und in dieser Tabelle nicht aufgeführt.

Modell/Szenario	Annahme
Mückenmodell	
Szenario 2	Erniedrigte kinetische Ratenkonstante k_3 für den Fraß der Beute durch den nGVO
Szenario 3	Erhöhte kinetische Ratenkonstante k_5 für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädator
Szenario 4	Erhöhte kinetische Ratenkonstante k_6 für den Fraß des nGVO durch den Prädator
Szenario 5	Erniedrigte kinetische Ratenkonstante k_9 für die Sterberate des Prädators
Szenario 6	Erhöhter Fitnessparameter F_k der konkurrierenden Art
Szenario 7	Erniedrigter Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO
Szenario 8	Ausbringung und Ausbreitung einer Mutation steriler männlicher Mücken: Wachstumsparameter für nGVO $k_3 = 0$
Bakterienmodell	
Szenario 2	Erhöhte kinetische Ratenkonstante k_6 für das Wachstum der Konkurrenzart
Szenario 3	Erniedrigte kinetische Ratenkonstante k_7 für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädator
Szenario 4	Erniedrigter Allelopathiefaktor a_1
Szenario 5	Erhöhte Ökologische Kapazität $\bar{O}K$ für das Wachstum des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart
Szenario 6	Erhöhter Fitnessparameter F_k der konkurrierenden Art
Szenario 7	Erniedrigter Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO
Algenmodell	
Szenario 2	Erniedrigte kinetische Ratenkonstante k_4 für das Wachstum des nGVO
Szenario 3	Erhöhte kinetische Ratenkonstante k_6 für das Wachstum der Konkurrenzart
Szenario 4	Erniedrigte kinetische Ratenkonstante k_7 für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädator

Modell/Szenario	Annahme
Szenario 5	Erhöhter Fitnessparameter F_K der konkurrierenden Art
Szenario 6	Erniedrigter Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO
Szenario 7	Erhöhte Ökologische Kapazität $\ddot{O}K$ für das Wachstum des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart
Fischmodell	
Szenario 2	Erhöhte kinetische Ratenkonstante k_1 des Wachstums der Beutepopulation
Szenario 3	Erhöhte kinetische Ratenkonstante k_3 für den Fraß der Beute durch den nGVO
Szenario 4	Erhöhte kinetische Ratenkonstante k_6 für die Sterberate des nGVO
Szenario 5	Erhöhte Ökologische Kapazität $\ddot{O}K$ für das Wachstum der Beutepopulation
Szenario 6	Erniedrigter Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO in gleicher Höhe des Fitnessparameters F_W des Wildtyps
Szenario 7	Weiter erniedrigter Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO unter der Höhe des Fitnessparameters F_W des Wildtyps

Die Ergebnisse der Szenarienanalysen des Mückenmodells sind in Tab. 14 dargestellt. In allen Szenarien stirbt der Wildtyp aus. Bei erniedrigter kinetischer Ratenkonstante k_3 für den Fraß der Beute durch den nGVO, nimmt der nGVO sehr niedrige Werte an und die Konkurrenzart breitet sich stark aus. Die Beutepopulation und die Population des Prädators bleiben nahezu unbeeinflusst. Bei erhöhter kinetischer Ratenkonstante k_5 für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädatoren, nimmt die Konkurrenzart sehr niedrige Werte an und der nGVO breitet sich stark aus. Die Beutepopulation und die Population des Prädators bleiben nahezu unbeeinflusst. Bei erhöhter kinetischer Ratenkonstante k_6 für den Fraß des nGVO durch den Prädatoren, nimmt der nGVO sehr niedrige Werte an und die Konkurrenzart breitet sich stark aus. Die Beutepopulation und die Population des Prädators bleiben nahezu unbeeinflusst. Bei erniedrigter kinetischer Ratenkonstante k_9 für die Sterberate des Prädators, nehmen die Populationen der Beute, des nGVO und der Konkurrenzart gleichermaßen ab und die Population des Prädators nimmt erheblich zu. Bei erhöhtem Fitnessparameter F_K der konkurrierenden Art nehmen die Populationen der Beute und des nGVO ab, die Konkurrenzart breitet sich aus und der Prädatoren stirbt aus. Bei erniedrigtem Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO stirbt der nGVO nahezu aus, die Konkurrenzart breitet sich stark aus, während die Populationen der Beute und des Prädators nahezu unverändert bleiben. Bei der Ausbringung steriler Männchen sterben sowohl der nGVO als auch der Wildtyp aus, die Konkurrenzart breitet sich aus, und Beute sowie Prädatoren bleiben nahezu unverändert. Der Wildtyp stirbt in Szenario 8 ebenfalls aus, da im Mückenmodell der horizontale Gentransfer zwischen nGVO und Wildtyp explizit beschrieben wird.

Zusammenfassend sind die Fitnessparameter des nGVO und der Konkurrenzart entscheidend für die Entwicklungen ihrer Populationen. Hingegen bleiben Beute und Prädatoren in fast allen Fällen unbeeinflusst von Änderungen der Parameter. Je niedriger die Fitness des nGVO aufgrund der genetischen Veränderung der Flügel der Individuen im Vergleich zur Konkurrenzart ist, desto mehr breitet sich die Konkurrenzart aus. Aus epidemiologischer Sicht ist daher eine geringe Fitness des nGVO essentiell, da *A. coluzzii* nicht als Überträger von Plasmodium fungiert. Eine unbeabsichtigte hohe Fitness des nGVO würde statt zu einer Eindämmung von

Infektionskrankheiten zu ihrer weiteren Verbreitung führen, auch wenn der Wildtyp in jedem Fall ausstirbt. Daher sollte die Überlebensfähigkeit des nGVO zusammen mit Populationen der Konkurrenzart langfristig und intensiv in abgeschlossenen Systemen getestet werden, bevor Freilandexperimente mit nGVO durchgeführt werden.

Szenario 8, welches die Ausbringung steriler Mückenmännchen darstellt, ist ein Sonderfall, da hierbei nicht die Fitnessparameter, sondern die Wachstumskonstante des nGVO entscheidend für die Populationsdynamiken ist. Änderungen der Fitnessparameter beschreiben z. B. eine Mutation mit verkürzten Flügellängen. Die Ergebnisse der beiden Modellannahmen sind unterschiedlich, insofern bei der sexuellen Mutation der nGVO ausstirbt. Aus epidemiologischer Sicht ist das Verschwinden von nGVO und Wildtyp wünschenswert, jedoch breitet sich die Konkurrenzart stark aus. Für Prädator und Beute hat das indes keine negativen Konsequenzen.

Für die Ausbringung von nGV-Mücken bestehen bereits mehrere Modelle, die zum Teil deterministisch und teilweise datenbasiert sind (siehe Kapitel 2.2.1.5). Aktuell gibt es nur wenige ökologische Modelle. Diese beschreiben nicht nur die zeitlichen Dynamiken von Mückenpopulationen und anderen Arten, sondern auch die räumliche Ausbreitung eines nGVO.

Tab. 14: Ergebnisse der Szenarienanalysen des Mückenmodells. Unter den Ergebnissen sind die Werte der Zustandsgrößen am stabilen stationären Punkt aufgeführt. Gegenüber dem Referenz-szenario veränderte Parameter sind gelb markiert.

Parameter	Referenzszenario	Szenario 2	Szenario 3	Szenario 4	Szenario 5	Szenario 6	Szenario 7	Szenario 8
k_1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
k_2	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005
k_3	0,000005	0,000004	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0
k_4	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005
k_5	0,00001	0,00001	0,000015	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
k_6	0,00001	0,00001	0,00001	0,000015	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
k_7	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
k_8	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
k_9	0,015	0,015	0,015	0,015	0,012	0,015	0,015	0,015
k_{10}	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
k_{11}	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
k_{12}	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
a_1	-	-	-	-	-	-	-	-
ÖK	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
F_K	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5
F_{nGVO}	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5
F_W	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ergebnisse								
$B(t)$	500	503	507	513	800	335	501	500
$K(t)$	1000	2980	25	2930	800	2709	2995	3.000
$nGVO(t)$	2000	19	2961	45	1600	80	4	0
$W(t)$	0	0	0	0	0	0	0	0
$P(t)$	50	51	53	56	200	0	50	50

Die Ergebnisse der Szenarienanalysen des Bakterienmodells sind in Tab. 15 dargestellt. In allen Szenarien stirbt der Wildtyp aus. Bei erhöhter kinetischer Ratenkonstante k_6 für das Wachstum der Konkurrenzart nimmt die Population der Konkurrenzart zu, die Population des nGVO nimmt ab, und die Population des Prädators nimmt zu. Die Population des nGVO bleibt gegenüber der Konkurrenzart dominant. Bei erniedrigter kinetischer Ratenkonstante k_7 für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädator ähneln die Simulationsergebnisse denen des vorhergehenden Szenarios. Bei erniedrigtem Allelopathiefaktor a_1 ähneln die Simulationsergebnisse tendenziell denen der beiden vorhergehenden Szenarien, nur das Ausmaß der Änderungen gegenüber dem Referenzszenario ist gering. Bei erhöhter ökologischer Kapazität $\ddot{O}K$ für das Wachstum des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart stirbt die Konkurrenzart nahezu aus, der nGVO breitet sich aus, und die Population des Prädators bleibt nahezu unverändert. Bei erhöhtem Fitnessparameter F_K der konkurrierenden Art nehmen die Populationen der konkurrierenden Art und des Prädators zu, und die Population des nGVO nimmt gegenüber dem Referenzszenario ab, sie bleibt jedoch größer als die Population der Konkurrenzart. Bei erniedrigtem Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO breitet sich die Konkurrenzart stark aus und dominiert gegenüber der Population des nGVO, welcher erheblich abnimmt. Die Population des Prädators nimmt gegenüber dem Referenzszenario ab.

Entscheidend für die Etablierung des nGVO in Freilandökosystemen sind die Fitnessparameter des nGVO und der Konkurrenzart. Der Effekt einer Biodüngung durch den nGVO ist zwar in Bodensystemen erwünscht, würde jedoch in aquatischen Systemen zu einer Eutrophierung des Gewässers führen. Daher ist eine Erhöhung der Fitness des nGVO gegenüber dem Wildtyp und der Konkurrenzart für limnische Systeme mit Risiken verbunden. Durch die Erhöhung der ökologischen Kapazität, d. h. durch Erhöhung der Nährstoffkonzentrationen, verstärkt sich der Effekt der Ausbreitung des nGVO gegenüber der Konkurrenzart, so dass eine positive Rückkopplung vorliegt, welche zum Aussterben konkurrierender Arten und somit zu einem Verlust an Biodiversität führen kann. Dadurch ist eine Degradation des limnischen Systems möglich. Es gilt daher, vor Ausbringung des nGVO in Freilandsysteme im Labor oder in Mesokosmen zu prüfen, inwieweit konkurrierende Arten durch die neuen Gentechniken an *B. subtilis* zurückgedrängt werden. In solchen Experimenten sind daneben die Effekte der Nährstoffparameter zu untersuchen.

Tab. 15: Ergebnisse der Szenarienanalysen des Bakterienmodells. Unter den Ergebnissen sind die Werte der Zustandsgrößen am stabilen stationären Punkt aufgeführt. Gegenüber dem Referenzszenario veränderte Parameter sind gelb markiert.

Parameter	Referenzszenario	Szenario 2	Szenario 3	Szenario 4	Szenario 5	Szenario 6	Szenario 7
k_1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
k_2	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
k_3	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
k_4	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
k_5	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
k_6	0,01	0,015	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
k_7	0,0001	0,0001	0,00008	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
k_8	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
a_1	1,2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,2
$\ddot{O}K$	2000	2000	2000	2000	3000	2000	2000

Parameter	Referenzszenario	Szenario 2	Szenario 3	Szenario 4	Szenario 5	Szenario 6	Szenario 7
F_K	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5
F_{nGVO}	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,4
F_W	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ergebnisse							
$K(t)$	176	393	337	219	4	451	596
$nGVO(t)$	986	661	845	921	1244	709	243
$W(t)$	0	0	0	0	0	0	0
$P(t)$	76	100	87	81	88	97	58

Die Ergebnisse der Szenarienanalysen des Algenmodells sind in Tab. 16 dargestellt. In fast allen Szenarien stirbt der Wildtyp aus. Bei erniedrigter kinetischer Ratenkonstante k_4 für das Wachstum des nGVO nimmt die Population der Konkurrenzart gegenüber dem Referenzszenario zu, und die Population des nGVO nimmt auf das Niveau der Konkurrenzart ab. Die Population des Prädatoren nimmt gegenüber dem Referenzszenario leicht ab. Bei erhöhter kinetischer Ratenkonstante k_6 für das Wachstum der Konkurrenzart nimmt die Population der Konkurrenzart zu, und die Population des nGVO nimmt ab, bleibt jedoch gegenüber der Population der Konkurrenzart dominant. Die Population des Prädatoren nimmt gegenüber dem Referenzszenario leicht zu. Bei erniedrigter kinetischer Ratenkonstante k_7 für den Fraß der Konkurrenzart durch den Prädatoren nimmt die Population der Konkurrenzart gegenüber dem Referenzszenario zu, und die Population des nGVO nimmt auf das Niveau der Konkurrenzart ab. Die Population des Prädatoren nimmt gegenüber dem Referenzszenario zu. Bei erhöhtem Fitnessparameter F_K der konkurrierenden Art ähneln die Simulationsergebnisse jenen des vorhergehenden Szenarios. Bei erniedrigtem Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO breitet sich die Konkurrenzart aus und wird dominant, die Population des nGVO nimmt gegenüber dem Referenzszenario stark ab. Die Population des Prädatoren nimmt gegenüber dem Referenzszenario ab. Die Population des Wildtyps überlebt auf sehr niedrigem Niveau. Bei erhöhter ökologischer Kapazität $\ddot{O}K$ für das Wachstum des Wildtyps, des nGVO und der Konkurrenzart nimmt die Population der Konkurrenzart gegenüber dem Referenzszenario ab, und die Population des nGVO nimmt zu. Die Population des Prädatoren nimmt gegenüber dem Referenzszenario leicht zu.

Die Ergebnisse der Szenarienanalysen des Bakterien- und des Algenmodells ähneln sich. Die Auswirkungen der Änderungen der Parameter sind jedoch durch fehlende Allelopathie des nGVO im Algenmodell nicht so drastisch wie im Bakterienmodell. Gleichwohl sind für die Etablierung des nGVO in Freilandökosystemen u.a. die Fitnessparameter des nGVO und der Konkurrenzart entscheidend. Durch die Erhöhung der ökologischen Kapazität, d. h. durch Erhöhung der Nährstoffkonzentrationen, verstärkt sich der Effekt der Ausbreitung des nGVO gegenüber der Konkurrenzart, so dass letztere beinahe ausstirbt, womit ein Verlust an Biodiversität verbunden wäre. Dadurch ist eine Degradation des limnischen Systems möglich. Es gilt daher, vor Ausbringung des nGVO in Freilandssysteme im Labor oder in Mesokosmen zu prüfen, inwieweit konkurrierende Arten durch die neuen Gentechniken an *C. reinhardtii* zurückgedrängt werden. In solchen Experimenten sind daneben die Effekte der Nährstoffparameter zu untersuchen. Die Ergebnisse der Szenarienanalyse des Algenmodells sind gültig für Mikroalgen, sie können jedoch auch auf andere phototrophe Organismen mit ähnlichem Stoffwechsel wie Makroalgen übertragen werden.

Tab. 16: Ergebnisse der Szenarienanalysen des Algenmodells. Unter den Ergebnissen sind die Werte der Zustandsgrößen am stabilen stationären Punkt aufgeführt. Gegenüber dem Referenzszenario veränderte Parameter sind gelb markiert.

Parameter	Referenzszenario	Szenario 2	Szenario 3	Szenario 4	Szenario 5	Szenario 6	Szenario 7
k_1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
k_2	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
k_3	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
k_4	0,01	0,007	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
k_5	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
k_6	0,01	0,01	0,013	0,01	0,01	0,01	0,01
k_7	0,0001	0,0001	0,0001	0,00007	0,0001	0,0001	0,0001
k_8	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
$\ddot{O}K$	2000	2000	2000	2000	2000	2000	3000
F_K	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5
F_{nGVO}	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,4	0,6
F_W	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ergebnisse							
$K(t)$	304	524	465	632	625	774	131
$nGVO(t)$	870	594	669	697	625	183	1086
$W(t)$	0	0	0	0	0	4	0
$P(t)$	85	75	100	98	103	61	96

Die Ergebnisse der Szenarienanalysen des Fischmodells sind in Tab. 17 dargestellt. In allen Szenarien stirbt die Konkurrenzart aus. Bei erhöhter kinetischer Ratenkonstante k_1 des Wachstums der Beutepopulation nimmt die Population des nGVO gegenüber dem Referenzszenario zu, die Beutepopulation bleibt unverändert, und der Wildtyp stirbt wie im Referenzszenario aus. Bei erhöhter kinetischer Ratenkonstante k_3 für den Fraß der Beute durch den nGVO nehmen die Populationen der Beute und des nGVO gegenüber dem Referenzszenario leicht ab, und der Wildtyp stirbt wie im Referenzszenario aus. Bei erhöhter kinetischer Ratenkonstante k_6 für die Sterberate des nGVO nimmt die Beutepopulation der Beute gegenüber dem Referenzszenario leicht zu, und die Population des nGVO nimmt leicht ab. Die Population des Wildtyps stirbt wie im Referenzszenario aus. Bei erhöhter ökologischer Kapazität $\ddot{O}K$ für das Wachstum der Beutepopulation bleibt diese gegenüber dem Referenzszenario unverändert, und die Population des nGVO nimmt zu. Der Wildtyp stirbt aus. Bei erniedrigtem Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO in gleicher Höhe des Fitnessparameters F_W des Wildtyps nimmt die Population der Beute gegenüber dem Referenzszenario zu, und die Population des nGVO nimmt ab. Bei weiter erniedrigtem Fitnessparameter F_{nGVO} des nGVO unter der Höhe des Fitnessparameters F_W des Wildtyps nimmt die Beutepopulation gegenüber dem Referenzszenario stark zu, und die Population des nGVO nimmt stark ab. Die Population des Wildtyps bleibt auf dem Niveau der Population des nGVO erhalten.

In nahezu jedem Szenario sterben der Wildtyp und die Konkurrenzart aus, nur bei sehr geringer Fitness des nGVO im Vergleich zum Wildtyp erhält sich eine Wildtyppopulation neben einer Population des nGVO. Es ist jedoch fraglich, ob eine geringe Fitness des nGVO Ziel der durch die neuen Gentechniken hervorgerufenen Eigenschaftenänderungen sein könnte, da dadurch z. B. in Aquakulturen unerwünschte Verluste entstehen würden. Somit ist Szenario 7

sehr unwahrscheinlich. Das bedeutet, dass durch Ausbringung des nGVO sehr wahrscheinlich ein Verlust an Biodiversität, ein Aussterben der Bachforelle, erfolgen würde, der zu einer Degradation des limnischen Systems führen könnte. Von Freilandexperimenten mit einem nGVO von *O. mykiss* sollte Abstand genommen werden, zumal durch das Migrationsverhalten dieser Art mit einer sehr schnellen unwiederbringlichen Ausbreitung des nGVO und einem damit verbundenen Artenverlust (Aussterben der einheimischen Bachforelle) zu rechnen ist.

Tab. 17: Ergebnisse der Szenarienanalysen des Fischmodells. Unter den Ergebnissen sind die Werte der Zustandsgrößen am stabilen stationären Punkt aufgeführt. Gegenüber dem Referenzszenario veränderte Parameter sind gelb markiert.

Parameter	Referenzszenario	Szenario 2	Szenario 3	Szenario 4	Szenario 5	Szenario 6	Szenario 7
k_1	0,015	0,02	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
k_2	0,000015	0,000015	0,000015	0,000015	0,000015	0,000015	0,000015
k_3	0,000015	0,000015	0,00002	0,000015	0,000015	0,000015	0,000015
k_4	0,000015	0,000015	0,000015	0,000015	0,000015	0,000015	0,000015
k_5	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
k_6	0,02	0,02	0,02	0,025	0,02	0,02	0,02
k_7	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
k_8	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
ÖK	2000	2000	2000	2000	3000	2000	2000
F_K	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
F_{nGVO}	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,4
F_W	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ergebnisse							
$B(t)$	889	889	667	1111	889	1333	1600
$K(t)$	0	0	0	0	0	0	0
$nGVO(t)$	926	1235	833	741	1173	667	200
$W(t)$	0	0	0	0	0	0	240

2.4.6 Schlussfolgerungen der Modellergebnisse für ein künftiges Monitoring von nGVO

Nach den Modellen zu urteilen, kann die Ausbringung der nGVO ins Freiland teilweise gravierende Folgen für den jeweiligen Wildtyp und die konkurrierenden Arten und somit für das gesamte aquatische Ökosystem haben. Die Populationen der Prädatoren und der Beutearten werden in den Referenzszenarien im Vergleich hierzu weniger beeinflusst. Gleichwohl sind die Auswirkungen auf die betroffenen Ökosysteme erheblich und deren Stabilität gefährdet.

Die Ergebnisse der Sensitivitätsanalysen zeigen teilweise große lokale Sensitivitäten der vier Modelle gegenüber Änderungen der Parameter auf. Aus den Ergebnissen der Szenarienanalysen wird weiterhin deutlich, dass bei Ausbringung eines nGVO das gesamte Nahrungsnetz von Beute-, Konkurrenz- und Prädatorenarten von den Auswirkungen betroffen ist. Für eine Erfassung des ökologischen Zustandes der betroffenen Gewässer aus Sicht der WRRL ist es daher wichtig, dass ein künftiges Monitoring nicht nur die Abundanzen der nGVO-Populationen erfasst, sondern darüber hinaus weiterhin wie im etablierten Monitoring alle Arten der aquatischen Lebensräume überwacht und quantifiziert werden. So kann eine ökologische Gesamtbewertung der Effekte der Ausbringung eines nGVO erfolgen, und die prognostizierten Auswirkungen können gegebenenfalls verifiziert werden. Die hohen Sensitivitäten der Modelle

bezüglich der ökologischen Kapazität weisen darauf hin, dass neben den aquatischen Organismen wie im etablierten Monitoring auch physikochemische Begleitparameter wie Nährstoffkonzentrationen und Lichtverhältnisse (Algen) erfasst werden müssen. In allen Modellen hatte die Fitness des nGVO im Vergleich zum Wildtyp und zur Konkurrenzart eine entscheidende Rolle. Je höher die Fitness des nGVO im Vergleich zur Fitness des Wildtyps und der Konkurrenzart ist, desto eher erfolgt eine Etablierung des nGVO auf Kosten des Wildtyps und der Konkurrenzart. Insbesondere das Zurückdrängen von Konkurrenzarten kann zu einem Verlust an Biodiversität und somit zu einer Degradation des jeweiligen aquatischen Ökosystems führen. Ein künftiges Monitoring sollte daher nicht allein mit neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden auf genetische Marker fokussieren, darüber hinaus ist es sinnvoll, morphologische Abweichungen und eventuell physiologische und Verhaltensänderungen des nGVO gegenüber dem Wildtyp zu dokumentieren, welche die Fitness des nGVO fördern oder beeinträchtigen.

Ein Sonderfall ist eine Mutation bei *A. gambiae*, welche sterile Männchen bewirkt. Dadurch bleibt die Fitness des nGVO unbeeinflusst, die Vermehrungsrate des nGVO liegt jedoch bei null. Das Aussterben des Wildtyps und des nGVO erfolgt in der betreffenden Simulation in wenigen Wochen. Daher muss die zeitliche Frequenz des Monitorings in diesem Fall anfänglich sehr hoch sein. Da die Konkurrenzart sich infolge des Aussterbens von *A. gambiae* stark vermehrt, ist es weiterhin notwendig, auch *A. coluzzii* und potentielle weitere konkurrierende Arten in das Monitoring einzubeziehen.

Die zeitlichen Dynamiken der Populationen sind in den Referenzszenarien sehr schnell. Ein künftiges Monitoring sollte daher zeitlich hochauflösend sein und neben den nGVO insbesondere dessen konkurrierende Arten und den jeweiligen Wildtyp erfassen. Hierfür sind neuartige molekularbiologische Nachweismethoden geeignet, jedoch können zur Minimierung der logistischen und finanziellen Kosten beim Monitoring mobiler Arten mit weiträumiger Verteilung andere Methoden wie Fernerkundung, bildgebende Verfahren sowie der Einsatz von Bürgerwissenschaftler*innen hinzugezogen werden. Da die stationären Punkte in den Referenzszenarien teilweise nur langsam erreicht werden, ist ein langfristig angelegtes Monitoring erforderlich. Das betrifft insbesondere Wirbeltiere wie die hier als Beispielart verwendete Regenbogenforelle (*O. mykiss*), da diese eine lange Generationszeit haben.

Aktuell ist weder eine Kalibrierung noch Validierung der Modelle möglich. Dies kann erst geschehen, sobald Daten aus Experimenten vorliegen. CFD-Modellierungen wären eine Option für die Ausbreitung von Mikroalgen / Bakterien und könnten zukünftig für die Modellierung der Ausbreitung herangezogen werden.

Zusammenfassend sollte ein künftiges nGVO-Monitoring breit angelegt sein, die ökologischen Rahmenbedingungen erfassen und auf mehreren Methoden basieren, welche nicht nur genetische und molekulare Parameter erfassen. In den nachfolgenden Kapiteln wird gezeigt, dass die Monitoringprogramme der Bundesländer nach WRRL als etablierte Verfahren am ehesten geeignet sind, nGVO im Freiland zu erfassen. Weiterhin werden qPCR und Barcoding als geeignete neuartige molekularbiologische Nachweismethoden zur Erfassung von nGVO herausgestellt. Ein künftiges Monitoring von nGVO in limnischen Systemen kann von einer Einbindung dieser neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden in die Monitoringprogramme nach WRRL profitieren.

3 Übersicht zu bestehenden Messsystemen

3.1 Methodik

3.1.1 Implementierte Monitoringprogramme in aquatischen Systemen

Es wurde eine Recherche von bereits implementierten Beobachtungsinstrumenten der von der Einbringung von nGVO betroffenen aquatischen Systeme durchgeführt. Hierfür erfolgte eine Recherche im Internet zum einen über eine Suchmaschine und zum anderen über die Heimatseiten von Landes- und Bundesumweltbehörden. Neben dem klassischen Gewässermonitoring wurden andere Messsysteme, wie sie in Kläranlagen und Wasserversorgungseinrichtungen zum Einsatz kommen, berücksichtigt. Es wurden Beobachtungsparameter, die verwendeten Methoden sowie die zeitlichen und räumlichen Rahmenbedingungen beschrieben.

3.1.2 Relevanz bestehender Monitoringprogramme für ein nGVO-Monitoring

Für die Bewertung der bestehenden Monitoringprogramme, bezüglich der Verwendung für ein Monitoring der Umweltwirkungen der Beispiellarten, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Die Beurteilung der Eignung der Monitoringprogramme wurde anhand folgender Kriterien vorgenommen (Hering et al., 2018):

- Repräsentativität,
- Sensitivität,
- Genauigkeit,
- Vergleichbarkeit,
- Kosteneffizienz und
- Umweltrelevanz.

Für die Einschätzung und Bewertung wurde ein Punktesystem herangezogen. Jedes Monitoringprogramm wurde anhand einer Skala von ein bis fünf Punkten bezüglich jedes Kriteriums bewertet. Diese Skala orientierte sich an der fünfstufigen Bewertung der Gewässergüte gemäß der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL). Eine feinstufigere Bewertung wurde verworfen, da kleine Unterschiede der Eignung bezüglich eines Kriteriums subjektiv nur sehr schwer erfasst und dokumentiert werden können. Fünf Punkte entsprechen einer guten Eignung gemäß eines Kriteriums, ein Punkt entspricht einer sehr geringen Eignung bezüglich eines Kriteriums.

3.1.2.1 Repräsentativität

Das Kriterium Repräsentativität basiert auf der zeitlichen Frequenz und der räumlichen Auflösung der Monitoringprogramme. Für eine hohe Bewertung ist eine saisonale Erfassung mit räumlich gleichmäßig und dicht verteilten Monitoringstationen notwendig.

3.1.2.2 Sensitivität

Das Kriterium Sensitivität beinhaltet Nachweis- und Bestimmungsgrenzen einzelner Monitoringparameter. Bei Monitoringprogrammen, die z. B. organische Schadstoffe überwachen, sind die beiden Grenzen sehr niedrig, so dass ein Nachweis oder eine quantitative Bestimmung erschwert ist. In diesem Fall erfolgte eine Bewertung mit einer geringen Punktzahl. Das Kriterium Genauigkeit ist dem Kriterium Sensitivität sehr ähnlich. Ersteres ist z. B. durch die Streuung der Messwerte um ein zentrales Lagemaß zu bestimmen. Bei einer hohen Anzahl von

Replikaten (Proben) liegt eine höhere Genauigkeit im Sinne einer höheren Zuverlässigkeit vor als bei einer geringen Anzahl von Replikaten. Weiterhin wurden die Genauigkeiten der Analysemethoden bewertet.

3.1.2.3 Vergleichbarkeit

Das Kriterium Vergleichbarkeit beschreibt, inwieweit die Monitoringprogramme standardisiert und in einen nationalen oder internationalen Kontext eingebunden sind. So wurden Monitoringprogramme nach WRRL oder anderer EU-Richtlinien mit einer hohen Punktzahl bewertet.

3.1.2.4 Kosteneffizienz

Kosteneffizienz beschreibt den potentiellen Erkenntnisgewinn bezüglich der Ausbreitung von nGVO im Verhältnis zu finanziellen und logistischen Kosten. Eine hohe Kosteneffizienz wurde mit einer hohen Punktzahl bewertet.

3.1.2.5 Umweltrelevanz

Unter dem Kriterium Umweltrelevanz wurde die Bedeutung der Monitoringprogramme für die Erfassung von kausalen Zusammenhängen und Expositionspfaden von nGVO verstanden. Infolgedessen erhielten Monitoringprogramme, welche biotische Parameter überwachen, höhere Punktzahlen als Verfahren, die nur abiotische Parameter erfassen. Bei Letzteren erhielten Monitoringprogramme, die z. B. Nährstoffparameter überwachen, eine höhere Punktzahl als Verfahren, die nur Schadstoffe messen, da Nährstoffe die ökologische Kapazität wesentlich bestimmen. Die ökologische Kapazität wurde als sehr sensibler Parameter bezüglich der Etablierung von nGVO erkannt.

Es wurde bei den Bewertungen systematisch zwischen Monitoringprogrammen, die biotische Parameter erfassen und anderen, die keine biotischen Parameter erfassen, unterschieden, da die Überwachung von Organismen und Organismengruppen für ein nGVO-Monitoring essentiell ist. Monitoringprogramme, die sich noch in der konzeptionellen Entwicklung befinden, wurden nicht bewertet, da hierbei unklar war, welche Parameter auf welche Weise erfasst werden.

Abschließend wurde für jedes Monitoringprogramm eine gewichtete Summe der Punktzahlen berechnet. Die Kriterien Sensitivität und Genauigkeit erhielten ein niedriges Gewicht von 0,5, da diese beiden Kriterien einander sehr ähnlich sind und eine inhaltliche Überlagerung vorliegt. Das Kriterium Umweltrelevanz erhielt ein hohes Gewicht von 2,0, da die Expositionspfade und kausalen Zusammenhänge bei der Ausbringung von nGVO im Fokus dieser Studie stehen. Die anderen drei Kriterien erhielten jeweils ein Gewicht von 1,0. Die Monitoringprogramme wurden gemäß der gewichteten Summe in absteigender Reihenfolge sortiert (siehe Anhang, Tab. 22). Monitoringprogramme mit einer hohen Gesamtpunktzahl sind für ein künftiges nGVO-Monitoring als besser geeignet einzustufen, als solche Verfahren mit einer niedrigen Gesamtpunktzahl.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Internationale Vorgaben und Monitoringprogramme

In der Bundesrepublik Deutschland befinden sich eine Reihe von grenzübergreifenden Gewässern, deren Bewirtschaftung durch internationale Zusammenschlüsse geregelt werden. Diese Zusammenschlüsse werden als Flussgebietskommissionen bezeichnet. Die Kommissionen führen

verschiedene Messungen durch, auf deren Grundlage sie Maßnahmen und Bewirtschaftungspläne für das jeweilige Gewässer erarbeiten. Die Monitoringprogramme orientieren sich dabei weitestgehend an den Vorgaben der europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL, siehe Abschnitt 3.2.2 Europäische Richtlinien), gehen aber teilweise auch darüber hinaus (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz, 2022). Internationale Flusskommissionen, in denen die Bundesrepublik Deutschland Mitglied ist, werden in Tab. 18 dargestellt.

Tab. 18: Auflistung der Internationalen Flussgebietskommissionen mit einer Beteiligung der Bundesrepublik Deutschland. Dargestellt werden die Bezeichnung der Flusskommission, das Gründungsjahr und die beteiligten Länder.

Flusskommission	Gründungs-jahr	Beteiligte Länder
Internationale Kommission zum Schutz des Rheins (IKSR)	1950	Deutschland, Schweiz, Frankreich, Luxemburg, Niederlande
Internationale Gewässerschutzkommission für den Bodensee (IGKB)	1961	Deutschland, Österreich, Schweiz
Internationale Kommissionen zum Schutz der Mosel und der Saar (IKSMS)	1962	Deutschland, Frankreich, Luxemburg
Internationale Kommission zum Schutz der Elbe (IKSE)	1990	Deutschland, Tschechische Republik
Internationale Kommission zum Schutz der Donau (IKSD)	1994	Deutschland, Bosnien und Herzegowina, Bulgarien, Kroatien, Republik Moldau, Montenegro, Österreich, Rumänien, Serbien, Slowakische Republik, Slowenien, Tschechische Republik, Ukraine, Ungarn
Internationale Kommission zum Schutz der Oder gegen Verunreinigung (IKSO)	1999	Deutschland, Polen, Tschechien
Internationale Maaskommission (IMK)	2002	Deutschland, Belgien, Niederlande, Frankreich, Luxemburg

Ein Teil der deutschen Bundesländer ist neben den bestehenden Internationalen Flusskommissionen auch an weiteren internationalen Monitoringprogrammen beteiligt.

Das Land Baden-Württemberg nimmt zum Beispiel am internationalen Programm „Rheinintensivüberwachung“ teil. Dieses Messprogramm dient als Frühwarnsystem und ist Teil des „Internationalen Warn- und Alarmplan für den Rhein“, welches zur Erfassung akuter Stoffeinträge dient. Im Rahmen des Monitoringprogrammes werden acht Messstellen am Rhein sowie die Rheinüberwachungsstation (RÜS) in Weil betrieben. In Baden-Württemberg befinden sich

drei der acht Messstationen, welche in Weil, Karlsruhe und Worms lokalisiert sind. Die Alarmüberwachung des Rheins schließt dabei die kontinuierliche Messung des pH-Werts, des Sauerstoffgehalts, der Temperatur und der elektrischen Leitfähigkeit ein. Zudem wird der Rhein durch Gaschromatographie mit Massenspektrometrie täglich auf gefährliche Stoffe untersucht. In Worms findet außerdem eine kontinuierliche Messung durch Daphnien- und Algen-Biotest statt (Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg, 2017).

Ein Teil der Bundesländer ist zudem an dem internationalen Übereinkommen der Wirtschaftskommission der Vereinten Nationen für Europa (UN ECE) beteiligt. Im Rahmen der "Konvention über den weiträumigen, grenzüberschreitenden Transport von Luftverunreinigungen" wurde dabei das „International Cooperative Programme (ICP) Waters“ ins Leben gerufen. Dabei handelt es sich um ein Monitoringprogramm zur Untersuchung der Versauerung der Oberflächengewässer durch Luftschadstoffe. In Deutschland sind die Bundesländer Baden-Württemberg, Bayern, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Sachsen und Schleswig-Holstein beteiligt, da in diesen eine Versauerung oder Gefährdung der Versauerung von Gewässern vorliegt. Das Übereinkommen besteht seit 1986 und umfasst die Untersuchung der Gewässer auf verschiedene chemische, physikalische und biologische Kenngrößen. Die chemisch-physikalische Untersuchung schließt dabei die Erfassung des pH-Werts, des Sauerstoffgehalts und der Konzentrationen verschiedener Schadstoffe (SO₄, NO₃-N, NH₄-N, Al, SPAK und weitere) ein. Das biologische Monitoring bezieht sich auf Makrozoobenthos, benthisches Diatomeen sowie die Langzeitentwicklung von Phytoplankton und Zooplankton. Die Berichterstattung erfolgt durch regelmäßig veröffentlichte, mehrjährige Ergebnisberichte (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2023h).

Das Land Bayern ist zusätzlich in dem internationalen Projekt „Danube Sediment“ involviert. An dem Projekt „Danube Sediment“ arbeiteten 14 Projektpartner aus Behörden und Forschungseinrichtungen zehn verschiedener Länder zusammen. Das Projekt war auf eine Laufzeit von drei Jahren ausgelegt und wurde zwischen 2017 und 2019 umgesetzt. Das Ziel war eine Verbesserung des Zustands der Donau in Hinblick auf das Sediment- und Wassermanagement sowie die Morphologie. Dafür wurde der Sedimenthaushalt der Donau untersucht und Methoden für ein Monitoring und einer Berechnung der Sedimentfracht durch die Donauländer zusammengetragen (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2023b).

Ein weiterer länderübergreifender Zusammenschluss, an welchem das Bundesland Bayern beteiligt ist, ist das Projekt „Eco-AlpsWater“. Im Rahmen dieses Projekts sollten konventionelle Methoden mit neuartigen, DNA-basierten Methoden zur ökologischen Bewertung eines Gewässers verglichen werden. Diese neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden basieren auf der Analyse von Umwelt-DNA (eDNA) mittels Next Generation Sequencing (NGS), wodurch eine Identifizierung der Gewässerorganismen auf Artniveau ermöglicht wird. Im Rahmen des Projekts wurde dabei eine Erfassung der Fische, Pflanzen und Bakterien alpiner Seen und Flüsse vorgenommen. Das Projekt war auf eine Laufzeit von drei Jahren ausgelegt und wurde von 2018 bis 2021 realisiert. Am Projekt „Eco-AlpsWater“ waren dabei zwölf Partner aus sechs verschiedenen Ländern beteiligt (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2023c).

Neben dem Projekt „Eco-AlpsWater“ beteiligt sich das Bundesland Bayern auch an dem „GeDNA-Projekt“. Dieses Projekt stellt einen Zusammenschluss von 15 Organisationen aus den Ländern Deutschland, Österreich und Schweiz dar. Die Laufzeit ist von 2019 bis zum Jahr 2022 angesetzt. Im Rahmen des Projekts führt die Universität Duisburg-Essen eine genetische Untersuchung silikatischer Mittelgebirgsbäche und -flüsse aus Sachsen, Nordrhein-Westfalen

und Bayern zur Erfassung des Makrozoobenthos, Phytobenthos und der Fischfauna durch (Macher, 2020).

3.2.2 Europäische Richtlinien

In der Vergangenheit wurde von der Europäischen Kommission eine Reihe von Richtlinien veranlasst, welche der Überwachung und Verbesserung der Qualität von europäischen Gewässern dienen. Diese Richtlinien sind für alle EU-Mitgliedsstaaten gültig.

Bei der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (EU-WRRL) handelt es sich um die Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments. Sie wurde im Jahr 2000 beschlossen und dient als rechtliches Instrument für einen langfristigen Schutz der europäischen Gewässer. Die WRRL schreibt eine regelmäßige Überwachung des Gewässerzustands von Oberflächengewässern und des Grundwassers vor. Die Umsetzung der WRRL ist in Bewirtschaftungszeiträume von je 6 Jahren unterteilt, wobei die Mitgliedsstaaten zur Berichterstattung am Ende eines jeden Bewirtschaftungszeitraumes verpflichtet sind. Der gegenwärtige 3. Bewirtschaftungszeitraum läuft dabei noch bis 2027. In Deutschland werden momentan 20.000 Messstellen an Oberflächengewässern sowie 7.900 Messstellen zur qualitativen und 13.000 Messstellen zur quantitativen Beurteilung des Grundwassers betrieben. Gemessen wird dabei der ökologische, chemische, physikalische und hydromorphologische Zustand des Wassers. Ein Großteil der ermittelten Daten ist öffentlich über die Bundesländer oder das Umweltbundesamt zugänglich. Spezifische Informationen können über die Abteilung Binnengewässer des Umweltbundesamtes (UBA) angefragt werden. Die Umsetzung der WRRL liegt in der Bundesrepublik bei den einzelnen Bundesländern und wird in diesem Zusammenhang im Abschnitt 3.2.3.3 mehrfach aufgegriffen (European Union, 2000).

Eine weitere europäische Richtlinie, welche ein Gewässermonitoring veranlasst, ist die EU-Badegewässerrichtlinie (Richtlinie 2006/7/EG). Das Ziel dieser Richtlinie ist die Überwachung und Verbesserung der Qualität der europäischen Badegewässer. Die europäische Badegewässerrichtlinie ist am 24. März 2006 in Kraft getreten und war von allen EU-Mitgliedsstaaten bis zum 24. März 2008 umzusetzen. Seitdem ist eine jährliche Berichterstattung über die Qualität der Badegewässer verpflichtend. Die Richtlinie schreibt ein Monitoring der Badegewässer auf intestinale Enterokokken und das Bakterium *Escherichia coli* vor. Diese zwei mikrobiologischen Indikatorparameter zeigen eine mikrobiologische Verunreinigung an und deuten damit auf das Risiko eines Auftretens von Krankheitserregern hin. Die Untersuchungen erfolgen dabei durch Messung mit Sonden vor Ort, die Detektion der Sichttiefe, des pH-Werts, der Wassertemperatur, der Sauerstoffsättigung sowie die Entnahme von Proben und anschließende Untersuchung im Labor in Hinblick auf die Bakterien- bzw. Keimzahl und die Schadstoffbelastung (Die Senatorin für Klimaschutz, Umwelt, Mobilität, Stadtentwicklung und Wohnungsbau, 2022a). Das Monitoring der Badegewässer erfolgt kurz vor Beginn der Badesaison sowie mehrmals während der Badesaison und richtet sich nach einem zuvor festgelegten Überwachungszeitplan. Die Europäische Kommission gibt dabei die Berichte von allen EU-Mitgliedstaaten in Form des sogenannten Badegewässeratlases heraus (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz, 2016).

Ergänzend zur WRRL wurde 2006 die Richtlinie 2006/118/EG vom europäischen Parlament veranlasst. Es handelt sich dabei um die EU-Grundwasserrichtlinie (GWRL), welche erstmals konkrete Schwellenwerte zur Beurteilung des guten chemischen Zustands enthält und zum Schutz des Grundwassers vor Verschmutzung und Verschlechterung dient. Die GWRL schreibt dabei ein Monitoring des chemischen Grundwasserzustandes in Hinblick auf verschiedene

Schadstoffe vor, welche ein potenzielles Risiko für Grundwasserkörper darstellen. Bei einer Überschreitung des festgelegten Schwellenwertes müssen dabei Maßnahmen zur Begrenzung des Schadstoff-Eintrags in das Grundwasser ergriffen und deren Wirksamkeit überprüft werden. Die GWRL umfasst dabei die Überwachung der Nitrat- und Ammoniumkonzentration. Durch die Ergänzung der GWRL mit der Richtlinie 2014/80/EU (RL zur Änderung von Anhang II der GWRL) wird ebenfalls eine Überwachung der Schadstoffe Nitrit, Phosphor und Phosphat vorgeschrieben. Wie die WRRL sieht auch die GWRL eine Berichterstattung in Abständen von sechs Jahren vor (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz, 2014).

Die Kommunale Abwasserrichtlinie (91/271/EWG) der EU verpflichtet die Mitgliedsstaaten zu einem Monitoring des kommunalen Abwassers. Diese Richtlinie wurde bereits im Jahre 1991 verabschiedet und hat seitdem erheblich zu einer Verbesserung der Qualität von europäischen Flüssen, Seen und Meeren beigetragen. Das erforderliche Monitoring umfasst dabei eine Untersuchung des Abwassers auf Schwebstoffe, Phosphor und Stickstoff. Momentan wird die Richtlinie überarbeitet und soll um die Untersuchung auf giftiger Mikroschadstoffe (wie z. B. Rückstände aus der Arzneimittel- und Kosmetikbranche) und ein regelmäßiges Monitoring von relevanten Gesundheitsparametern (z. B. SARS-CoV-2) erweitert werden. Die in der Überarbeitung aufgeführten Maßnahmen sollen dabei schrittweise bis 2040 umgesetzt werden. Auf nationaler Ebene wird die Kommunale Abwasserrichtlinie durch die Klärschlammverordnung ergänzt, welche Monitoringprogramme und Maßnahmen in Bezug auf den Phosphor-Gehalt im Abwasser festlegt (Europäische Union, 2022).

Eine weitere Richtlinie, welche mit dem Monitoring von Gewässern in Verbindung steht, ist die Fauna-Flora-Habitat (FFH) Richtlinie (Richtlinie 92/43/EWG). Die FFH-Richtlinie bildet zusammen mit der Vogelschutz-Richtlinie (Richtlinie 2009/147/EG) ein EU-weites Netz von Schutzgebieten, welches als Natura 2000 bezeichnet wird. In deutschen Gewässern findet dabei ein Monitoring von hier heimischen Fischen statt, die zu den FFH-Arten gezählt werden (für eine Liste der Fisch-Arten siehe Anhang II der FFH-Richtlinie). Das Monitoring umfasst dabei die Überwachung des aktuellen Verbreitungsgebiets, der Fläche und der Population einer FFH-Art und dient der Ermittlung des Erhaltungszustandes. Die FFH-Richtlinie wurde im Jahr 1992 beschlossen. Sie gilt bis heute für alle teilnehmenden EU-Mitgliedsstaaten und verpflichtet diese alle sechs Jahre zu einer Berichterstattung. Neben diesen Berichten stellt die Europäische Kommission periodisch aktualisierte Informationen in Form des sogenannten Natura-2000-Barometers zur Verfügung (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz, 2022).

3.2.3 Nationale Monitoringprogramme

Neben der den Monitoringprogrammen nach WRRL führen die Bundesländer eine Reihe von weiteren Monitoringprogrammen durch. Manche dienen dabei der Einhaltung von Gesetzen und Richtlinien, andere werden im Rahmen von Sondermessprogrammen durchgeführt. Zusätzlich dazu gibt es auch eine Reihe von Forschungsprojekten, an denen sich die Bundesländer beteiligen. Eine tabellarische Darstellung aller nationalen Monitoringprogramme befindet sich im Anhang.

Die Vergleichbarkeit der nationalen Monitoringprogramme unterscheidet sich dabei zwischen den verschiedenen Gewässertypen. Das Monitoring der Oberflächengewässer wird durch die einzelnen Bundesländer durchgeführt und basiert auf der WRRL. Seit 2014 sind die Parameter sowie die Methoden zur Überwachung dabei durch einen Anhang der WRRL vorgeschrieben,

um so eine einheitliche Probennahme und somit eine Vergleichbarkeit der Daten in ganz Europa zu ermöglichen (Umweltbundesamt, 2022c). Das systematische Monitoring gemäß der WRRL schließt dabei nur größere Fließgewässer ein. Für die Kleingewässer besteht hingegen kein national einheitliches Monitoringprogramm. Einen Ansatz für ein einheitliches Monitoring stellt dabei jedoch das Projekt „Kleingewässermonitoring“ (KgM) dar. Im Rahmen dieses Pilotprojekts wurde in den Jahren 2018 und 2019 ein deutschlandweites Kleingewässermonitoring durchgeführt. Das Monitoring diente dabei zur chemischen und biologischen Untersuchung der nationalen Kleingewässer. Im Rahmen dieses Monitorings wurden einheitliche Parameter, Methoden und Analyserichtlinien festgelegt, sodass erfolgreich vergleichbare Daten auf nationaler Ebene generiert werden konnten. Eine Fortführung des Kleingewässermonitorings wird diskutiert und könnte in Zukunft auch als national einheitliches Monitoringprogramm umgesetzt werden (Umweltbundesamt, 2022b; Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ, 2023). Die Kriterien für das Grundwassermonitoring werden hingegen durch die europäische Grundwasserrichtlinie festgesetzt, welche der WRRL zugrunde liegt und im nationalen Recht in der Grundwasserverordnung umgesetzt wird. Diese Verordnungen legen die Kriterien für die Beschreibung, Beurteilung, Einstufung und Überwachung des Grundwasserzustands fest. Diese Vereinheitlichung führt zu einer Vergleichbarkeit der nationalen Grundwassermonitoringprogramme, welche von den einzelnen Bundesländern durchgeführt werden (Umweltbundesamt, 2022a). Die Bundesländer sind ebenfalls für die Überwachung der Qualität der Badegewässer verantwortlich. Die zu untersuchenden Parameter sowie das Vorgehen und die Methoden werden dabei von der EG-Badegewässerrichtlinie 2006/7/EG festgeschrieben, so dass auch hier eine Vergleichbarkeit der Monitoringverfahren ermöglicht wird. (Umweltbundesamt, 2023). Im Fall des Abwassers wird ein kleiner Teil des Monitorings durch behördliche Untersuchungen abgedeckt, während die meisten sich im Abwasser befindlichen Stoffe durch eine Eigenüberwachung der Einleiter untersucht werden. Die zu untersuchenden Stoffe sowie die Methoden zur Probenahme, Probenbearbeitung und der Analyse werden dabei von der nationalen Abwasserverordnung (AbwV) festgesetzt (Bundesamt für Justiz, 2024).

3.2.3.1 Bundesweit

Das Bundesprogramm „Blaues Band“ wurde im Jahr 2019 beschlossen und dient der Entwicklung von Maßnahmen zur Sicherung von Lebensräumen, der Renaturierung der Bundeswasserstraßen sowie zur Schaffung attraktiver Landschaften rund um die Flüsse. Ein eigenes Monitoringprogramm wird im Rahmen des „Blauen Bands“ bisher jedoch noch nicht durchgeführt (Bundesministerium für Digitales und Verkehr (BMDV) und Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV), 2022).

Die Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) wurde im Jahr 1956 gegründet und stellt einen Zusammenschluss der Bundesrepublik Deutschland und ihrer Bundesländer dar. Die LAWA agiert länderübergreifend und beschäftigt sich dabei mit wasserwirtschaftlichen und wasserrechtlichen Themen wie dem Wasserrecht, Gewässerkunde, Gewässer- und Meereschutz, Ökologie, Hochwasserschutz, Küstenschutz, Grundwasser, Wasserversorgung, Kommunal- und Industrieabwasser, Umgang mit wassergefährdenden Stoffen und fachliche Abstimmungsprozesse mit der EU. Neben der Erarbeitung verschiedener Programme und Maßnahmen führt die LAWA auch eine Reihe von Monitoringprogrammen durch. Im letzten Jahr wurde dabei zum Beispiel das Messprogramm „LAWA Konzept Klimafolgenmonitoring Wasser“ oder eine „Systematische Überwachung von SARS-CoV-2 im Abwasser“ veranlasst. Die Berichterstattung erfolgt in Form von Publikationen und dem „Bund/Länder-

Arbeitsgemeinschaft Wasser Jahresbericht“ (Bund-/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA), 2023).

Das Projekt „KgM Kleingewässer Monitoring“ diente der Untersuchung von Kleingewässern auf das Vorhandensein von Pflanzenschutzmittel-Rückständen sowie der Auswirkung der Pestizide auf die Artenvielfalt. Neben dem Helmholtz Zentrum für Umweltforschung ist das Umweltbundesamt an dem Monitoringprojekt beteiligt gewesen. Das deutschlandweite Monitoring erfolgte in den Jahren 2018 und 2019 an über 100 kleineren Fließgewässern. An 124 Messstellen wurden über 1.000 Wasserproben, über 100 Pflanzenschutzmittel-Analyte und über 500 biologische Proben entnommen. Die Gewässer wurden dabei auf die Zusammensetzung der wirbellosen Wasserorganismen untersucht, wobei der Fokus auf pestizid-vulnerablen Arten lag. Die Fließgewässerbeschaffenheit wurde anschließend anhand des neu entwickelten Bioindikatorsystems „SPEARpesticides“ bewertet und in Qualitätsklassen gemäß der WRRL eingeteilt. Die Veröffentlichung der Ergebnisse erfolgte in Form eines Abschlussberichtes und durch eine Reihe von Publikationen (Weisner, 2022).

Im Jahr 2022 wurde das bundesweite Pilotprojekt „Systematische Überwachung von SARS-CoV-2 im Abwasser“ (ESI-CorA) für einen Corona-Nachweis im Abwasser ins Leben gerufen. Ziel dieses Projekts war dabei die Entwicklung eines abwasserbasierten COVID-19-Frühwarnsystems. Das Projekt wurde durch das Karlsruher Institut für Technologie (KIT) koordiniert und bundesweit an 20 Standorten durchgeführt. Das Monitoring erfolgte dabei in Form einer Mischwasserprobenentnahme aus dem Zulauf der Kläranlagen zweimal pro Woche und über einen Zeitraum von jeweils 24 Stunden, welche anschließend mittels PCR-Test analysiert wurde. Anhand der Ergebnisse der PCR konnte auf die Häufigkeit und Dynamik der SARS-CoV-2 Viren geschlossen werden (Karlsruher Institut für Technologie, 2022).

3.2.3.2 Bundesländerübergreifend

Neben den internationalen Flusskommissionen bestehen in Deutschland auch die sogenannten Flussgemeinschaften. Diese zehn Flussgebietseinheiten wurden zur Umsetzung der WRRL gegründet und bestehen zum Teil nur auf nationaler Ebene oder stellen den nationalen Teil einer internationalen Flussgemeinschaft dar (Schoen, 2016). Neben der Umsetzung der WRRL und der EG-Hochwasserrisikomanagementrichtlinie veranlassen die Flussgemeinschaften darüber hinaus teilweise auch unabhängige Monitoringprogramme (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz, 2022). Eine Auflistung der in Deutschland bestehenden Flussgemeinschaften ist in Tab. 19 gegeben.

Tab. 19: Auflistung der deutschen Flussgebietsgemeinschaften. Dargestellt werden die Bezeichnung der Flussgemeinschaft, die räumliche Ebene und die beteiligten Bundesländer.

Flussgebietsgemeinschaft	Ebene	Beteiligte Bundesländer
Flussgebietsgemeinschaft Donau	International	Baden-Württemberg, Bayern
Flussgebietsgemeinschaft Eider	International	Schleswig-Holstein
Flussgebietsgemeinschaft Elbe	International	Bayern, Berlin, Brandenburg, Hamburg, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Schleswig-Holstein, Thüringen
Flussgebietseinheit Ems	International	Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Niederlande

Flussgebietsgemeinschaft	Ebene	Beteiligte Bundesländer
Flussgebietsgemeinschaft Maas	International	Nordrhein-Westfalen
Flussgebietseinheit Oder	International	Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen
Flussgebietsgemeinschaft Rhein	International	Baden-Württemberg, Bayern, Hessen, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Saarland, Thüringen
Flussgebietsgemeinschaft Schlei/Trave	National	Mecklenburg-Vorpommern, Schleswig-Holstein
Flussgebietsgemeinschaft Warnow/Peene	National	Mecklenburg-Vorpommern
Flussgebietsgemeinschaft Weser	National	Bayern, Bremen, Hessen, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Sachsen-Anhalt, Thüringen

Eines dieser gesonderten Monitoringprogramme ist das von der Flussgebietsgemeinschaft Elbe (FGG Elbe) veranlasste „Gütemessprogramm für hydrologische Extremereignisse an der Elbe“. Dabei handelt es sich um ein für die Elbe abgestimmtes Sondermessprogramm bei Hoch- oder Niedrigwasserereignissen, welche stoffliche und hygienische Veränderungen bedingen und die Gewässerflora und –fauna beeinträchtigen können. An diesem Monitoringprogramm sind die Bundesländer Brandenburg, Hamburg, Niedersachsen, Sachsen und Sachsen-Anhalt beteiligt. Das Sondermessprogramm erfolgte zuletzt im Jahr 2019 und wird immer dann durchgeführt, wenn der Pegel der Elbe einen bestimmten Wert über 14 Tage über- bzw. unterschreitet. Das Land Sachsen nimmt die Untersuchungen dabei an der Gewässergütemessstation in Schmilka vor. Im Rahmen des Sondermonitorings werden Wasserproben im Umweltlabor der Staatlichen Betriebsgesellschaft auf Basiskenngroßen der Wasserbeschaffenheit, Haptationen, Nährstoffe, Schwermetalle, Schad- und Spurenstoffe sowie einzelne bio- bzw. bakteriologische Kenngrößen untersucht. Anhand der gewonnenen Daten werden anschließend Berichte von den Ländern erstellt und veröffentlicht (Bundesanstalt für Gewässerkunde, 2022).

Als weiteres bundesländerübergreifendes Monitoringprogramm führt die „Flutungszentrale Lausitz“ in den Ländern Sachsen und Brandenburg regelmäßig ein Monitoring der Wasserbeschaffenheit und des Flutungsstands in den Bergbaufolgeseeen durch. Das Monitoring wird dabei seit dem Jahr 2000 betrieben und dient einer wöchentlichen Abstimmung zur Bewirtschaftung der Restlöcher mit den Behörden der beiden Bundesländer (Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Klimaschutz (MLUK) des Landes Brandenburg, 2022c).

Von einigen Bundesländern wurde zudem eine Untersuchung zu „Mikroplastik in Binnengewässern Süd- und Westdeutschlands“ durchgeführt. Das Monitoringprogramm sollte dabei einen ersten Überblick über das Vorkommen von Mikroplastik in Binnengewässern ermöglichen. So wurden die Entwicklung eines standardisierten Monitoring-Konzepts zur Identifikation von Mikroplastikpartikeln, eine qualitative und quantitative Analyse von Mikroplastikpartikeln in unterschiedlichen Gewässern und die Untersuchung verschiedener Einflussgrößen auf das Vorkommen von Mikroplastik angestrebt. An dem Projekt sind dabei die Bundesländer Baden-Württemberg, Bayern, Hessen, Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz beteiligt. Die Probennahme für das Messprogramm erfolgte dabei von 2014 bis 2017 in 22 Flüssen der

Bundesländer. Um die Probennahme und Analyse einheitlich zu halten, wurden diese durch einen Projektpartner (Universität Bayreuth, Lehrstuhl Tierökologie) durchgeführt. In Baden-Württemberg wurden dabei elf Gewässer untersucht, im Land Bayern vier, in Nordrhein-Westfalen sieben und im Land Rheinland-Pfalz zwei Gewässer. Die Probennahme erfolgte an verschiedenen Messstellen (Wasseroberfläche, Wassersäule, Bodendrift, Sedimente und Kläranlagenabläufe). Die entnommenen Wasserproben wurden anschließend qualitativ und quantitativ auf Mikroplastik untersucht. Die in den Proben befindlichen Kunststoffpartikel wurden anschließend mittels Fourier-Transform-Infrarotspektrometer analysiert und in Hinblick auf ihre Konzentration, vorhandene Größenfraktionen, Polymersorten und Formen charakterisiert. Die Veröffentlichung der Daten erfolgte in Form eines Ergebnisberichts, eine Zusammenfassung des Projekts liegt in Form eines Länderberichts öffentlich zugänglich vor (Ecologic Institut gemeinnützige GmbH, 2022).

Das Monitoringprogramm „Orientierende Untersuchungen zur Mikroplastikkontamination in Fließgewässern Thüringens am Beispiel der Saale“ stellt eine Pilotstudie zur Mikroplastikbelastung in Thüringer Fließgewässern dar. Diese Studie entstand dabei aus einem Zusammenschluss der fünf Bundesländer Baden-Württemberg, Bayern, Hessen, Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz, welche zwischen 2014 und 2017 Untersuchungsprogramme in unterschiedlichen Fließgewässern initiierten. Die Monitoringprogramme dienten dazu einen ersten Überblick über das Vorkommen von Mikroplastik in Binnengewässern zu erhalten. In Thüringen erfolgte das Monitoring in zwei Probennahme-Kampagnen, welche im November 2018 und im April 2019 an der Saale durchgeführt wurden. Die Proben wurden dabei an vier Standorten unterhalb und oberhalb der Kläranlage Jena sowie am Kläranlagenauslauf entnommen. Die Probennahme größerer Mikroplastikpartikel erfolgte dabei mit Hilfe eines Netzes. Die Proben wurden anschließend größenfraktioniert, fotodokumentiert und mittels Attenuated Total Reflectance - Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR) analysiert. Für die Entnahme kleinerer Partikel wurde ein Pumpenstand eingesetzt und die Proben wurden enzymatisch aufgereinigt, nach der Dichte getrennt, mineralische Bestandteile entfernt und anschließend am FTIR-Mikroskop untersucht. Dabei wurden Informationen zur Kunststoffsorte, der Partikelgröße und der Form gesammelt. Die Ergebnisse wurden nach Abschluss des Projekts in Form eines Berichts publiziert (Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz, 2022).

Die Bundesländer Baden-Württemberg, Bayern, Hessen und Rheinland-Pfalz führen zusammen ein gewässerökologisches Klimafolgenmonitoring durch. Das Klimafolgenmonitoring erfolgt dabei seit dem Jahr 2018 und legt seinen Schwerpunkt auf die Untersuchung von möglichst naturnahen Gewässern. In Fließgewässern ist das Monitoring so konzipiert, dass es der Erfassung von Fischen und Makrozoobenthos als biologische Qualitätskomponenten sowie der Messung der Wassertemperatur, der Basischemie des Gewässers und des Abflusses dient. Zusätzlich dazu wird ein Seennessnetz betrieben, welches mit Datenloggern zur kontinuierlichen Messung der Temperatur und des Sauerstoffs in wichtigen Tiefenzonen ausgestattet ist und es findet an den Messstationen ein Monitoring wichtiger chemisch-physikalischer und biologischer Parameter statt. Des Weiteren wird der Einsatz von Fernerkundungsmethoden zur Ergänzung der in situ-Monitoringverfahren getestet. Das Klimafolgenmonitoring schließt zudem die Entwicklung von sogenannten Klimaindikatoren ein, welche in Zukunft zur Beurteilung der Folgen des Klimawandels genutzt werden sollen (Arbeitskreis KLIWA, 2023).

In den Jahren 2018 und 2019 schlossen sich die Bundesländer Berlin, Brandenburg, Sachsen und Sachsen-Anhalt, die Lausitz Energie Kraftwerke AG, die Lausitz Energie Bergbau AG sowie

die Lausitzer und Mitteldeutschen Bergbau-Verwaltungsgesellschaft mbH zusammen um die Auswirkungen des Niedrigwassers auf die Schwarze Elster, Spree und Lausitzer Neiße zu analysieren. Die Evaluation erfolgte dabei auf der Grundlage der Daten aus Pegelmessungen, Niederschlagsstationen und Gütemessstellen Auswirkungen des Niedrigwassers (Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Klimaschutz (MLUK) des Landes Brandenburg, 2022c).

Das Land Bayern setzte zudem gemeinsam mit der Universität Duisburg-Essen das Projekt „Vergleich klassisches Bestimmungsverfahren vs. genetische Verfahren für die Bewertung von Makrozoobenthos“ um. Dieses Projekt wurde von 2019 bis 2020 umgesetzt und beschäftigte sich mit der Verwendung von Hochdurchsatzsequenzierung zu Erfassung des Makrozoobenthos eines Gewässers (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2023i).

Die Bundesländer Berlin und Brandenburg beschlossen 2022 die “Strategie zum Umgang mit anthropogenen Spurenstoffen aus Kläranlagen”. Diese Strategie soll der Reduzierung von Einträgen umwelt- und gesundheitsrelevanter chemischer Substanzen aus Großkläranlagen dienen. Für eine Zustandsbewertung der Spurenstoffkonzentration werden dabei die Daten aus Monitoringprogrammen der Senatsverwaltung für Mobilität, Verkehr, Klimaschutz und Umwelt (SenUMVK), des Landesamts für Umwelt (LfU) und der Berliner Wasserbetriebe (BWB) verwendet. Der Abschluss der Maßnahme ist für das Jahr 2024 angesetzt. (Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Klimaschutz (MLUK) des Landes Brandenburg, 2022a)

Verschiedene Behörden, Universitäten oder Unternehmen der Bundesländer sind zudem an einer Reihe von länderübergreifenden Verbundprojekten beteiligt. Diese werden im Folgenden aufgeführt.

Das Helmholtz Zentrum für Umweltforschung hat sich im Rahmen des Verbundprojekts „Erfassung der Wasserqualität und Wasserflächenausdehnung von Binnengewässern durch Fernerkundung“ (BIGFE) mit dem Institut für Hygiene und Umwelt, dem Institut für Seenforschung, der Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg und dem Sächsischen Landesamts für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie zusammengeschlossen. Zudem wird es im Zuge der Copernicus-Initiative, dem Erdbeobachtungsprogramm der Europäischen Union, vom Bundesministerium für Verkehr und digitale Infrastruktur gefördert. Bei diesem Projekt handelt es sich um ein Leuchtturmprojekt, welches sich mit der Etablierung eines Erdbeobachtungssatelliten-gestützten Gewässermonitorings der deutschen Binnengewässer befasst. Die Fernerkundungsdaten sollen dabei zukünftig in konventionelle Monitoringmaßnahmen integriert werden. Das Projekt ist im Juli 2021 gestartet und ist auf eine Laufzeit von drei Jahren ausgelegt. Im Rahmen des BIGFE-Projekts werden Fernerkundungsdaten mit Hilfe der Sentinel-Satelliten des europäischen Copernicus-Programms gesammelt und anschließend mit den Datensätzen der Gewässeruntersuchungen aus zwölf Bundesländern verglichen. Anhand der Satelliten-gestützten Untersuchung lassen sich dabei Aussagen zur Wasserqualität und Wasserflächenausdehnung treffen. Die Informationen werden dabei je nach Typ täglich bis wöchentlich bereitgestellt (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH, 2023).

Unter dem Projekttitel „Bootgestütztes Messsystem für die Erfassung longitudinaler Gewässerprofile der Morphometrie, Wasserqualität und Hydrologie als Teil eines integrierten Gewässermonitorings“ wurde das sogenannte BOOT-Monitoring entwickelt, welches der Überwachung der Wasserqualität von Kleingewässern dienen soll. Dieses Verbundprojekt ist dabei Teil der vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Maßnahme „Regionales Wasserressourcen-Management für den nachhaltigen Gewässerschutz in Deutschland“ (ReWaM). An dem Projekt sind die Technische Universität Dresden, die AMC-

Analytik & Messtechnik GmbH, das Institut für ökologische Forschung und Planung GmbH, das Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, das Staatliches Amt für Landwirtschaft und Umwelt Mecklenburger Seenplatte und die Universität Rostock beteiligt. Der Zeitraum des Projekts lag zwischen dem 01.06.2015 und dem 31.05.2018. Räumlich beschränkte sich das Monitoring auf die Freiburger Mulde in Sachsen und die Tollense in Mecklenburg-Vorpommern, welche als Modellregionen für Mittelgebirgs- beziehungsweise für Tieflandflüsse dienten. Die Freiburger Mulde weist dabei eine hohe Fließgeschwindigkeit und teilweise sehr geringe Wassertiefen auf, die Tollense eine geringe Fließgeschwindigkeit und gleichmäßige Wasserstände. Durch verschiedene Trägersysteme und einen modularen Aufbau der Messeinheit können Fließgewässer auch bei niedrigen Wasserständen oder starker Verkrautung befahren werden. Das BOOT-Monitoring baut dabei auf einer Boot-gestützten Sensortechnik auf, welche eine kontinuierliche Messung entlang der Längsachse eines Gewässers ermöglicht. Neben verschiedenen Sensoren kann das Messboot auch nasschemische Online-Analysatoren oder einen Schleppverband mit Einzelstahlecholot mitführen. Die gesammelten Messdaten werden zudem durch numerische Modelle sowie Satelliten-, Luftbild- und Drohnen-gestützte Fernerkennungsdaten ergänzt. Das BOOT-Monitoring schließt die Erfassung des ökologischen und chemischen Zustands sowie der Morphometrie und Hydrologie von Gewässern ein. So werden unter anderem die Sauerstoff- und Nährstoffkonzentration, die lokale Belastungssituation, die Flusssohle und Gewässertiefe, die Querschnittsgeometrie, das Fließverhalten, das Gewässerumfeld und der Längsverlauf untersucht. Im Rahmen einer Kooperation mit dem Projekt RiverView ist eine Befahrung weiterer Modellregionen geplant. Die Ergebnisse des BOOT-Monitorings wurden in Form von Publikationen veröffentlicht und auf wissenschaftlichen Tagungen sowie im Museum der Westlausitz vorgestellt. Das Messprinzip selbst ist dabei auf eine Nachnutzung ausgelegt (Technische Universität Dresden, 2016).

Das Verbundprojekt zur „Untersuchung der Wechselbeziehungen von toxinbildenden Cyanobakterien und Wasserqualität in Talsperren unter Berücksichtigung sich verändernder Umweltbedingungen und Ableitung einer nachhaltigen Bewirtschaftungsstrategie“ (CYAQUATA) ist ebenfalls Teil der Maßnahme ReWaM. Am Projekt beteiligt sind dabei die Technische Universität Dresden, die Cyano Biotech GmbH, das Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie und das Umweltbundesamt. Das Ziel des Verbundprojekts war die Erfassung von Schlüsselfaktoren für die Entwicklung von Cyanobakterien und ihrer Toxine sowie den Auswirkungen auf die Qualität des Trinkwassers. Des Weiteren sollte ein Monitoringprogramm zur Überwachung des Cyanobakterien-Aufkommens entwickelt werden. Das Projekt wurde dabei vom 01.06.2015 bis zum 31.05.2018 an vier sächsischen Talsperren durchgeführt. Die Talsperren in Saidenbach, Neunzehnhain, Gottleuba, Quitzdorf weisen alle eine unterschiedliche Trophie und Nutzung auf und dienten im Rahmen des Projekts als Modellregionen. Mittels FluoroProbe-Sonde zur in situ-Messung sowie der Durchflusszytometrie erfolgte dabei die Detektion von Cyanobakterien in den Gewässern. Durch die PCR wurde zudem das genetische Potenzial der Cyanobakterien zur Toxinbildung untersucht. Die Ergebnisse des Projekts wurden in Form eines Abschlussberichts veröffentlicht (Technische Universität Dresden, 2020).

Das Verbundprojekt „Hygienisch relevante Mikroorganismen und Krankheitserreger in multifunktionalen Gewässern und Wasserkreisläufen – Nachhaltiges Management unterschiedlicher Gewässertypen Deutschlands“ (FLUSSHYGIENE) gehört ebenfalls zur ReWaM-Maßnahme. An dem Projekt arbeiteten dabei das Kompetenzzentrum Wasser Berlin GmbH, das

Bayerische Landesamt für Umwelt, die Berliner Wasserbetriebe, die Bundesanstalt für Gewässerkunde, das Dr. Schumacher – Ingenieurbüro für Wasser und Umwelt, die inter 3 GmbH, das IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH, der Ruhrverband, die Planungsabteilung der Stadt Essen, das Umweltbundesamt und die Universität zu Köln zusammen. Das Ziel des Projekts war die Entwicklung eines Monitoringprogrammes zur Überwachung des Mikroorganismen-Vorkommens in Badegewässern. Dieses soll anschließend als Frühwarnsystem fungieren. Die Laufzeit des Projekts war vom 01.06.2015 bis zum 31.05.2018. Die Untersuchungen erfolgten dabei an Modellregionen verschiedener Gewässertypen mit unterschiedlicher Gewässerstruktur, Gewässergüte und Nutzungsart: Dem Spree-Havel System in Berlin, der Isar und Ilz in Bayern, dem Rhein und der Mosel in Rheinland-Pfalz sowie der Ruhr in Nordrhein-Westfalen. Für das Monitoring wurden an Badestellen oder Uferfiltrationsstandorten Proben entnommen und auf physikalisch-chemischer Parameter, mikrobielle Indikatororganismen und Krankheitserreger (Viren, Bakterien, Parasiten) untersucht. Die Untersuchungen der biologischen Parameter erfolgten dabei durch Konzentrationsmessungen oder DNA-basierte Analytik. Die Ergebnisse wurden in Form eines Abschlussberichts und in einer Reihe von Publikationen veröffentlicht. Zusätzlich dazu wurden der „Leitfaden zur Bewirtschaftung kurzzeitiger Verschmutzungen“ sowie eine „Checkliste zur Eröffnung neuer Flussbadegewässer“ herausgegebenen (Kompetenzzentrum Wasser Berlin, 2022).

Ebenfalls im Rahmen der ReWaM-Maßnahme wurde das Projekt „GroundCare“ umgesetzt, an welchem das Helmholtz Zentrum München, das Bayerische Landesamt für Umwelt, die BGD ECOSAX GmbH, die DVGW-Forschungsstelle Technische Universität Hamburg-Harburg, das DVGW-Technologiezentrum Wasser, die GELSENWASSER AG, das Institut für Grundwasserökologie IGÖ GmbH, die Justus-Liebig-Universität Gießen, die Limco International GmbH und die Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH beteiligt waren. Im Rahmen des Projekts sollten neuartige Methoden für eine Erfassung des ökologischen Zustands von Grundwasser entwickelt, validiert und standardisiert werden. Im Zeitraum vom 01.06.2015 bis zum 31.05.2018 wurden dabei sieben Modellregionen untersucht. Dazu gehörten das Wasserwerk Lechaue, das Wasserwerk der Berliner Wasserbetriebe, das Wasserwerk Mergentheimer Straße, die Halterner Sande, das Fuhrberger Feld, der Altlastenstandort Coschütz/Gittersee sowie die der Deponie- und Altlastenstandort Stürmlinger Sandgrube zusammen. Die Entnahme von Proben erfolgte mit einem neu entwickelten druckhaltenden Probenahmesystem sowie mit Netzsammlern. Zur Bewertung der mikrobiologischen Gewässerqualität wurde das B-A-E-Konzept entwickelt, welches auf einer Quantifizierung der mikrobiologischen Kenngrößen der Gesamtzellzahl (Biomasse), des intrazellulären ATP (Aktivität) und des assimilierbaren organischen Kohlenstoff (Energie) basiert. Für die faunistischen Erfassungen der Grundwasserbeschaffenheit wurde ein Ansatz auf der Grundlage von sensitiven Indikatorgrößen sowie von DNA-Barcoding-Protokollen zur taxonomischen Klassifizierung entwickelt. Zusätzlich dazu erfolgte die Erstellung einer ersten Sequenzdatenbank für ausgewählte Grundwassermetazoen. Die Veröffentlichung der im Rahmen des Verbundprojekts gewonnenen Daten erfolgte in Form eines Abschlussberichtes (Regionales Wasserressourcen-Management für den nachhaltigen Gewässerschutz in Deutschland, 2023a).

Das Projekt zu den „Auswirkungen hydromorphologischer Veränderungen von Seeufern (Bodensee) auf den Feststoffhaushalt, submerse Makrophyten und Makrozoobenthos-Biozöosen mit dem Ziel der Optimierung von Mitigationsstrategien“ (HyMoBioStrategie) ist ebenfalls Teil der ReWaM-Maßnahme. Zu den Projektpartnern zählen dabei die Universität Konstanz, das Landesamt für Denkmalpflege Baden-Württemberg im Regierungspräsidium Stuttgart,

das Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, die Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg sowie die Lana Plan GbR. Das Verbundprojekt wurde dabei zwischen dem 01.04.2015 und dem 31.03.2018 durchgeführt und diente der Untersuchung von Veränderungen in der Uferzone des Bodensees. Die Messungen beschränkten sich dabei auf sechs ausgewählte Untersuchungsgebiete des nördlichen Ufers des Bodensee-Obersees mit unterschiedlichen Eigenschaften. Im Rahmen des Projekts fand dabei ein Monitoring zu den Auswirkungen von anthropogenen Veränderungen auf Wellen und Strömungen, den Feststoffhaushalt und die Unterwasservegetation der Uferzone statt. Zusätzlich dazu wurde die Unterwasserfauna der Uferzone anhand der beiden biotischen Indikatoren Makrophyten und Makrozoobenthos gemäß der WRRL bewertet und mit naturnahen Uferabschnitten verglichen. Die Ergebnisse des Verbundforschungsprojekts HyMoBioStrategie wurden in Form des Sammelbands "Seeufer: Wellen – Erosion – Schutz – Renaturierung: Handlungsempfehlungen für den Gewässerschutz: Ergebnisse aus dem ReWaM-Verbundprojekt HyMoBioStrategie (2015-2018)" veröffentlicht (Universität Konstanz, 2023).

Im Rahmen der Forschungsinitiative „Modular Observation Solutions for Earth Systems“ (MOSES) wurde die Testkampagne „Elbe 2020“ durchgeführt. Das System MOSES dient dabei der Untersuchung der langfristigen Auswirkungen von hydro-meteorologischen Extremereignisse sowie der Einträge von Nähr- und Schadstoffen auf die Ökosysteme und Gewässerqualität der Elbe und der angrenzenden Nordseeküste. Das mobile und modular einsatzfähige Beobachtungssystem MOSES wurde dabei zwischen 2017 und 2022 von neun Forschungszentren der Helmholtz-Gemeinschaft entwickelt. An der Testkampagne „Elbe 2020“ waren neben dem Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung auch das Alfred-Wegener-Institut, das Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung, das GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel und das Helmholtz-Zentrum Geesthacht beteiligt. Die Kampagne wurde von August bis September 2020 durchgeführt und war in drei Teilabschnitte der Elbe zwischen Schmilka und Cuxhaven unterteilt. Mit Forschungsschiffen wurden Wassertemperatur und Sauerstoffkonzentration, Konzentrationen von Nährstoffen und Schwermetallen sowie die Biomasse des Phytoplanktons erfasst. Um den Einfluss des Nordseewassers vom Elbwasser unterscheiden zu können wurden an einer festen Messstation zusätzlich durchgängige Messungen des Tidenzyklus vorgenommen. Die erfassten Daten des MOSES-Systems werden dabei regelmäßig auf der Website veröffentlicht (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH, 2020; Weber et al., 2022).

Das Verbundprojekt „Maßnahmen für einen nachhaltigeren Umgang mit Pestiziden und deren Transformationsprodukten im Regionalen Wassermanagement“ (MUTReWa) ist ebenfalls Teil der ReWaM-Maßnahme. An dem Projekt beteiligten sich dabei die Leuphana Universität Lüneburg, die Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, die Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, das Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein, die Flintbek GFN GmbH, die Gesellschaft für Freilandökologie und Naturschutzplanung, die Stadt Freiburg, die Gemeinde Eichstetten am Kaiserstuhl sowie die WWL Umweltplanung und Geoinformatik GbR. Das Projekt schließt eine Erfassung der aktuellen Pestizid-Belastungen regionaler Gewässer und deren ökotoxikologischen Auswirkungen sowie eine Entwicklung geeigneter Gegenmaßnahmen ein. Das MUTReWa-Projekt wurde von 01.04.2015 bis 31.03.2018 in verschiedenen Modellregionen umgesetzt. Zu diesen Regionen zählten ein Gebiet des Mühlbachs, welches durch Intensivlandwirtschaft mit Sonderkulturen und hoher Dominanz einer Monokultur geprägt ist sowie ein Gebiet des Kielstaus mit Drainagen und laterale Abflüsse aus landwirtschaftlich intensiv genutzten Flächen. Um das Umweltverhalten von Pestiziden in

Oberflächengewässern zu erfassen, wurden die photo- und biologische Abbaubarkeit, die Stoffeigenschaften die Toxizität, Mutagenität und die Auswirkungen auf heimische Makrophyten untersucht. Für diese Untersuchungen wurden dabei eine Kombination aus Photoabbau- und Bioabbau-Versuchen mit stoffspezifischer Analytik, ein modifizierter Leuchtbakterientest und ein UmuC-Test zur Bestimmung der Gentoxizität verwendet. Eine Veröffentlichung der Ergebnisse und Empfehlungen für die Regionale Wasserwirtschaft erfolgte in Form eines Abschlussberichts und einer Broschüre (Regionales Wasserressourcen-Management für den nachhaltigen Gewässerschutz in Deutschland, 2023b).

An dem Projekt „River Ecosystem Service Index“ (RESI) der ReWaM-Maßnahme waren das Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, das Institut für ökologische Forschung und Planung GmbH, die Bundesanstalt für Gewässerkunde, die DHI-WASY GmbH, das Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ, das Karlsruher Institut für Technologie Auen-Institut, die Katholische Universität Eichstätt-Ingolstadt Aueninstitut Neuburg, die Leibniz-Universität Hannover, die ÖKON Gesellschaft für Landschaftsökologie Gewässerbiologie und Umweltplanung GmbH und die Technische Universität Berlin beteiligt. Das Projekt erfolgte im Zeitraum vom 01.06.2015 bis zum 31.05.2018. Räumlich beschränken sich die Untersuchungen auf die Bayerische Donau zwischen Neuburg und Deggendorf, den Oberrhein zwischen Basel und Mainz, die Mittelelbe zwischen Torgau und Magdeburg, das Havel-Spree-Einzugsgebiet und das Wupper-Einzugsgebiet. Das Projekt diente dabei der Entwicklung einer integrativen ökologisch-ökonomischen Bewertungsgrundlage für den Zustand von Gewässern. Dafür wurden die exemplarischen Gewässerabschnitte in Hinblick auf ihre Ökosystemdienstleistung untersucht und bewertet. Die Ergebnisse des Projekts werden in Form von Berichten und dem „RESI – Anwendungshandbuch“ zu Verfügung gestellt (Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, 2023).

Das Projekt RiverView stellt ein „Gewässerzustandsbezogenes Monitoring und Management“ dar, welches im Rahmen der ReWaM-Maßnahme entwickelt wurde. An dem Projekt arbeiten dabei das Forschungsinstitut für Wasser- und Abfallwirtschaft an der RWTH Aachen e.V., das DBM – Dr. Backup, die EvoLogics GmbH, die GEO-DV GmbH Ingenieurbüro für Datenmanagement und Vermessung, die SEBA Hydrometrie GmbH & Co. KG und die Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen zusammen. Das Ziel des Projekts war die Entwicklung eines ferngesteuerten Trägerboots zur Durchführung eines gewässerzustandsbezogenen Monitorings. Die Umsetzung des Projekts erfolgte vom 01.06.2015 bis zum 31.05.2018 an den Gewässern des Wasserverbands Eifel-Rur (Rur, Inde, Wurm) sowie der Emscher-Genossenschaft/Lippeverband (Lippe, Emscher und Nebengewässer) in Nordrhein-Westfalen. Das Monitoringprogramm umfasst dabei die Untersuchung der Gewässertopographie, der Hydraulik, der Vegetation, Uferstrukturen und Bauwerke sowie der Gewässergüte in Bezug auf Wassertemperatur, Sauerstoffgehalt, Sauerstoffsättigung, Trübung, elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert, Redoxpotential und suspendierte Stoffe. Das System RiverView setzt sich hierfür aus verschiedenen Elementen zusammen. Das Element RiverBoat stellt einen ferngesteuerten und autonom operierenden Katamaran dar, welcher Gewässerdaten anhand von physikalischen und chemischen Messinstrumenten, einer INN-Sonde, eines Sonars sowie einer Bild- und Positionierungssensorik aufzeichnet. Das Element RiverDetect setzt sich aus Sensoren zusammen, welche fest oder modular im RiverBoat integriert sind und kontinuierliche Messungen der Gewässergüteüberwachung durchführen. Das Element RiverScan dient der objektiven Aufnahme des Gewässerumfelds durch ein Panoramakamerasystem. Das Element RiverAdmin fungiert als Geo-Datenbankmanagementsystem zur Verwaltung der generierten Daten. Über

das Element RiverWorks wird der öffentliche Zugriff der Daten über das Webportal und die RiverApp ermöglicht.

Nach dem Abschluss des Verbundprojekts erfolgte dabei die Entwicklung und Realisierung eines Geschäftsmodells sowie die Umsetzung von einer Reihe von Projekten. Im Rahmen einer Kooperation mit dem BOOT-Monitoring ist zudem eine Befahrung weiterer Modellregionen geplant (Forschungsinstitut für Wasserwirtschaft und Klimazukunft an der RWTH Aachen e. V., 2019).

3.2.3.3 Bundesländer

Baden-Württemberg

Die Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg (LUBW) führt ein Grundwassermonitoring für das Bundesland Baden-Württemberg durch, welches der Überwachung der Grundwassermenge und -beschaffenheit dient. Die Messungen erfolgen dabei über ein landesweites Grundwasserbeschaffenheitsmessnetz, das aus 1.900 Beschaffenheitsmessstellen, 2.000 Grundwasserstandsmessstellen, 150 Quellschüttungsmessstellen und 30 Lysimeter zur Erfassung der Sickerwassermenge besteht. Die Untersuchung des Grundwassers wird seit 1991 jährlich durch die LUBW vorgenommen. Die Entnahme von Grundwasserproben erfolgt dabei mit einem Netzsammler, einem Planktonnetz und einem Quellsammler und wird je nach Messnetzanforderungen in unterschiedlichen Zeitintervallen durchgeführt. Die entnommenen Proben werden anschließend auf verschiedene Parameter untersucht. Dazu zählen unter anderem faunistische Parameter, hydrochemische Feldparameter sowie natürliche und anthropogene Schadstoffe. Anhand der gewonnenen Messdaten wird die Grundwassersituation vom LUBW beurteilt und in Form des Jahresdatenkatalogs Grundwasser veröffentlicht (Regierungspräsidien Baden-Württemberg, 2022).

Neben dem Grundwassermonitoring führt das Bundesland auch ein Monitoring der Oberflächengewässerqualität durch. Ziel dieses Monitoringprogrammes nach WRRL ist eine Überwachung des Gewässerzustandes. Das Gewässermonitoring besteht in Baden-Württemberg seit 1974, wobei manche Parameter kontinuierlich und andere durch eine Probennahme in regelmäßigen Abständen erfasst werden. Die Messung biologischer Qualitätskomponenten erfolgt über das Landesüberwachungsnetz Biologie. Dieses setzt sich aus 14 Untersuchungsstellen für Phytoplankton, ca. 550 Untersuchungsstellen für Makrophyten und Phytobenthos, ca. 900 Untersuchungsstellen für Makrozoobenthos und ca. 430 Untersuchungsstellen für Fische zusammen. Das chemisch-physikalische Gewässermonitoring ist in verschiedene Messnetze unterteilt. Das Landesüberwachungsnetz besteht aus 16 Messstationen mit ständiger Probennahme, etwa 140 weitere Messstellen mit monatlicher Einzelprobennahme und dient der chemischen Zustandsüberwachung nach WRRL. Auf internationaler Ebene werden zudem die sogenannten BG-Messstellen betrieben, auf nationaler Ebene die TBG-Messstellen, regional die WKR-Messstellen und lokal sogenannte WKL-Messstellen. Zudem existiert noch eine Reihe von Referenzmessstellen. Neben den festen Messstellen betreibt das Land Baden-Württemberg ein Online-Messnetz. Dieses setzt sich aus 26 Messstationen an Rhein, Neckar, Donau und großen Nebenflüssen zusammen und führt eine kontinuierliche Messung der Temperatur, der Sauerstoffkonzentration, der Leitfähigkeit, des pH-Werts und der Trübung durch. Die Messdaten werden stündlich bereitgestellt und sollen dazu dienen kritische Gewässerzustände innerhalb kürzester Zeit zu erfassen (Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg, 2022).

Des Weiteren wird in Baden-Württemberg das „Sondermessprogramm Spurenstoffe“ durchgeführt. Dieses dient der Untersuchung der Oberflächengewässer in Hinblick auf Rückstände von Arzneimitteln, Röntgenkontrastmitteln, Flammenschutzmitteln oder perfluorierte Tenside (PFT). Die LUBW arbeitet dabei kontinuierlich an der Entwicklung neuer Monitoringprogramme zur Überwachung der Schadstoff-Belastung der Oberflächengewässer (Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg, 2022).

Das Land Baden-Württemberg ist zudem an dem Verbundprojekt „Satellitendaten für das behördliche Gewässermonitoring von Trübung und Chlorophyll“ (WasMon-CT) beteiligt. In dem Verbundprojekt arbeitete das LUBW zugehörigen Instituts für Seenforschung (ISF) mit der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) zusammen. Das Projekt wurde zwischen dem 01.07.2015 und dem 30.04.2018 umgesetzt und basierte auf dem Copernicus-Programm (siehe Verbundprojekte). Das Ziel des Projekts war die Implementierung eines satellitengestützten Gewässermonitorings in bereits bestehende Messprogramme. Das Projekt beschränkte sich dabei auf Teile des Rheins und der Elbe, die Nordseeästuare sowie die größeren stehenden Gewässer Baden-Württembergs. Im Rahmen des Verbundforschungsprojekts konnte eine Bestimmung des Chlorophyll a-Gehalts mit Satelliten für kleine Seen erfolgen. Die Satellitenmessungen zum Chlorophyll a-Gehalt können dabei einem indikativen Gewässermonitoring dienen und bestehende Monitoringprogramme ergänzen (Bundesanstalt für Gewässerkunde, 2018).

Darauf aufbauend wurde von 2019 bis 2022 das Projekt „Satellitenbasiertes Monitoring von Seen in Baden-Württemberg“ (SAMOSEE-BW) durchgeführt. An diesem Projekt waren das ISF und das LUBW beteiligt. Das Ziel des Projekts war es, eine Ermittlung der Wasserqualität mithilfe von Satelliten zu ermöglichen, um so Fernerkundungsdaten für ein landesweites Gewässermonitoring nutzen zu können. Im Rahmen des Projekts konnte die Erfassung des Chlorophyll a-Gehalts, die Trübung und die Sichttiefe sowie die Temperatur an der Seeoberfläche erfolgen. Zudem wurden über die Satelliten Daten zur Gewässertrophie und dem Vorkommen von Cyanobakterien gesammelt. Die Etablierung der Satellitenmessung soll zukünftig das flächendeckende Monitoring der Seen in Baden-Württemberg vereinfachen (Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg, 2023).

Bayern

Das Bundesland Bayern betreibt zur Überwachung der Grundwasserqualität das „Monitoringprogramm Grundwasserbeschaffenheit“. Dieses schließt zum einen Messprogramme zur Einhaltung der Grundwasserverordnung und zum anderen die Untersuchung an verschiedenen Messnetzen ein. Zu diesen Messnetzen gehören das WRRL-Messnetz, das EUA-Messnetz und das EU-Nitratmessnetz. Das Messprogramm „Basis Chemie“ wird dabei ein- bis zweimal jährlich an allen Messstellen durchgeführt. Es schließt die Bestimmung des pH-Werts, der Leitfähigkeit, der Sauerstoffkonzentration und der Hauptionen wie Calcium, Magnesium, Natrium, Sulfat, Chlorid, Nitrat ein. Alle anderen Messprogramme werden in größeren zeitlichen Abständen unterschiedlicher Intervalle durchgeführt. An den Messstellen des WRRL-Überblicksmessnetzes, des WRRL-Operativen Messnetzes und des EUA-Messnetzes wird alle zwei Jahre zudem eine Untersuchung des Grundwassers auf eine Belastung mit Metallen vorgenommen. Die Messungen zu Pflanzenschutzmitteln finden alle ein bis zwei Jahre statt, die Messungen zum Vorhandensein von flüchtigen organischen Kohlenwasserstoffen (VOC) und polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) erfolgen je nach potentieller Belastung jährlich. Diese Untersuchungen finden jedoch nur an den WRRL-Messnetzen statt. Zusätzlich zum grundlegenden Monitoring führt das Land Bayern zeitlich begrenzte Sonderuntersuchungen durch. In der

Vergangenheit wurden dabei bereits Sondermessprogramme zur Untersuchung des Grundwassers auf Chrom, Trifluoressigsäure, Poly- und Perfluoralkylsubstanzen oder Tierarzneimittel umgesetzt (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2023f).

Zusätzlich zum Grundwassermonitoring führt das Land Bayern eine Überwachung der Oberflächengewässerqualität durch. Für die Überwachung der Gewässerbeschaffenheit von Bayerischen Seen werden das Referenzmessnetz, das Überblicksmessnetz, das operative Messnetz, das Landesmessnetz Radioaktivität, das Landesmessnetz Versauerung, das Landesmessnetz Tagebauseen und das Landesmessnetz Klimafolgen betrieben. An diesen Messnetzen wird ein biologisches Monitoringprogramm betrieben, welches die Seen auf Phytoplankton (Qualitativ, Quantitativ, Chlorophyll a), Makrophyten und Phytobenthos, Fische, Makrozoobenthos und Zooplankton untersucht. Des Weiteren erfolgt ein chemisches Monitoringprogramm zur Untersuchung der Gewässer auf physikalische Kenngrößen und chemische Stoffkonzentrationen sowie anorganische oder organische Schadstoffe, wie beispielsweise Metalle oder Pflanzenschutzmittel. Sonstige Monitoringprogramme sind zum Beispiel die Untersuchungen zur Radioaktivität oder zur Versauerung sowie ein Klimafolgenmonitoring. Diese Untersuchungen werden jedoch nur an den spezifischen Messnetzen vorgenommen (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2023e). Zusätzlich zum Monitoring der Seen wird die Gewässerqualität der Bayrischen Fließgewässer überwacht. Das Monitoringprogramm zu den Fließgewässern setzt sich dabei aus dem Überblicksüberwachungsnetz, dem Messnetz zur operativen Überwachung, den Klimafolgen- und Referenzmessstellen, dem Messnetz des Gewässerkundlichen Dienstes, dem Messnetz Versauerung und automatischen Messstationen zusammen. Die Messnetze dienen der Erfassung verschiedener Parameter, wie zum Beispiel der biologischen Qualitätskomponenten Makrozoobenthos, Fische, Phytoplankton, Makrophyten und Phytobenthos. Zudem werden allgemeine physikalisch-chemische Parameter im Wasser, in den Schwebstoffen und in Biota analysiert. Dazu gehört die Erfassung der Wassertemperatur, der Sauerstoffkonzentration und der Nährstoffparameter Stickstoff und Phosphor. Des Weiteren wird eine Untersuchung der Schadstoffchemie und Hydromorphologie durchgeführt. Die Daten aus den Gewässermonitoringprogrammen werden in Form verschiedener Berichte ausgearbeitet. Dazu zählt der jährliche Gewässerkundliche Bericht, die Internationalen Berichte in Zusammenarbeit mit der Republik Österreich, die Gewässerkundlichen Jahrbücher und Sonderberichte bei außergewöhnlichen Witterungsverhältnissen mit wasserwirtschaftlicher Relevanz. Zusätzlich sind alle Messdaten sowie detaillierte Informationen zu den Messstellen über die Website des Gewässerkundlichen Dienstes öffentlich zugänglich (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2023d).

Des Weiteren führt das Bundesland ein Monitoring von Badegewässern auf Blaualgentoxine durch (Höller, 2022).

Neben einer Überwachung des Grundwassers und der Oberflächengewässer setzt das Land Bayern auch eine systematische Überwachung des Abwassers von kommunalen Kläranlagen und Industriebetrieben um. Das Abwassermonitoring setzt sich aus der staatlichen Überwachung und der Eigenüberwachung zusammen. Durch die Behörde erfolgen dabei die technische Kontrolle der Abwasseranlage und eine Untersuchung zur Einhaltung der wasserrechtlichen Anforderungen, für welche eine Probennahme mit anschließender Analytik vorgenommen wird. Des Weiteren werden die direkten Auswirkungen des eingeleiteten Abwassers auf die Gewässerqualität untersucht. Die Eigenüberwachung der Betriebe erfolgt dabei auf der Grundlage der Eigenüberwachungs-Verordnung sowie des vom Land Bayern verabschiedeten

„Programms zur Bestimmung des Fremdwasseranteils nach dem gleitenden Minimum“ (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2023g).

Das Land Bayern betreibt zudem ein Monitoring der Gewässerqualität im Rahmen der „Alarmpläne Gewässerökologie Bayern“. Diese setzen sich aus dem „Alarmplan Main – Gewässerökologie“, „Alarmplan bayerischer staugeregelter Main Gewässerökologie (AMÖ)“ und dem „Alarmplan bayerische Donau Gewässerökologie (ADÖ)“ zusammen. Das Monitoring findet an verschiedenen Messstationen statt und dient der frühzeitigen Erkennung kritischer ökologischer Verhältnisse. Die Alarmpläne schließen die Erfassung von physikalisch-chemischen, hydrologischen und biologischen Messparametern ein. Die Gewässer werden dabei auf ihre Wassertemperatur, den Sauerstoffgehalt, den pH-Wert, die Leitfähigkeit, Nitrat-Stickstoff ($\text{NO}_3\text{--N}$) und ortho-Phosphat-Phosphor ($\text{o-PO}_4\text{--P}$) untersucht. Zudem findet die Bestimmung des Abflusses und der Trübung sowie ein Monitoring zum Chlorophyll a und zum Makrozoobenthos statt (Bayerische Staatskanzlei, 2022).

Zusätzlich dazu führt das Land Bayern ein eigenes Versauerungsmonitoring durch. Dieses dient der Erfassung des Einflusses von Emissionen aus Industrie, Verkehr und Landwirtschaft auf die Umweltkompartimente Boden, Wasser und Luft sowie daraus resultierende Folgen für Flora und Fauna. Neben der Überwachung der biologischen Qualitätskomponenten Diatomeen und Makrozoobenthos finden Untersuchungen zu verschiedenen chemischen Parametern im Niederschlag, im Sickerwasser, im Grundwasser, in Quellen, in Fließgewässern sowie in Seen statt. Diese dienen der Erfassung des pH-Werts, der Leitfähigkeit und der Temperatur sowie der Messung der Konzentrationen einer Reihe von Schadstoffen. In Gebieten des Bayerischen Wald, des Fichtelgebirges und des Hochspessart, die besonders von der Versauerung betroffen sind, erfolgt zusätzlich eine umfassendere Untersuchung durch ein integriertes Hydrologisches Monitoring (IHM) (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2023a).

Berlin

Das Bundesland Berlin betreibt ein Grundwassergütemessnetz, welches zur Beurteilung der Grundwasserbeschaffenheit dient. Durch das Monitoring der Grundwasserqualität soll zum einen die Wasserversorgung langfristig sichergestellt werden. Zum anderen dient es zur Einhaltung der WRRL sowie zur Umsetzung des Grundsatzes des Grundwasserschutzes, welcher im Wasserhaushaltsgesetz und im Berliner Wassergesetz verankert ist. Das Grundwassergütemessnetz Berlins existiert seit 1995 und besteht aus 250 Messstellen. Die Analyse der Grundwasserbeschaffenheit erfolgt in der Regel zweimal jährlich in Form des Routinemessprogramms, die Häufigkeit kann sich jedoch durch naturräumliche oder zeitliche Verhältnisse ändern. Das Monitoringprogramm nach WRRL kann durch Sondermessprogramme ergänzt werden, welche zum Beispiel der Überwachung von laufenden Baumaßnahmen oder Gefahren durch Altlastenstandorte dienen. Das Monitoring erfolgt durch die Entnahme von Grundwasserproben in bis zu 300 m Tiefe und eine anschließende Untersuchung dieser Proben im Landeslabor. Bei der Untersuchung werden allgemeine Kenngrößen (z. B. pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit), Summenkenngrößen (z. B. adsorbierbare organische Halogenverbindungen), Hauptanionen und -kationen (z. B. Chlorid, Sulfat, Nitrat), Schwermetalle und Spurenelemente (z. B. Arsen, Cadmium), organische Spurenstoffe (z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) und mikrobiologische Parameter (z. B. Koloniezahl) bestimmt. Die Veröffentlichung der gewonnenen Daten zur Grundwasserbeschaffenheit erfolgt in Form von Kartenwerken über die Website des Bundeslands (Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz, 2022c, 2022b).

Zusätzlich zur Überwachung des Grundwassers vollzieht das Bundesland Berlin ein Monitoring der Oberflächengewässergüte. Diese systematische Überwachung der Gewässerqualität erfolgt seit 50 Jahren. Verschiedene Parameter werden dabei kontinuierlich, monatlich oder bei Bedarf überprüft. Das Monitoring der Oberflächengewässergüte unterteilt sich in verschiedene Monitoringprogramme. Das Grundmessprogramm umfasst 70 Messstellen, an denen umfangreiche physikalisch-chemische und mikrobiologisch-hygienische Untersuchungen durchgeführt werden. Zusätzlich erfolgt die Entnahme von Wasserproben an Stichprobenmessstellen. Diese Proben werden anschließend im Labor auf verschiedene chemische Parameter (Nährstoffe, Metalle, organische Spurenstoffe) und mikrobiologisch-hygienische Parameter untersucht. Bei Bedarf können im Rahmen des Erweiterungsmessprogramms problemorientierte, vertiefende Messungen an ausgewählten Messstellen durchgeführt werden. Zusätzlich zu dem Grund- und Erweiterungsmessprogramm führt das Bundesland Berlin das Eutrophierungsmessprogramm, welches trophierelevante biologische Merkmale an wenigen ausgewählten Messstellen untersucht. Die Messung organischer und anorganischer Spurenelemente erfolgt dabei in Stichproben 13- bzw. 26-mal im Jahr und dient der Erfassung der toxikologischen und ökotoxikologischen Belastungssituation. Des Weiteren ermittelt das Bundesland stoßartige Einträge an elf kontinuierlich arbeitenden Messstationen, welche mit Hilfe von Sonden verschiedene Parameter (wie zum Beispiel Sauerstoff, Temperatur) untersuchen. Letztere werden an drei Messstationen durch kontinuierliche Probensammler betrieben. Diese untersuchen spezielle organische und anorganische Rückstände, welche der integralen Erfassung der Gewässerbelastung durch Nährstoffe und andere Substanzen dienen (Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz, 2021c). Die Veröffentlichung der Ergebnisse des Oberflächengewässer-Monitorings erfolgt dabei über das Wasserportal Berlin (Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz, 2023a).

Da die Hauptfließgewässer Berlins alle rückgestaut und extrem langsam fließend sind, reagieren diese deutlich empfindlicher gegenüber Nährstoffeinträgen. Daher überwacht das Bundesland Berlin die Wasserqualität besonders in Hinblick auf die biologische Gewässergüte. Auf der Grundlage des Vorschlags der LAWA zur "Güteklassifikation von rückgestauten planktondominierten Fließgewässern" wurde eine Einstufung der Berliner Hauptfließgewässer in Güteklassen anhand der mittleren Chlorophyll a-Gehalte vorgenommen (Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz, 2021a).

Zusätzlich dazu wird auch ein Monitoring der chemisch-physikalischen Gewässergüte durchgeführt. Anhand der Messung von chemisch-physikalischen Parametern wie Temperatur, Sauerstoffgehalt, organischem Kohlenstoff, Ammonium, Nitrit, Nitrat, Chlorid, Sulfat, Halogenen und Phosphor werden die Wasserbeschaffenheit der Berliner Fließgewässer bewertet und die Daten in Form von Gewässergütekarten veröffentlicht (Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz, 2021b).

Die Messung der Wasserstände und der Durchflüsse in den oberirdischen Gewässern ist eng mit dem Monitoring der Berliner Oberflächenwassergüte verknüpft. Nach dem Berliner Wassergesetz muss dabei eine Überwachung der Wasserstände, Fließgeschwindigkeiten und Durchflüsse erfolgen. Dafür wird vom Land Berlin ein Messnetz betrieben, dass anhand von Latten- und Stechpegeln, selbstregistrierenden Pegeln sowie Radar- und Ultraschallmessaanlagen kontinuierliche Messungen durchführen (Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz, 2023b).

Zur Untersuchung der Wasserqualität des Rummelsburger Sees betreibt das Bundesland Berlin ein gesondertes Monitoring. Durch vergangene industrielle Nutzung ist der Rummelsburger

See mit Schadstoffen wie Schwermetallen, PAKs und Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW) belastet. Anhand verschiedener Gutachten sowie durch das Forschungsprojekt RuBuS (Rummelsburger See) wird dabei das aktuelle Ausmaß der Schadstoffbelastung und Ökotoxizität der Sedimente in der Rummelsburger Bucht bestimmt. Die Erstellung von Gutachten erfolgt dabei seit 2011, das Forschungsprojekt RuBuS lief von November 2013 bis November 2015. Bei diesem Forschungsprojekt wurde ein indirekter Messansatz verwendet, um eine Sedimentremobilisierung zu untersuchen. Dieser Messansatz bezieht sich dabei auf Leitindikatoren, da die Mobilisierung des Sediments nur schwer erfassbar ist. Im Rahmen des Projekts wurden dabei an 15 Bohr- bzw. Messpunkten kontinuierliche Messungen durchgeführt und Proben entnommen. Die Schadstoffe wurden an fünf Schichten der obersten 15 cm des Gewässersediments und über akkumuliertes Material in Sedimentfallen erfasst. Das potenzielle Risiko wurde anhand des Consensus 2 - Werts der Sedimentqualitätsrichtlinien nach (de Deckere et al., 2011) ermittelt und durch Elutionsversuche sowie ökotoxikologische Tests ergänzt (Bölscher et al., 2017). Die Daten aus dem RuBuS-Projekt wurden im neusten Gutachten „Expositionsanalyse zur gesundheitlichen Risikobewertung der Sedimentbelastung im Rummelsburger See“ (Fraunhofer Institut, 2019) aufgegriffen. Zusätzlich wurde ein analytisches Screening der Schadstoff-Konzentrationen in der Luft über dem See durchgeführt. Dafür erfolgte zuerst eine Berechnung der Luftkonzentration durch zwei Modelle, die auf Sediment-Wasser-Luft-Verteilungsprozessen beruhen und im Anschluss ein dreitägiges Monitoring der Außenluftkonzentration von PAKs, gesättigten Kohlenwasserstoffen (KW), den Summenparameter KW C10-40 (Siedepunktverteilung) sowie weiteren aromatischen Substanzen (Hahn, Blümlein und Klein, 2019). Die Daten des Forschungsprojekts und des Gutachtens wurden jeweils in Form eines Abschlussberichtes veröffentlicht.

Brandenburg

Zur Beurteilung der hydrogeologischen Überwachung des Grundwassers, der Bewertung der Grundwasserbeschaffenheit, der Beurteilung von anthropogenen Einflüssen sowie der Erfüllung von europäischen und nationalen Berichtspflichten betreibt das Land Brandenburg das sogenannte Landesmessnetz Grundwasserbeschaffenheit. Dieses gliedert sich in unterschiedliche Messprogramme auf und besteht aus rund 1.000 Messstellen. Die untersuchten Parameter umfassen die Vor-Ort Parameter (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration, etc.), die Hauptinhaltsstoffe, Summenparameter, Metalle, Pflanzenschutzmittel, Arzneimittel, künstliche Süßstoffe sowie weitere organische Schadstoffe. Der Untersuchungsumfang ist dabei abhängig von der Zielstellung der Überwachung an der jeweiligen Messstelle, wobei die Vor-Ort-Parameter, die meisten Hauptinhaltsstoffe und die meisten Metalle an allen Messstellen analysiert werden. Die Beprobung findet überwiegend zweimal jährlich statt. Neben der Wasserbeschaffenheit betreibt das Bundesland Brandenburg auch ein Messnetz zur Überwachung des Grundwasserstandes. Die Wasserstände werden dabei teilweise täglich durch einen Datenlogger oder manuell im wöchentlichen Rhythmus erfasst (Landesamt für Umwelt Brandenburg, 2023b).

Zur Überwachung der Oberflächengewässer werden vom Land Brandenburg zwei Messnetze betrieben. Das Hydrologische Landesmessnetz besteht aus ungefähr 450 Messstellen, welche den Wasserstand und den Durchfluss der Oberflächengewässer untersuchen (Landesamt für Umwelt Brandenburg, 2022b). Die Gewässerbeschaffenheit wird auf der Grundlage von Messstellen nach der national geltenden Oberflächengewässerverordnung (OGewV) bzw. der europäischen WRRL bewertet. Die Bewertung des Zustands der Oberflächengewässer erfolgt anhand von biologischen Qualitätskomponenten (Phytoplankton, Makrophyten und

Phytobenthos, Makrozoobenthos und Fische), chemischen und physikalisch-chemischen Komponenten (Sauerstoffgehalt, Salzgehalt, Nährstoffgehalt, etc.) sowie hydromorphologischen Parametern (Landesamt für Umwelt Brandenburg, 2024). Das Messnetz wird dabei der „überblicksweisen Überwachung“, der „operativen Überwachung“ oder der „Überwachung zu Ermittlungszwecken (investigativ)“ zugewiesen. Die überblicksweise Überwachung der Oberflächengewässer besteht aus 16 Messstellen und dient der längerfristigen Erfassung des Gesamtzustandes der Oberflächengewässer, der Detektion von Veränderungen der Gewässergüte und als Grundlage für zukünftige Messprogramme. An den zugehörigen Messstellen wird dabei der größte Untersuchungsumfang betrieben und mehr Parameter untersucht als bei den Messstellen der anderen Überwachungsklassen. Das operative Messnetz dient der Untersuchung des Gewässerzustands von Oberflächengewässern, bei welchen die Bewirtschaftungsziele voraussichtlich nicht erreicht werden. Die Messstellendichte ist hierbei bei den Seen relativ hoch. Bei den Fließgewässern werden hingegen nur repräsentative Gewässer überwacht und die Ergebnisse auf andere Fließgewässer übertragen. Die investigative Überwachung wird im Gegensatz dazu für die Ermittlung der Ursachen von Verschmutzung oder Belastung sowie deren Auswirkungen eingesetzt. Zusätzlich zu den drei Gewässergüteüberwachungs-Netzwerken betreibt das Land Brandenburg ein automatisches Wassergütemessnetz (WGMN). An den Messstellen dieses Netzes werden alle zehn Minuten Messungen durchgeführt, um Auswirkungen durch Havarien oder andere Verschmutzungen zügig erkennen zu können. Des Weiteren bestehen regionale Erfolgsmessnetze, welche die Verbesserung des ökologischen Zustands durch getroffene Maßnahmen dokumentieren (Landesamt für Umwelt Brandenburg, 2022a).

Die Brandenburgische Badegewässerverordnung basiert auf der europäischen Badegewässerrichtlinie und schreibt eine Überwachung der Badegewässerqualität vor. Für diese Überwachung sind die Gesundheitsämter der Landkreise und kreisfreien Städte zuständig, welche sich an die einheitlichen europäischen Vorgaben halten müssen. Die jährliche Freigabeüberwachung wird dabei zwischen dem 01. und 14. Mai durchgeführt. Die Regelüberwachung findet anschließend vom 15. Mai bis zum 15. September statt und umfasst regelmäßige Untersuchungen der Badegewässer durch Besichtigungen, Probennahmen und Analysen von Wasserproben. Die Probennahme und -analyse findet nach europäisch genormten Referenzverfahren statt. Innerhalb der Badesaison werden die Proben dabei mindestens einmal monatlich entnommen und auf hygienische Parameter wie das Vorkommen von intestinalen Enterokokken oder *Escherichia coli* untersucht (Landesamt für Umwelt Brandenburg, 2023a).

Das Bundesland Brandenburg wurde im Dezember 2015 vom Landtag zur Entwicklung eines „Strategischen Gesamtplan zur Senkung der bergbaubedingten Stoffeinträge in die Spree und deren Zuflüsse in der Lausitz“ verpflichtet. Im Rahmen dieser Forderungen wurden verschiedene Stichtagsmessungen durchgeführt, Monitoringprogramme ausgewertet und geohydraulischen Modellierungen vorgenommen. Auf der Grundlage dieser Daten wurde anschließend ein „Bewirtschaftungserlass für Eisen und Sulfat“ ausgearbeitet. Die Veröffentlichung der Ergebnisse erfolgte im Jahr 2019 in Form eines Endberichts (Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Klimaschutz (MLUK) des Landes Brandenburg, 2022b).

Brandenburg führt zusätzlich das Monitoringprogramm „Flussgebiet Schwarze Elster“ zur Bewertung der bergbaulichen Belastungen im Einzugsgebiet der Schwarzen Elster durch. An festgelegten Messstellen werden dabei die physikalischen und chemischen Parameter Gesamteisen, Sulfat, pH-Wert untersucht. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt dabei über die

Veröffentlichung verschiedener Karten auf der Homepage des LfU (Landesamt für Umwelt Brandenburg, 2022).

Die Arbeitsgruppe "Flussgebietsbewirtschaftung Spree, Schwarze Elster und Lausitzer Neiße" führt zudem ein detailliertes Gütemonitoring zur bergbaubedingten Stoffbelastung in Fließgewässern Brandenburgs durch. Seit dem Jahr 2019 wird auf der Grundlage der Monitoringergebnisse jährlich ein "Strategiepapier zur Beherrschung bergbaubedingter Stoffbelastungen" veröffentlicht, welches zu einem weitgehend selbst regulierenden Wasserhaushalt in den Flusseinzugsgebieten führen soll. Das Messnetz wird dabei fortlaufend ausgebaut (Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Klimaschutz (MLUK) des Landes Brandenburg, 2022c).

Das Bundesland Brandenburg führt des Weiteren ein Monitoringprogramm unter dem Namen „Flussgebiet Spree“ durch. Ziel dieses Monitorings ist die Bewertung und Überwachung von Bergbaufolgen im brandenburgischen Teil der Spree. Mit Hilfe von Messsonden wird die Leitfähigkeit täglich überwacht. Anhand der Leitfähigkeit ist dabei ein Rückschluss auf die Sulfatkonzentration in der Spree möglich. Zusätzlich dazu werden in größeren Abständen chemischen und physikalischen Faktoren, wie Gesamteisen, Sulfat und pH-Wert, an verschiedenen Messstellen überwacht und biologisches Bergbaumonitoring durchgeführt. Dieses untersucht das Vorkommen von Fischen, Makrozoobenthos und Diatomeen. Die Veröffentlichung der Daten erfolgt in Form eines Monitoringberichts (Landesregierung Brandenburg, 2023).

Bremen

Das Bundesland Bremen führt regelmäßig ein Monitoringprogramm nach WRRL zur biologisch-chemischen Einstufung der Beschaffenheit der stehenden Gewässer in Bremen und Bremerhaven durch. Neben einer einmal jährlichen Untersuchung des Tiefenprofils während der sommerlichen Schichtungsphase wird zudem dreimal von Frühjahr bis Sommer das oberflächennahe Wasser untersucht. Die Messungen erfolgen dabei mit Sonden vom Boot aus sowie durch die Entnahme von Wasserproben und anschließender Untersuchung dieser Proben im Labor. Mittels der Sonden werden dabei der Sauerstoffgehalt, die Leitfähigkeit, der pH-Wert und die Temperatur ermittelt. Im Labor werden hingegen die Parameter des Nährstoffgehalts (Stickstoff und Phosphor), der Chlorophyll a-Gehalt und die Belastung durch Schwermetalle untersucht. In unregelmäßigen Abständen erfolgt eine Veröffentlichung von Berichten zum Monitoring der Gewässergüte (Thobor, 2000).

Zur Einhaltung der verschiedenen Richtlinien wird vom Land Bremen ein Grundwasser-Monitoring durchgeführt, welches die Grundwasserqualität in Bremen und Bremerhaven erfasst. Das Monitoring wird anhand eines Grundwassermessnetzes durchgeführt, welches seit 1986 besteht und aus über 150 Messstellen zusammengesetzt ist und den Grundwasserstand sowie die Grundwassergüte überwacht. Die Messung von Vor-Ort-Parametern, anorganischen Hauptelementen und organischen Summenparametern findet zweimal jährlich statt. Die Überprüfung des Grundwassers auf Schwermetalle oder eine Reihe von Kohlenwasserstoffverbindungen finden alle zwei Jahre statt. Andere Parameter werden hingegen nur alle vier Jahre gemessen. Die Veröffentlichung der Daten des Grundwassermonitorings erfolgt anhand des Grundwassergüteberichts (Die Senatorin für Klimaschutz, Umwelt, Mobilität, Stadtentwicklung und Wohnungsbau, 2022b).

Hamburg

Auch das Bundesland Hamburg betreibt ein Wassergütemessnetz zur Überwachung der Gewässerqualität. Mit diesem erfüllt das Land die Verpflichtung zur Berichterstattung der

verschiedenen Richtlinien. Das Wassergütemessnetz Hamburgs besteht seit 1988. Es setzt sich aus drei Messstationen an der Alster, drei an der Elbe und jeweils einer Station an der Tarpenbek, der Ammersbek, der Wandse und an der Bille zusammen. An den Stationen werden kontinuierliche Messungen vorgenommen und die aktuellen Messdaten dreimal täglich veröffentlicht. Das Grundmessprogramm umfasst dabei die Messung von chemisch-physikalischen Parametern mittels Sauerstoffsensoren, Trübungssensoren, pH-Messsonden und darin integrierte Thermometer und Leitfähigkeitsmesssonden. Im Falle des erweiterten Grundmessprogramms werden zusätzlich dazu Messzellen zur UV-Absorptionsmessung und Öldetektoren eingesetzt. Neben den Grundmessprogrammen führt das Land Hamburg auch ein Monitoringprogramm durch, welches einen Daphnientoxizität- und Algentoxizität-Test umfasst und als biologisches Frühwarnsystem dient. In diesem Fall wird dabei die einzellige Alge *Chlorella vulgaris* für den Algentoxizität-Test genutzt. Die aktuellen als auch die historischen Daten des Messprogramms sind über die Website des Bundeslands oder eine App öffentlich zugänglich (Institut für Hygiene und Umwelt, 2023f).

Zusätzlich zum Betrieb der Messstationen werden in Hamburg mobile Messungen zur Gewässergüte in Form von Hafenmessfahrten durchgeführt. Die Messfahrten werden seit 1997 vorgenommen, erfolgen sechsmal im Jahr und beschränken sich auf die Elbe und den Hafen Hamburgs. Das Messschiff ist dabei Teil der Hamburg Port Authority. Die durchgeführten Hafenmessfahrten dienen zur Ermittlung der Entwicklung der Sauerstoff- und Nährstoffsituation des Gewässers sowie des pflanzlichen und tierischen Planktons. Zudem werden sie zur Dokumentation der flächenhaften Ausbreitung des Sauerstofflochs, einer Sauerstoffdefizitzone durch die Planktonalgenblüte, eingesetzt. Die Messdaten aus den Hafenmessfahrten sollen in nächster Zeit im FHH-Atlas publiziert werden (Institut für Hygiene und Umwelt, 2023e).

Ein weiterer Teil des Gewässermonitorings in Hamburg ist ein Monitoringprogramm zur Bewertung des ökologischen Zustands nach WRRL. Für diesen Teil des Monitorings führt das Institut für Hygiene und Umwelt eine Analyse des Makrozoobenthos und Phytoplankton durch. Die Untersuchung erfolgt dabei mindestens siebenmal jährlich und schließt die Messung der Chlorophyll a-Konzentration und die mikroskopische Untersuchung zur Erfassung der Artenzusammensetzung, der Zellzahlen und des Biovolumens mit ein. Daraus bilden sich die zwei biologischen Kenngrößen der gewässertypspezifischen Biomasseentwicklung und des Arten-Trophieindex, anhand welcher der ökologische Gewässerzustand bewertet wird (Institut für Hygiene und Umwelt, 2023a).

Neben der Gewässerbiologie wird auch die Gewässerchemie vom Land Hamburg untersucht. Diese Monitoringprogramme werden im Fall von lokalen und aktuellen Erfordernissen durchgeführt sowie aufgrund von rechtlichen Vorgaben. Die Messungen erfolgen vor Ort, als auch durch eine Probennahme und anschließende Analyse im Labor. Zusätzlich zur chemischen Überwachung der Oberflächengewässer erfolgt auch eine Untersuchung technischer Bäder und Trinkwasserentnahmestellen nach dem Infektionsschutzgesetz (Institut für Hygiene und Umwelt, 2023b).

Ein weiterer Teil des Gewässermonitorings in Hamburg ist die Verwendung aquatischer Bio-testverfahren, anhand welcher sich die Wirkung von chemischen Substanzen auf Wasserorganismen untersuchen lassen. In Hamburg übernimmt das Institut für Hygiene und Umwelt die ökotoxikologische Untersuchung von Abwasser-, Oberflächenwasser- und Deponiesickerwasserproben. Dafür werden verschiedene akute Toxizitätstests durchgeführt, wie der Algenschnelltest, der Daphnientest, der Fischeitest und der Leuchtbakterientest. Im Falle des

Landes Hamburg werden dazu die Arten *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Danio rerio* und *Vibrio fischeri* verwendet (Institut für Hygiene und Umwelt, 2023d).

Zusätzlich zum physikalisch-chemischen und biologischen Monitoring der Hamburger Oberflächengewässern betreibt das Land ein Monitoring der Wasserqualität in Schwimmbädern und führt im Fall von Sportgroßveranstaltungen, Havarien, Fischsterben oder hydrologischen Extremereignissen Sondermessungen durch (Institut für Hygiene und Umwelt, 2023c).

Hessen

Das Hessische Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie (HLNUG) veröffentlicht regelmäßig Berichte über Messprogramme der Fließgewässer oder des Grundwassers des Landes Hessen. Dabei wurde von 1999 bis zum Jahr 2022 eine Reihe von Monitoringprogrammen der Fließgewässer durchgeführt.

Von 1999-2000 erfolgte ein Monitoring ausgewählter Gewässer zur Bewertung der Belastung von Fischen mit Umweltchemikalien. Dafür wurde ein Nachweis von lipophilen Fremdstoffen in Fischen durchgeführt und Umweltkontaminanten in hessischen Gewässern erfasst (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, 2022a).

Im Jahr 1991 wurde mit orientierenden Messungen gefährlicher Stoffe begonnen, welche bis zum Jahr 2003 andauerte. In diesem Rahmen erfolgte ein Monitoring der Fließgewässer, Abwässer und Klärschlämme auf organische Spurenstoffe.

Zur Verminderung der Belastung von Gewässern durch Schadstoffe wurden von 2001 bis 2006 Untersuchungen zum Vorhandensein gefährlicher Stoffe an Oberflächengewässern durchgeführt (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, 2022a).

Im Jahr 2008 erfolgte eine Gewässerüberwachung der Kaliindustrie. Hierbei wurde die Werra an zwei Stellen untersucht. Bei Witzleben-Blickershausen erfolgte eine kontinuierliche Messung durch eine feste Gewässergütemessstation. In Heringen-Widdershausen wurde eine Gewässergütemessstation ohne feste Einrichtung betrieben, an welcher eine monatliche Messung durchgeführt wurde. Die Messungen dienten dabei der Beurteilung der chemischen Wasserqualität (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, 2022a).

2022 wurde ein Monitoring zur „Erfassung der Einträge von Pestiziden aus Kläranlagen und Siedlungsentwässerungen in Hessen“ durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Zusammenarbeit mit dem HLNUG entstandene Masterarbeit, welche sich mit der Bewertung des Einflusses von Kläranlagenabläufen auf den Eintrag von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen in Fließgewässer beschäftigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dabei eine Entnahme und Untersuchung von Proben aus Fließgewässern und Kläranlagenabläufen im Anwendungszeitraum der Pflanzenschutzmittel durchgeführt (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, 2022a).

Zum Thema Grundwassermonitoring in Hessen sind ebenfalls eine Reihe von Berichten veröffentlicht worden. So wurde im Jahr 2005 ein „Sondermessprogramm zur Beeinflussung von oberflächennahem Grundwasser durch stark belastete kleinere Fließgewässer“ durchgeführt. Im Rahmen dieses Sondermessprogramms wurden hessische Gewässer im Hinblick auf das Vorhandensein von Arzneimittelrückständen untersucht. Dabei konnten Rückstände von Analgetika, Rheumatika, Lipidsenkern, Betablockern, Röntgenkontrastmitteln, Östrogenen (natürliche und Kontrazeptiva), Antiseptika und ein Antiepileptikum in kommunalen Kläranlagenabläufen nachgewiesen werden (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, 2022b).

Im Jahr 2010 erfolgte eine Messung der Uran-Konzentration im hessischen Grundwasser. An ausgewählten Messpunkten wurden zusätzlich die Uranisotopen-Aktivitäten bestimmt (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, 2022b).

2013 wurde das Monitoringprogramm „Geogene Hintergrundwerte der Hauptbestandteile und Spurenstoffe in hessischen Grundwässern“ durchgeführt. Hierbei wurde die Verteilung der geogenen Hintergrundwerte gelöster Inhaltsstoffe untersucht (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, 2022b).

Des Weiteren erfolgte im Jahr 2015 ein „Suspect- und Non-Target-Screening von Wasserproben mittels LC-HRMS“ im Auftrag des HLNUG. Im Rahmen dieses Projekts wurde die Kläranlageneinleitungen in Gewässer und dadurch bedingten Spurenstoffeinträgen untersucht und ein Gutachten erstellt (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, 2022b).

Im Jahr 2016 erfolgte die Bewertung der Spurenstoffeinträge in das Grundwasser durch Kläranlageneinleitungen für das Hessische Ried. Hierfür wurden kommunale Kläranlagen beprobt und das Konfliktpotential zwischen dem Grundwasserschutz und Abwassereinleitungen in oberirdische Gewässer anhand der gewonnenen Messdaten diskutiert (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, 2022b).

Mecklenburg-Vorpommern

Das Land Mecklenburg-Vorpommern führt ein Monitoringprogramm zur Überwachung der Beschaffenheit und Menge von Oberflächengewässer und des Grundwassers durch. Die Erforderlichkeit des Monitorings liegt hierbei im Wasserhaushaltsgesetz, der Oberflächengewässerverordnung, der Grundwasserverordnung und in den wasserbezogenen Richtlinien begründet. Die Überwachung der Gewässerqualität erfolgt seit 1993 und liegt den vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Verbraucherschutz M-V herausgegebenen Gewässerüberwachungserlassen zugrunde. Die Untersuchungen zur Gewässerbeschaffenheit finden je nach Parameter mehrmals im Jahr statt. Zum Monitoringprogramm gehören dabei die Überwachung der Wasserstände, der Verdunstung und Grundwasserneubildung, der biologischen Qualitätskomponenten (Fische, Makrozoobenthos, Phytoplankton, andere aquatische Flora), der Temperaturverhältnisse, des Sauerstoffhaushalts, des Salzgehalts, der Nährstoffverhältnisse, des Versauerungszustands, des Chlorophyll a-Gehalts, Vorkommen und Konzentration von Schadstoffen, der Hydromorphologie und der Bewertung der Uferstrukturen an Seen. Die Publikation der Daten erfolgt dabei alle fünf Jahre in Form eines Berichts (Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern, 2022).

Zusätzlich zum grundlegenden Gewässermonitoring führt das Land Mecklenburg-Vorpommern auch eine Überwachung der Wasserhygiene durch. Diese umfasst eine Untersuchung von Trinkwasser und Badewasser für die Gesundheitsämter. Das Trinkwassermonitoring erfolgt dabei durch eine Untersuchung auf Krankheitserreger (*Escherichia coli*, Enterokokken, coliforme Bakterien, *Clostridium perfringens*, *Legionella spec.*) und chemische Stoffe, auf den Geschmack, den Geruch und das Aussehen. Das Badewasser wird im Land Mecklenburg-Vorpommern an 500 Badestellen auf eventuelle Verunreinigungen und Algenaufkommen untersucht. Zudem finden vor Ort eine Messung der Sichttiefe des Wassers und des pH-Werts sowie die Entnahme einer Wasserprobe statt. Die Probe wird anschließend im Labor auf Bakterien untersucht (Landesamt für Gesundheit und Soziales, 2022).

Für den Müritz-Nationalpark in Mecklenburg-Vorpommern wurde ein spezielles Gewässermonitoringkonzept erstellt. Das Monitoringprogramm besteht dabei seit 2011 und wurde 2019

nochmal erweitert. Aktuell werden 35 Seen des Müritz-Nationalpark langfristig durch das Monitoringprogramm überwacht sowie eine Reihe weiterer Gewässer im Rahmen von landesweiten Monitoringprogrammen nach FFH- und WRRL. Das Monitoring umfasst dabei die Überwachung der Gewässergüte, der Erhaltungszustand der Lebensraumtypen, des Makrophyten-Bestands, des Fisch-Bestands sowie weitere Artvorkommen (u. a. Libellen, Amphibien) (Nationalparkamt Müritz, 2023).

Niedersachsen

Das Land Niedersachsen führt anhand des Gewässer-Überwachungssystems Niedersachsen (GÜN) regelmäßig ein Monitoring der Grundwasserqualität durch. Dieses dient als Grundlage für wasserwirtschaftliche Planungen und Maßnahmen, zur Einhaltung von Grundwasserschutzaufgaben und zur Umsetzung der verschiedenen Richtlinien. Die Überwachung der Wasserbeschaffenheit erfolgt über verschiedene Messnetze: Dem „Pegelmessnetz Oberflächengewässer“, „Gütemessnetz Oberflächengewässer“, „Grundwasserstandsmessnetz“, „Grundwassergütemessnetz“, die Messnetze des Deutschen Wetterdienstes (Niederschlagsmenge) und dem „Depositionsmessnetz“ (Beschaffenheit des Niederschlags). Die Messungen zur Menge und Qualität des Niederschlags, des Grundwassers, der oberirdischen Gewässer und der Küstengewässer werden täglich, wöchentlich oder monatlich vorgenommen. Die Messparameter setzen sich zusammen aus dem Wasserstand, der WRRL-Güte, der Untersuchung auf Pflanzenschutzmittel und Metabolite sowie der Versalzung. Zusätzlich finden Sonderuntersuchungen auf beispielsweise weitere Schadstoffe, radioaktive Stoffe statt. Derzeit laufen in Niedersachsen Sonderuntersuchungen zu perfluorierten Tensiden, Uran und Cadmium. Die Ergebnisse des Gewässermonitorings sind alle öffentlich zugänglich und in Publikationsreihen veröffentlicht (Niedersächsisches Ministerium für Umwelt, Energie und Klimaschutz, 2023).

Ein weiteres Sondermessprogramm des Landes Niedersachsen ist das „Niedersächsisches Sondermessprogramm zum Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien und von Antibiotikarückständen in niedersächsischen Kläranlagen und Oberflächengewässern“. Dieses Sondermessprogramm wurde vom Umweltministerium veranlasst und soll Erkenntnisse zur Belastung der Gewässer durch antibiotikaresistente Erreger, potenzielle Eintragsquellen (z. B. Kläranlagen, Landwirtschaft) bringen und einer Einschätzung der Verbreitung von Resistenzen über den Umweltpfad dienen. Das Monitoringprogramm dauerte vom Mai 2018 bis zum März 2019 und umfasste eine Entnahme von Schöpfproben an 80 Stellen in Niedersachsen. Diese Stellen setzten sich zusammen aus Standorten mit bekannter Beeinflussung durch Kläranlagen, mit hoher Viehdichte, an denen die Gewässergüte nach der Wasserrahmenrichtlinie beprobt wird, im Küstenbereich und an vermeintlich unbelasteten Standorten. Die entnommenen Proben wurden im Labor chemisch, mikrobiologisch und molekularbiologisch untersucht. Zur Detektion von Antibiotikarückständen wurden die Proben gefiltert und anschließend mittels HPLC-MS/MS (Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie) analysiert („dilute-and-shoot“). Das Vorkommen von resistenten Bakterien wurde durch ein selektives Kulturverfahren untersucht, wofür antibiotikaresistente Bakterien aus Originalproben isoliert wurden und diese anschließend zur Antibiotigrammerstellung genutzt wurden. Zusätzlich dazu erfolgte die Detektion von Resistenzgenen in der Gesamtbiomasse mittels Multiplex-PCR. Die Ergebnisse des Sondermessprogramms wurden in Form eines Abschlussberichts publiziert (Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz und Universitätsklinikums Bonn, 2019).

Aus der Forderung der EU-Kommission nach konkreten Maßnahmen zur Verbesserung des Zustandes der Natura 2000-Gebiete an der Ems heraus entstand der Masterplan Ems 2050. Neben dem Land Niedersachsen sind der Bund, die Landkreise Emsland und Leer, die Stadt Emden, die Meyer Werft und die Umweltverbände BUND, NABU und WWF an dem Projekt beteiligt. Der Masterplan Ems 2050 soll der Verbesserung der Gewässergüte und der Wiedergewinnung der Biotope an den Flussrändern dienen und wieder langfristig als Lebensraum für Tiere und Pflanzen nutzbar sein. Der Zeitraum für das Projekt ist vom 25.03.2015 bis zum 25.03.2050 festgesetzt und soll in dem Teil der Ems zwischen Emden und Dörpen realisiert werden. Der Masterplan Ems 2050 schließt ein Monitoring des Gewässerzustands ein, durch welches die Wirksamkeit umgesetzter Maßnahmen überprüft werden soll. Für die Messungen wird dabei ein bereits bestehendes Messsystem genutzt, welches von Land (Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz) und Bund (Wasserstraßen- und Schifffahrtsverwaltung des Bundes) an der Ems betrieben wird. Dieses Messsystem besteht aus zehn Messstationen mit kontinuierlicher Aufzeichnung der Gewässergüteparameter sowie zahlreichen Dauerströmungsmessgeräten. Das Monitoring schließt verschiedene Güteparameter, wie den Salzgehalt, die Temperatur, den Sauerstoffgehalt, die Flüssigschlickdynamik, das Tiefenprofil und die Strömungen ein. Zusätzlich werden die Auswirkungen der Staufälle für Schiffsüberführungen der Meyer Werft überprüft. Über die Website des Projekts wurde bereits ein Bericht zum Monitoring veröffentlicht. Des Weiteren ist eine regelmäßige Veröffentlichung des Fortschritts angedacht (Engels et al., 2020).

Nordrhein-Westfalen

Neben dem Monitoring von Oberflächengewässern und des Grundwassers nach WRRL führt das Bundesland Nordrhein-Westfalen noch eine Reihe weiterer Messverfahren durch. So erfolgt das Gewässermonitoring des Landes neben einem Netz landseitiger Messstationen auch durch das Laborschiff „MAX PRÜSS“. Dieses wird auf dem Rhein, seinen schiffbaren Nebengewässern, der Weser sowie den westdeutschen Kanälen zur Überwachung des Gewässerzustands eingesetzt. Das Laborschiff ist dabei Teil des nordrhein-westfälischen Gewässergüteüberwachungssystems. Das Schiff-gestützte Gewässermonitoring wird seit 1964 eingesetzt und an 220 Tagen im Jahr durchgeführt, wobei eine Probennahme von Wasser, Schwebstoff und Sediment im Rhythmus von vier Wochen erfolgt. Die entnommenen Proben werden anschließend im Labor des Schiffes in Hinblick auf Nährstoffe, Kohlenwasserstoffe, toxische Wasserinhaltsstoffen, den Schwermetallgehalt der Sedimente sowie die physikalische, chemische und biologische Wasserbeschaffenheit untersucht. Für diese Untersuchungen befinden sich unter anderen ein Photometer, ein Gaschromatograph, ein Mikroskop und das Equipment für einen Leuchtbakterientest an Bord. Das Laborschiff verfügt zudem über Sonden, welche eine kontinuierliche Messung der Wassertemperatur, des pH-Werts, der elektrischen Leitfähigkeit, des Sauerstoffgehalts und der Trübung durchführen. Für die Erstellung eines Längs- und Querprofils misst das Schiff dabei die Wassertemperatur in unterschiedlichen Tiefen und zeichnet Klimadaten wie Lufttemperatur, Luftfeuchtigkeit und Windgeschwindigkeit auf. Eine Darstellung des Monitoringprogramms ist auf der Website der Lands Nordrhein-Westfalen zu finden. Eine Veröffentlichung von Messdaten erfolgt bisher nicht (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, 2023a).

Zusätzlich zu den regulären Monitoringprogrammen führt das Bundesland Sondermessprogramme durch. So wurde von 2015 bis 2018 das Sondermessprogramm zu "Belastungen von Oberflächengewässern und von aktiven Grubenwassereinleitungen mit bergbaubürtigen PCB (und PCB-Ersatzstoffen)". Das Messprogramm soll dabei einer Bewertung der PCB-Belastung

(polychlorierte Biphenyle) aus dem Steinkohlebergbau dienen, welche sich aus dem Anstieg des Grubenwassers ergibt. Die Monitoringergebnisse werden dabei nach Oberflächengewässerverordnung bzw. WRRL bewertet und sind Teil des Gewässerüberwachungssystems. Im Rahmen der Sondermessungen wurden fünf verschiedene Einleitstellen der Oberflächenkörper Lippe, Emscher, Ems und Rhein untersucht. Der PCB-Gehalt wurde anhand der Konzentrationen gelösten PCBs in den Grubenwässern gemessen und anschließend mit dem PCB-Gehalt der Oberflächengewässer verglichen. Die Entnahme der Feststoffpartikel aus den Wasserproben erfolgte 2015 mittels Filtration und Zentrifugation. Beide Methoden haben sich jedoch nicht bewährt, sodass 2018 alternative Methoden getestet wurden. Von den getesteten Methoden (Schwebstoffsammelkasten, Passivsammler und Sedimentprobennahme) eignete sich der Schwebstoffsammelkasten dabei am besten. Die Ergebnisse des Sondermessprogramms wurden in Form eines öffentlich zugänglichen Berichtes publiziert (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, 2023b).

Rheinland-Pfalz

In Rheinland-Pfalz wird das Monitoring zur Überwachung des Gewässerzustands zum einen zur Einhaltung verschiedener Richtlinien und Gesetze (WRRL, europäischen Badegewässerrichtlinie, Wasserhaushaltsgesetz, Landeswassergesetz und Abwasserabgabengesetz) und zum anderen zur Umsetzung nationaler und internationaler Programme betrieben. Dazu gehören zum Beispiel das "Deutsche Untersuchungsprogramm Rhein" oder das Messprogramm der "Internationalen Kommissionen zum Schutze der Mosel und der Saar gegen Verunreinigung" (IKSMS). An den Fließ- und Stehgewässern Rheinland-Pfalz finden dabei Messungen verschiedener Parameter statt. Zum einen überwacht das Land die Niederschlagsintensität unter der Verwendung eines Ombrometers. Der Wasserstand wird in Rheinland-Pfalz mit Hilfe des Schwimmerprinzips, einer Messung mit Drucksonden oder der Radarmessung durchgeführt. Zusätzlich erfolgt die Untersuchung des Durchflusses, für welche Abflussmessungen mit dem hydrometrischen Flügel sowie Messungen mit akustischen Doppler-Strömungs-Messgeräten vorgenommen werden. Die Gewässer in Rheinland-Pfalz werden zudem auf biologische und chemische Parameter untersucht. Das biologische Monitoring erfolgt über ein festes gewässerbiologisches Messnetz, welches rund 1.170 Messstellen umfasst und die biologischen Parameter Makrozoobenthos, Fische, Makrophyten, Phytobenthos, Plankton aufzeichnet. Zusätzlich wird mindestens alle sechs Jahre eine Beprobung der Gewässer durchgeführt. Unter dem Einsatz der Wasseranalytik führt das Umweltlabor im Landesamt zudem biologische Toxizitätstests durch (Fischartest, Daphnientest, Algentest, Leuchtbakterientest). Badegewässer werden hingegen mikrobiologisch in Hinblick auf das Vorhandensein von Coli-Bakterien, Enterokokken und Cyanobakterien untersucht. Für die physikalisch-chemische Untersuchung der Gewässer betreibt das Land Rheinland-Pfalz zehn Überblicksmessstellen und 90 operative Probenahmestellen. Zusätzlich dazu werden Messungen im Rhein, der Mosel und der Saar mit dem Laborschiff MS "Burgund" durchgeführt. Dieser Teil des Monitorings betrachtet dabei allgemeine Leitparameter wie die Wassertemperatur, den pH-Wert, die elektrische Leitfähigkeit, den Sauerstoffgehalt und die Sauerstoffsättigung sowie das Vorhandensein von Nährstoffen (Ammonium, Nitrit, Nitrat, Phosphor), Mineralstoffen (Chlorid, Sulfat, Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium), Summen-Kenngrößen (BSB₅, DOC, TOC, AOX), anorganischen Spurenstoffen (z. B. Schwermetalle) und organischen Spurenstoffen. Zudem nimmt das Land Rheinland-Pfalz eine Radioaktivitätsbestimmung in den Gewässern, dem Abwasser und dem Grundwasser vor. Die Veröffentlichung der Daten erfolgt in Form von Berichten oder als Kartenmaterial (Ministerium für Umwelt, Forsten und Verbraucherschutz, 2008).

Zum Grundwassermonitoring betreibt das Bundesland Rheinland-Pfalz das „Messnetz Grundwasser“. Dabei handelt es sich um ein variables Netz aus Messstellen dreier Arten: Grundwasserstandsmessstellen, Quellschüttungsmessstellen und Lysimeter. Das Messnetz umfasst dabei 1.544 Grundwasserstandsmessstellen, von welchen an 725 wöchentlich Messungen durchgeführt werden und 208 sogar zur automatischen Messung mit Datensammlern ausgerüstet sind. Bei den Grundwassermessstellen handelt es sich um Beobachtungsrohre und Brunnen, welche den Grundwasserstand und die Grundwasserbeschaffenheit erfassen. Das Land betreibt zudem 415 Quellschüttungsmessstellen, wobei wöchentliche Messungen an 90 dieser Messstellen erfolgen. Bei diesen Messstellen handelt es sich um gefasste Quellen, welche den Wasseraustritt als Schüttung in Liter pro Sekunde aufzeichnen. Die dritte Art von Messstellen sind Lysimeter. Das Bundesland betreibt zurzeit zehn Lysimeteranlagen, welche die tägliche Sickerwasserablaufmenge erfassen und so auf die Grundwasserneubildung schließen lassen (Landesamt für Umwelt Rheinland-Pfalz, 2023).

Das Land Rheinland-Pfalz ist zudem am Monitoring der Abwassereinleitungen durch Kläranlagen oder industrielle Einrichtungen beteiligt. Im Falle des kommunalen Abwassers erfolgen dabei eine staatliche Überwachung der Abwasserbeschaffenheit sowie eine Selbstüberwachung durch den Einleiter. Die staatliche Überwachung umfasst die Messung der Temperatur und des pH-Werts vor Ort sowie eine Laboruntersuchung auf Kohlenstoff- und Nährstoffparameter. Die Selbstüberwachung schließt eine tägliche Sichtkontrolle, eine wöchentliche Reinigung und Kalibrierung von Mess- und Regelungstechnischer Einrichtung zur Zustandsüberprüfung der Kläranlage ein. Zusätzlich dazu muss eine tägliche bzw. chargenweise Kontrolle des Abwassers auf Schadstoffe und eine regelmäßige analytische Untersuchung der Abwasserbeschaffenheit erfolgen. Für die Selbstüberwachung stellt das Land Rheinland-Pfalz den Kläranlagen einen „Leitfaden Eigenüberwachung von Abwasseranlagen“ zur Verfügung. Die Überprüfung der Beschaffenheit des industriellen Abwassers setzt sich ebenfalls aus einer behördlichen Überwachung und einer betrieblichen Eigenüberwachung zusammen. Im Rahmen der behördlichen Untersuchung werden die Abwasserbeschaffenheit und der ordnungsgemäße Betrieb der Anlage überprüft. Zudem wird eine systematische Überwachung nach der europäischen Industrieemissionen-Richtlinie vorgenommen. Der Betrieb ist hingegen verpflichtet eine Überwachung des Zustands der Anlagen und ihres Kanalnetzes entsprechend des „Leitfaden Eigenüberwachung von Abwasseranlagen“ durchzuführen (Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie und Mobilität, Rheinland-Pfalz, Abt. Wasserwirtschaft und Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie und Mobilität, 2022).

Neben den verpflichtenden Monitoringprogrammen initiierte das Land Rheinland-Pfalz 1995 das auf Jahrzehnte angesetzte Programm „Aktion Blau Plus“. Das Ziel dieses Aktionsprogramms ist dabei die ökologische Wiederherstellung der Gewässer des Landes. Das Programm lässt sich dabei in vier Bereiche unterteilen: Die Entwicklung von Methoden, beispielsweise zur Gewässerstrukturkartierung oder zur ökomorphologischen Gewässerbewertung; der Bereitstellung von Daten in Form eines Gewässertypenatlas oder durch Info-Briefe; die Entwicklung von Konzepten, wie zum Beispiel des Sanierungskonzepts Selz und der Umsetzung der Maßnahmen, welche unter anderem in Form des Gewässerrandstreifenprojekts Ruwer oder des Naheprogramm erfolgte. Seit 1995 wurden dabei bereits 1.339 Renaturierungsprojekte umgesetzt. Eine regelmäßige Berichterstattung zum Programm „Aktion Blau Plus“ erfolgt durch die Veröffentlichung von Broschüren über die Website des Projekts (Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie und Mobilität und Rheinland-Pfalz, Abt. Wasserwirtschaft, 2023).

Saarland

Für den Schutz des Grundwassers betreibt das Saarland verschiedene Messnetze zur Überwachung der Grundwassermenge und –güte. Das WRRL-Messnetz besteht dabei aus 49 Messstellen und dient der Bewertung des mengenmäßigen und chemischen Grundwasserzustands nach WRRL. Das EUA-Messnetz umfasst neun Messstellen und wurde zur Einhaltung der Pflicht zur Berichterstattung an das Umweltbundesamt und der europäischen Umweltagentur eingerichtet. Das EUA-Messnetz schließt dabei das Teilmessnetz „Landwirtschaft“ mit ein. Dabei handelt es sich um das sogenannte EU-Nitratmessnetz, welche der Einhaltung der EG-Nitratrichtlinie dient. Das Rohrwasser-Messnetz des Saarlandes besteht aus 284 Förderbrunnen und 21 Quellen. An diesen wird das Grundwasser jährlich auf 32 Parameter (u. a. Nitrat, Eisen, coliforme Keime) untersucht. Das Messnetz „Grubenflutung Warndt“ führt ein chemisches Monitoring zu den Auswirkungen des Grubenwasseranstieges im Warndt durch. Dieses setzt sich aus fünf Messstellen zusammen, an welchen eine vierteljährliche Untersuchung auf 120 Parametern erfolgt. Das Emittentenmessnetz führt eine kontinuierliche Überwachung zur Erfassung der Auswirkungen von Bodenverunreinigungen, Deponien und Bergehalde auf das Grundwasser durch. Im Fall von Grundwasserschäden durch die Einleitung von Schadstoffen kann über dieses Messnetz zudem ein Sondermonitoring erfolgen. Ein weiteres Messnetz der Grundwasserüberwachung ist das Wasserstandsmessnetz. Es besteht aus 47 Messstellen, welche mittels Datenloggern eine stündliche Messung des Grundwasserstandes vornehmen (Ministerium für Umwelt, Klima, Mobilität, Agrar und Verbraucherschutz, 2019b).

Zusätzlich zur Überwachung des Grundwassers führt das Bundesland ein Monitoring der Gewässerbeschaffenheit durch. Das Monitoring schließt biologische Messprogramme, die Erstellung von Gewässergütekarten, Fischereibiologische Untersuchungen und Begutachtung von Fischsterben ein und dient der Umsetzung der WRRL, der EU-Fischgewässerrichtlinie (78/659) und der Saarländischen Fischgewässerverordnung. Das Landesmessnetz des biologischen Grundmessprogramms besteht derzeit aus 113 Messstellen, an welchen in der Regel nur das Makrozoobenthos untersucht wird. Zusätzlich dazu werden vier Überblicksmessstellen betrieben, welche eine umfassende Übersicht über die Gewässerqualität ermöglichen. Dazu kommen 38 operative Messstellen. Operative Untersuchungen werden nur an Gewässern mit schlechtem Wasserzustand durchgeführt. Um die Ergebnisse der operativen Messstellen einordnen zu können, betreibt das Saarland zusätzlich 80 Validierungsmessstellen. Neben den Grundmessprogrammen können anlassbezogene Sondermessprogramme erfolgen. In der Vergangenheit wurden zum Beispiel vertiefte Messungen zu den Sauerstoffverhältnissen an der Saar, eine Quantifizierung von Stoffströmen aus diffusen Quellen oder ein Monitoring zu der Auswirkung von Punktquellen aus Kommunen oder Industrie durchgeführt. Im Auftrag des Landes wurden von der Arbeitsgruppe Gewässer-Monitoring der Universität des Saarlandes außerdem Online-Messstationen entwickelt. Neben den festen Messstationen werden diese mobilen Online-Messstationen zur Überwachung der Gewässergüte eingesetzt. Die Messstationen erfassen mit Hilfe von Messsonden den Sauerstoffgehalt, die Wassertemperatur, den pH-Wert, die Leitfähigkeit, die Nitrat-Konzentration, die Trübung und das Redox-Potential. Die mobilen Stationen sind zudem mit online-Photometer ausgestattet, welche zur Untersuchung der Konzentrationen von Ammonium, Phosphat sowie Gesamt-Phosphor, des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) und Chlorophyll eingesetzt werden können (Ministerium für Umwelt, Klima, Mobilität, Agrar und Verbraucherschutz, 2019a).

Sachsen

Das Land Sachsen führt zur Erfassung der chemischen und physikalischen Gewässergütedaten regelmäßig ein Monitoring der Gewässer durch. Das Monitoring setzt sich dabei zusammen aus dem Wassergütemessnetz (WGMN), repräsentative Messstellen für die physikalisch-chemische und die biologische Überwachung der Gewässer und weiteren Messstellen für Ermittlungszwecke. Das Messprogramm umfasst 2.200 Messstellen, welche die Gewässerbeschaffenheit teilweise kontinuierlich überwachen oder zwölfmal jährlich beprobt werden. Das physikalisch-chemische Monitoring untersucht die Parameter Temperatur, pH-Wert und das Vorhandensein von Spurenstoffen (Industriechemikalien, Pflanzenschutzmittel, Arzneimittelwirkstoffe, Metalle). Zusätzlich dazu erfolgt auch eine biologische Untersuchung der Gewässer durch die Messung des Chlorophyll-Gehalts oder den Einsatz von Daphnien- und Algentoximetern. Die Ergebnisse der Monitorings fließen in die Erstellung verschiedener Berichte ein. Das Land Sachsen gibt dabei regelmäßig Gewässerkundliche Monatsberichte, Schnellberichte und Berichte für WRRL (alle sechs Jahre) heraus. Zudem wurde ein Bericht zu Bergbaufolgen und Gewässergüte und einer zu Spurenstoffen in sächsischen Gewässern veröffentlicht (Öffentlichkeitsarbeit, 2023).

Das Land Sachsen betreibt zudem eine Reihe von Messnetzen, welche die Oberflächengewässer und das Grundwasser überwachen. Das gewässerkundliche Pegelnetz misst dabei kontinuierlich die Pegelstände der sächsischen Fließgewässer (Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, 2022). Für eine Überwachung des Grundwassers wird das „Landesmessnetz Grundwasser“ eingesetzt. Dieses besteht aus 1.500 Messstellen und unterteilt sich in das Messnetz Grundwasserstand und das Messnetz Grundwasserbeschaffenheit. Das Messnetz Grundwasserstand dient der Erfassung der Grundwasserstände oder von Quellschüttungen (aus einer Quelle austretendes Wasservolumen), das Messnetz Grundwasserbeschaffenheit zur Untersuchung der Beschaffenheit des Grundwassers. Das Wasserrahmenrichtlinien-Messnetz umfasst repräsentative Messstellen, welche zur Zustandsbewertung der Grundwasserkörper eingesetzt werden. Im EUA-Messnetz werden Messstellen betrieben, die für verschiedene Nutzungsarten repräsentativ sind und zur Beurteilung des Umweltzustands durch die Europäische Umweltagentur dienen. Das EUA-Messnetz fasst dabei das Nitratmessnetz mit ein, welches für die landwirtschaftlichen Nutzungen repräsentative Messstellen umschließt. Zur Umsetzung der Nitratrichtlinie wurden zudem Messstellen des europaweiten EU-Nitratmessnetzes in Sachsen eingerichtet (Sächsisches Staatsministerium für Energie, Klimaschutz, Umwelt und Landwirtschaft, 2023).

Sachsen-Anhalt

Das Land Sachsen-Anhalt betreibt im Rahmen des „Gewässerüberwachungsprogramm Sachsen-Anhalt“ ein Messnetz. Das Monitoringprogramm dient dabei der Überwachung von Schutzgebieten, Beobachtung der Wasserbeschaffenheit für die zuständigen Wasserbehörden und der Pflichterfüllung auf nationaler und internationaler Ebene. Neben dem Messnetz werden drei „Automatische Messstationen – Beschaffenheit“ an der Elbe, der Saale und der Mulde betrieben. Diese führen kontinuierliche Messungen durch und nehmen Wochenmischproben des Wassers und Monatsmischproben der Sedimente. Zusätzlich dazu werden auch Untersuchungen der Seesedimente und der Schwebstoffe aus Fließgewässern untersucht. Bei dem Monitoring werden sowohl die physikalisch-chemische als auch die biologisch-ökologische Beschaffenheit der Gewässer untersucht. Des Weiteren werden verschiedene Sondermessprogramme veranlasst, um zum Beispiel eine Untersuchung der Gewässer auf das Vorhandensein von Arzneimittelwirkstoffen oder Pflanzenschutzmitteln zu untersuchen. Die

Daten zu verschiedenen Parametern sind auf der Informationsplattform Undine der Bundesanstalt für Gewässerkunde abrufbar (Landesportal Sachsen-Anhalt, 2023a).

Zusätzlich zur Überwachung der Gewässerbeschaffenheit betreibt das Land Sachsen-Anhalt ein landesweites hydrologisches Messnetz. Dieses umfasst 1.200 Grundwassermessstellen und ca. 340 Oberflächenwassermessstellen und dient der Überwachung des Wasserhaushalts (Landesportal Sachsen-Anhalt, 2023b).

Das Bundesland verzeichnet eine nur sehr langsame Verbesserung des Grundwassers, obwohl konkrete Maßnahmen zur Verminderung der Nährstoffeinträge umgesetzt wurden. Zur Altersbestimmung von oberflächennahem Grundwasser mit erhöhten Nährstoffkonzentrationen hat das Land ein Monitoringprogramm eingeleitet. Im Rahmen dieses Monitorings wurden an 70 Grundwassermessstellen Altersbestimmungen mittels Tritium/ Helium-Datierungsmethode vorgenommen. Die Ergebnisse aus den Jahren 2020 bis 2022 wurden anschließend in einem Bericht zusammengefasst (Landesportal Sachsen-Anhalt, 2023c).

Im Jahr 2023 führte das Land Sachsen-Anhalt zudem das Projekt "Nährstoffeinträge in das Grundwasser und Oberflächengewässer in Sachsen-Anhalt" weiter. Dieses Messprogramm baute auf einer Nährstoffmodellierung aus dem Jahr 2014 auf und diente einer Zustandsanalyse der Nährstoffeinträge in das Grundwasser sowie einer Ermittlung des Reduktionsbedarfs (Landesportal Sachsen-Anhalt, 2023c).

Im Rahmen des Projekts „Gewässerentwicklungskonzept Luppe-Salza“ führte das Land zudem eine Erfassung und Bewertung des ökologischen Zustands der Gewässer Luppe und Salza sowie deren Nebengewässer auf einer Länge von 110 km durch (Landesportal Sachsen-Anhalt, 2023c).

Eine weitere Messkampagne des Landes Sachsen-Anhalt befasst sich mit der Untersuchung der Denitrifikation des Grundwassers. Dabei wurde das Nitratabbauvermögen des Grundwassers durch die Stickstoff/ Argon-Methode quantifiziert (Landesportal Sachsen-Anhalt, 2023c).

Schleswig-Holstein

Das Land Schleswig-Holstein führt eine Reihe von Monitoringprogrammen zur Überwachung der Gewässerqualität durch. Dazu zählen unter anderen das Monitoringprogramm nach WRRL und das Monitoring zu Fischen und Rundmäulern nach FFH.

Des Weiteren nimmt das Bundesland eine Untersuchung der Gewässer Bille, Schwentine, Stör, Trave, Treene und des Bongsieler Kanals zur Umsetzung der Fischgewässerverordnung vor. Im Rahmen dieses Monitorings werden 16 Messstellen an den genannten Gewässern untersucht und anschließend nach dem Vorkommen verschiedener Fischarten deklariert.

Zusätzlich führt das Land Schleswig-Holstein ein Messprogramm zur Ermittlung von Stofffrachten an der Elbe, der Nordsee und der Ostsee durch. Dieses wird an 22 Gütemessstellen durchgeführt und dient der Weitergabe von Daten an die Oslo-Paris-Kommission, die Helsinki-Kommission und die Organisation for Economic Co-Operation and Development.

Die Ergebnisse der Monitoringprogramme können beim Landesamt für Umwelt angefordert werden (Landesportal Schleswig-Holstein, 2023).

Zur Überwachung des Grundwassers betreibt das Bundesland Schleswig-Holstein verschiedene Messnetze. Das EUA-Messnetz umfasst zugleich das EU-Nitratmessnetz und dient der Berichterstattung an die Europäische Umweltagentur. Des Weiteren betreibt das Land das WRRL-Messnetz und ein Ausweisungsmessnetz. Dieses Messnetz dient der Umsetzung der

„Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Ausweisung von mit Nitrat belasteten und eutrophierten Gebieten“ (AVV GeA), welche im Jahr 2020 von der Bundesregierung im Zusammenhang mit der Düngeverordnung erlassen wurde (Landesportal Schleswig-Holstein, 2022).

Das Land Schleswig-Holstein beteiligt sich zudem an dem Projekt „Modellregion Schlei“. Die Schlei ist ein Meeresarm in Schleswig-Holstein, welcher aufgrund des jahrzehntelangen Eintrages verschiedener Nährstoffe in einem schlechten ökologischen Zustand ist. Das Projekt fasst dabei ein Monitoring zur Erfassung der Nährstoffkonzentrationen ein. Diese wird durch stationäre und mobile optische Sensoren durchgeführt und dient der räumlichen und zeitlichen Aufnahme der Stickstoff- und Phosphorkonzentration. Das Ziel des Projekts ist dabei eine langfristige Reduzierung der Nährstoffbelastung (Naturpark Schlei e.V., 2023).

Thüringen

Das Land Thüringen betreibt zur Überwachung der Qualität des Grundwassers das sogenannte Grundwassermessnetz. Dieses wird durch das Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz (TLUBN) betrieben und dient dem Grundwassermonitoring nach WRRL und nationalen Wassergesetzen (Wasserhaushaltsgesetz und Thüringer Wassergesetzes) sowie zur Beratung der Landesbehörden. Durch 730 Messstellen findet dabei eine kontinuierliche Erfassung des Grundwasserstands statt. Die Beschaffenheit und chemische Zusammensetzung des Grundwassers wird an 230 Gütemessstellen überwacht, an welchen eine Probenahme und eine Untersuchung auf 250 Einzelparameter einmal jährlich erfolgt. Die Ergebnisse des Grundwassermonitorings werden über den Kartendienst des TLUBNs veröffentlicht (Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz, 2022).

Um der Forderung der Oberflächengewässerverordnung nachzukommen, wird im Bundesland Thüringen regelmäßig ein Biota-Monitoring durchgeführt. Dieses umfasst die Untersuchung von Fischen und Muscheln auf besondere Schadstoffe und dient der chemischen Gewässerüberwachung. Das Biota-Monitoring Thüringens existiert seit 2013 und wird einmal jährlich an 104 Messstellen von 81 Oberflächenwassern durchgeführt. Für das Monitoring sind nur Fische einer bestimmten Größenklasse geeignet, zu der Döbel, Brasse, Flussbarsch, Plötze oder Bachforelle zählen. Das Land Thüringen führt die Schadstoffuntersuchungen hauptsächlich an Bachforellen durch. Die Untersuchung erfolgt mit einer Poolprobe, welche sich aus dem Filet von zehn Fischen einer Messstelle zusammensetzt und in Hinblick auf die Konzentration verschiedener Schadstoffe analysiert wird. Die Veröffentlichung der Ergebnisse aus den Jahren 2013 bis 2020 erfolgte in Form eines jährlichen Berichtes (Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz, 2022).

Ein weiteres Monitoringprogramm Thüringens, welches sich mit der Schadstoffbelastung der Gewässer beschäftigt, trägt den Titel „Pflanzenschutzmittel in ausgewählten Thüringer Flüssen und Bächen“. Bei diesem Monitoringprogramm soll der Eintrag von gewässerschädlichen Pflanzenschutzmitteln (PSM) in Thüringer Oberflächengewässer überprüft werden. Die ersten Untersuchungen dazu erfolgten im Jahr 2016, das Monitoringprogramm wird aber bis heute fortgeführt. Die Messungen werden dabei an fünf bis 13 Terminen im Jahr an verschiedenen Messstellen vorgenommen. An den größten Thüringer Gewässern befinden sich neun Überblicksmessstellen, an welchen eine jährliche Untersuchung auf alle PSM durchgeführt wird. Zusätzlich dazu werden etwa 20 Messstellen in stark landwirtschaftlich genutzten Regionen an kleineren Gewässern betrieben und zehn Messstellen, welche den Eintrag von PSM aus Siedlungen erfassen. In den Jahren 2018 und 2019 beteiligte sich das Land Thüringen zudem mit drei Messstellen an einem bundesweiten Messprogramm zu PSM-Einträgen in

Kleingewässern nach Starkregenereignissen. Neben den Messstellen wird in Thüringen auch eine Untersuchung auf PSM im Muskelgewebe von Fischen durchgeführt (siehe Abschnitt zum Biota-Monitoring). Das Monitoring schließt dabei Fungizide, Herbizide, Insektizide und deren Metabolite ein und umfasst alle in der OGewV geregelten sowie eine größere Anzahl weiterer PSM. Die Daten aus den Messungen von 2016 bis 2019 wurden in Form eines Berichtes publiziert (Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz, 2022).

Zusätzlich dazu erfolgte von 2015 bis 2017 ein Monitoring zur „Nährstoff - und Schadstoffbelastung der Gera 2015 – 2017“ nach WRRL (Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz, 2022).

Neben der Untersuchung der Gewässer auf PSM führt das Land Thüringen auch ein Monitoring zur Belastung mit Pharmazeutika durch. Das Sondermessprogramm „Pharmazeutische Spurenstoffe“ wurde zwischen 2016 und 2019 umgesetzt und umfasste 33 Messstellen. Neben großen Fließgewässern (Saale, Werra und Unstrut) wurden dabei auch einige kleinere Nebengewässer untersucht. Die Untersuchungen erfolgten sechs- bis zwölfmal jährlich in einem Mindestzeitraum von einem Jahr und einem Maximalzeitraum von vier Jahren. Das Monitoringprogramm umfasste dabei die Messung der Konzentrationen verschiedener Pharmazeutika aus den Gruppen der Analgetika, Hypnotika, Lipidsenker, Kontrastmittel, Desinfektionsmittel, Biozid, Betablocker, Antiseptika, Antiepileptika und Antibiotika. Die Ergebnisse des Sondermessprogramms wurden in einem Bericht veröffentlicht (Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz, 2022).

Zur Verbesserung der Beschaffenheit der Thüringer Gewässer hat das Land die „Aktion Fluss“ ins Leben gerufen. Diese umfasst eine Vielzahl von Projekten sowie das „Landesprogramm Gewässerschutz 2022-2027“. Das Programm umfasst 3.100 Maßnahmen und Verbesserung des chemischen und ökologischen Zustands (Makrozoobenthos, Makrophyten, Phytobenthos, Diatomeen, Phytoplankton, Fische) der Gewässer und dient dazu, den Einfluss von Abwasser, Landwirtschaft, Bergbau auf den Gewässerzustand zu untersuchen. Die Grundlage dafür bildet eine kontinuierliche Gewässerüberwachung, welche anhand der Vorgaben der WRRL bewertet wird. Eine Veröffentlichung der Daten zum Zustand der Gewässer und der vorgenommenen Maßnahmen ist in Form von herunterladbaren Dokumenten auf der Homepage öffentlich zugänglich (Thüringer Ministerium für Umwelt, Energie und Naturschutz, 2023).

3.2.4 Relevanz bestehender Monitoringprogramme für ein nGVO-Monitoring

Die Bewertungen der einzelnen etablierten Monitoringprogramme ergaben die höchsten Punktzahlen für solche Verfahren, welche in das Monitoring der WRRL eingebunden, somit standardisiert sind und die zusätzlich mehrere Artengruppen erfassen. Zu diesen Verfahren zählen die im Folgenden aufgelisteten:

- Monitoring der Oberflächengewässerqualität Baden-Württemberg,
- Monitoringprogramm Oberflächengewässerbeschaffenheit Bayern,
- Monitoringprogramm zur Überwachung der Beschaffenheit und Menge von Oberflächengewässer und des Grundwassers Mecklenburg-Vorpommern,
- Monitoring Oberflächengewässer Rheinland-Pfalz,
- Gewässermonitoring Schleswig-Holstein.

Die Rangfolge der Eignung der etablierten Monitoringprogramme ist im Anhang in Tab. 22 wiedergegeben. Die genannten Monitoringprogramme sind am ehesten für ein nGVO-Monitoring geeignet. Das Monitoring der Oberflächengewässerqualität nach WRRL erfolgt deutschlandweit und kann daher auch am ehesten für ein Monitoring von nGVO in aquatischen Ökosystemen herangezogen werden. Gleichwohl können fast sämtliche etablierten Monitoringprogramme nicht zwischen genetisch unveränderten Organismen und nGVO unterscheiden. Daher wäre eine Ergänzung mit neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden notwendig, welche eine solche Unterscheidung anhand morphologischer, genetischer oder molekularer Merkmale ermöglichen (siehe Kapitel 4). Eine Kombination etablierter Monitoringprogramme nach WRRL mit neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden wäre kosteneffizient, und nutzt die Vorteile der etablierten Monitoringprogramme nach WRRL wie Repräsentativität und Umweltrelevanz sowie gleichzeitig die Stärken neuartiger molekularbiologischer Nachweismethoden bei der Nachverfolgung von nGVO.

Die bestehenden Monitoringprogramme zur Bewertung der Oberflächengewässerqualität nach WRRL decken größere Gewässer ab. Um eine Untersuchung von Kleingewässern zu ermöglichen, müssten entweder diese Instrumente ausgeweitet werden oder andere Monitoringprogramme miteinbezogen werden. Ein fortlaufendes, einheitliches Monitoring der nationalen Kleingewässer gibt es dabei bisher nicht. Ein mögliches Monitoringprogramm wäre aber zum Beispiel das nationale Projekt Kleingewässermonitoring (KgM), welches einen Ansatz für ein deutschlandweit einheitliches Monitoring von Kleingewässern darstellt. Das Projekt wird bisher jedoch nicht fortlaufend fortgeführt, ist auf Pflanzenschutzmittelrückstände fokussiert, betrachtet nur bestimmte Artengruppen. Für eine Einbindung der Kleingewässer in ein nGVO-Monitoring müssten die Möglichkeiten eines Kleingewässermonitorings daher ausgeweitet und weiter etabliert werden.

Zusätzlich ist erwähnenswert, dass die bundesländereigenen Monitoringprogramme zur Überwachung des Grundwasserzustands nach WRRL durchgehend niedriger bewertet wurden als die Überwachungen der Oberflächengewässerqualität. Die WRRL verpflichtet die Mitgliedsstaaten im Fall des Grundwassermonitorings nur zur Überwachung des chemischen und mengenmäßigen Zustands, während das Monitoring der Oberflächengewässer verpflichtend auch biologische Parameter miteinbezieht (Umweltbundesamt, 2022d). Einige Bundesländer führen jedoch freiwillig eine Untersuchung des biologischen Zustands des Grundwassers durch. Aus Analysen der Bundesländer Baden-Württemberg und Sachsen-Anhalt ging dabei beispielsweise hervor, dass sich im Grundwasser neben Bakterien auch verschiedene Tiergruppen nachweisen lassen. Der Großteil der Tiere gehörte dabei zu den Crustacean, jedoch konnten auch viele Nematoden und Oligochaeten detektiert werden (Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg, 2006; Landesbetrieb für Hochwasserschutz und Wasserwirtschaft Sachsen-Anhalt, 2009). Ein Monitoring des Grundwassers eignet sich damit zur Untersuchung von Bakterien und im Grundwasser lebenden Artengruppen. Dabei gilt es zu beachten, dass auch im Fall der Bakterien eine Ausweitung und Etablierung eines regelmäßigen flächendeckenden biologischen Grundwassermonitorings von Nöten wäre. Da wir den Aufwand für die Einrichtung eines solchen Monitorings als hoch einschätzen und dieses unter den ausgewählten Organismengruppen letztendlich nur für die Bakterien nutzbar wäre, wird die Überwachung von Grundwasser für das angedachte nGVO-Monitoring nicht empfohlen.

4 Einsatzmöglichkeiten neuer methodischer Entwicklungen

4.1 Methodik

AE und biome-id führten eine Erhebung neuer methodischer Entwicklungen anhand einer Literaturrecherche durch. Bei der Literaturrecherche zu neuen Monitoring- und Nachweismethoden in aquatischen Systemen wurden „Science Direct“ und „Google Scholar“ als Suchmaschinen im Internet verwendet. Es erfolgte eine Beschränkung auf Veröffentlichungen aus den letzten sechs Jahren, da in der jüngsten Vergangenheit neue Monitoring- und Nachweismethoden aus den Bereichen der Gentechnik, der Fernerkundung und der automatischen Bilderkennung mit Hilfe künstlicher Intelligenz (KI) verbreitet zur Anwendung gekommen sind. Generell wurden Volltextsuchen durchgeführt. Bei der Literatursuche wurde eine Vorauswahl aus den von den Suchmaschinen vorgeschlagenen Publikationen vorgenommen, d. h. es wurden nur solche Publikationen weiter betrachtet, aus deren Titel eindeutig hervorging, dass sie sich mit neuen Monitoring- und Nachweismethoden in aquatischen Systemen und von Mücken befassen. Im Fall der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden umfasste die Literatursuche dabei Publikationen, welche sich mit der Identifikation von Arten oder der Detektion von Fremdgenen oder Mutationen in einer Art beschäftigen.

Für die neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden wurde mit dem Suchbegriff „monitoring“ im Zusammenhang mit den Begriffen „aquatic“, „mosquito“, „bacteria + aquatic“, „microalgae“ beziehungsweise „fish“ begonnen. Im Rahmen dieser Suche gefundene neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden wurden anschließend für eine tiefergehende Recherche verwendet. Nachfolgend werden die so entstandenen Suchkombinationen aufgeführt:

- monitoring + aquatic
- monitoring + mosquito
- monitoring + bacteria + aquatic
- monitoring + microalgae
- monitoring + fish
- barcoding + mosquito
- barcoding + bacteria + aquatic
- barcoding + microalgae
- barcoding + fish
- metabarcoding + mosquito
- metabarcoding + bacteria + aquatic
- metabarcoding + microalgae
- metabarcoding + fish
- multiplex-PCR + mosquito
- multiplex-PCR + bacteria + aquatic
- multiplex-PCR + microalgae
- multiplex-PCR + fish

- qPCR + mosquito
- qPCR + bacteria + aquatic
- qPCR + microalgae
- qPCR + fish
- dPCR + mosquito
- dPCR + bacteria + aquatic
- dPCR + microalgae
- dPCR + fish
- LAMP + mosquito
- LAMP + bacteria + aquatic
- LAMP + microalgae
- LAMP + fish
- RPA + mosquito
- RPA + bacteria + aquatic
- RPA + microalgae
- RPA + fish
- CRISPR/Cas + mosquito
- CRISPR/Cas + bacteria + aquatic
- CRISPR/Cas + microalgae
- CRISPR/Cas + fish
- MALDI-TOF MS + mosquito
- MALDI-TOF MS + bacteria + aquatic
- MALDI-TOF MS + microalgae
- MALDI-TOF MS + fish
- ELISA + mosquito
- ELISA + bacteria + aquatic
- ELISA + microalgae
- ELISA + fish
- ELONA + mosquito
- ELONA + bacteria + aquatic
- ELONA + microalgae
- ELONA + fish
- HRCA + mosquito
- HRCA + bacteria + aquatic

- HRCA + microalgae
- HRCA + fish
- HRM + mosquito
- HRM + bacteria + aquatic
- HRM + microalgae
- HRM + fish
- LFA + mosquito
- LFA + bacteria + aquatic
- LFA + microalgae
- LFA + fish
- MHBMDAA + mosquito
- MHBMDAA + bacteria + aquatic
- MHBMDAA + microalgae
- MHBMDAA + fish
- microsatellite + mosquito
- microsatellite + bacteria + aquatic
- microsatellite + microalgae
- microsatellite + fish
- NPA + mosquito
- NPA + bacteria + aquatic
- NPA + microalgae
- NPA + fish
- SHA + mosquito
- SHA + bacteria + aquatic
- SHA + microalgae
- SHA + fish

Bei der Recherche zu den drei letztgenannten Themenfeldern kamen folgende Kombinationen von Suchbegriffen zum Einsatz:

- monitoring + aquatic,
- monitoring + remote sensing + aquatic,
- monitoring + automated image recognition + aquatic,
- monitoring + citizen science + aquatic,
- monitoring + mosquito,
- monitoring + remote sensing + mosquito,

- monitoring + automated image recognition + mosquito,
- monitoring + citizen science + mosquito,
- monitoring + bacteria,
- monitoring + remote sensing + bacteria,
- monitoring + automated image recognition + bacteria,
- monitoring + citizen science + bacteria,
- monitoring + algae,
- monitoring + remote sensing + algae,
- monitoring + automated image recognition + algae,
- monitoring + citizen science + algae,
- monitoring + fish,
- monitoring + remote sensing + fish,
- monitoring + automated image recognition + fish,
- monitoring + citizen science + fish,

Zusätzlich wurde folgende gezielte Suchbegriffskombination verwendet, um herauszufinden, ob nGVO bisher überhaupt Gegenstand von Monitoring in aquatischen Systemen sind:

- monitoring + aquatic + new genetically modified organism

Die Gliederung der Themenfelder orientierte sich an den Inhalten der Publikationen. Es wurde eine Unterteilung in „Neuartige molekularbiologische Nachweismethoden“, „Fernerkundungsmethoden“, „Kamerasysteme, akustische Systeme und automatische Bilderkennung“ sowie „Einbindung von Bürgerwissenschaftler*innen“ vorgenommen. In einer weiteren Gliederungsebene wurde nach neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden und neuen Monitoringverfahren für Mücken, Bakterien, Algen und Fischen unterschieden.

Insgesamt wurden für die neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden 1.390 Publikationen herausgesucht und für die drei letztgenannten Themenfelder 148 referierte Publikationen ausgewählt und aus dem Internet als pdf-Dateien heruntergeladen. Die gezielte Suche nach Monitoring von nGVO führte in den beiden benutzten Suchmaschinen zwar zu zahlreichen Treffern, jedoch ergab eine Vorauswahl, dass bisher keine referierten Publikationen zum Monitoring von nGVO in aquatischen Systemen existieren.

In einem nächsten Schritt wurden die Referenzen zu den Publikationen in eine digitale Literaturliteraturdatenbank überführt. Anschließend erfolgten die Auswertung der Publikationen und die Zusammenfassung ihrer wesentlichen Ergebnisse in einem Literaturreview. Einige Reviewartikel wurden nicht berücksichtigt, da sie zum großen Teil sich wiederholende, redundante Informationen enthielten. Abb. 1 fasst die Vorgehensweise der Literatursuche zusammen.

Die Bewertung der identifizierten Verfahren wurde anhand folgender Kriterien vorgenommen werden:

- Repräsentativität,
- Sensitivität,
- Genauigkeit,
- Vergleichbarkeit,
- Nachverfolgung von nGVO,
- Messung der Umweltexposition,
- Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt,
- Kosteneffizienz und
- Umweltrelevanz.

Weiterhin wurde zwischen gezielten artspezifischen Monitoringprogrammen und neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden und solchen, die eine Umweltmatrix untersuchen, unterschieden. Die Monitoringverfahren und neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden wurden anhand der genannten Kriterien mit einem Ratingverfahren mit Expert*innenwissen bewertet und eine Rangfolge der Eignung für ein künftiges nGVO-Monitoring erstellt. Für die Bewertung wurde ein Punktesystem herangezogen. Jedes Monitoringverfahren wurde anhand einer Skala von ein bis fünf Punkten bezüglich jedes Kriteriums bewertet. Diese Skala orientierte sich an der fünfstufigen Bewertung der Gewässergüte gemäß der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL). Eine feinstufigere Bewertung wurde verworfen, da kleine Unterschiede der Eignung bezüglich eines Kriteriums subjektiv nur sehr schwer erfasst und dokumentiert werden können. Fünf Punkte entsprechen einer guten Eignung gemäß eines Kriteriums, ein Punkt entspricht einer sehr geringen Eignung bezüglich eines Kriteriums. Es wurde bei jedem Monitoringverfahren nach den vier behandelten Artengruppen unterschieden, so dass insgesamt 84 Monitoringverfahren und neuartige molekularbiologische Nachweismethoden bewertet wurden.

Das Kriterium Repräsentativität basiert auf der zeitlichen Frequenz und der räumlichen Auflösung. Für eine hohe Bewertung ist eine saisonale Erfassung mit räumlich gleichmäßig und dicht verteilten Monitoringstationen notwendig. Da jedoch die neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden zum großen Teil noch nicht etabliert sind, wurde zusätzlich als Maß für Repräsentativität die Anzahl der bisherigen Studien über die einzelnen Verfahren herangezogen. Eine hohe Anzahl von Studien bedingt eine große Anzahl räumlich und zeitlich verteilter Daten und führt somit zu einer hohen Repräsentativität. Das Kriterium Sensitivität beinhaltet Nachweis- und Bestimmungsgrenzen einzelner untersuchter Parameter. Bei Monitoringverfahren und neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden mit niedrigen Grenzen ist ein Nachweis oder eine quantitative Bestimmung erschwert. In diesem Fall erfolgte eine Bewertung mit einer geringen Punktzahl. Das Kriterium Genauigkeit ist dem Kriterium Sensitivität sehr ähnlich. Ersteres ist z. B. durch die Streuung der Messwerte um ein zentrales Lagemaß zu bestimmen. Bei einer hohen Anzahl von Replikaten (Proben) liegt eine höhere Genauigkeit im Sinne einer höheren Zuverlässigkeit vor als bei einer geringen Anzahl von Replikaten. Weiterhin wurden die Genauigkeiten der Analysemethoden bewertet. Das Kriterium Vergleichbarkeit beschreibt, inwieweit die Monitoringverfahren und neuartigen molekularbiologischen

Nachweismethoden standardisiert und in einen nationalen oder internationalen Kontext eingebunden sind. So wurden Verfahren, welche schon national oder international standardisiert sind, mit einer hohen Punktzahl bewertet. Nachverfolgung von nGVO beschreibt die Kapazität eines Monitoringverfahrens oder einer neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode, auch geringe Individuenanzahlen und –dichten von nGVO im Freiland zu erfassen. Eine hohe Kapazität wurde mit einer hohen Punktzahl bewertet. Hingegen wurde unter Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt die Fähigkeit eines Verfahrens verstanden, nGVO in höheren Anzahlen und Dichten zu erfassen und zu quantifizieren. Eine solche ausgeprägte Fähigkeit wurde mit einer hohen Punktzahl bewertet. Die Messung der Umweltexposition beschreibt die Fähigkeit eines Monitoringverfahrens oder einer neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode, Interaktionen des nGVO mit anderen Arten und abiotischen Größen im Ökosystem zu beschreiben. Eine solche ausgeprägte Fähigkeit wurde mit einer hohen Punktzahl bewertet. Kosteneffizienz beschreibt den potentiellen Erkenntnisgewinn bezüglich der Ausbreitung von nGVO im Verhältnis zu finanziellen und logistischen Kosten. Eine hohe Kosteneffizienz wurde mit einer hohen Punktzahl bewertet. Unter dem Kriterium Umweltrelevanz wurde die Bedeutung der Monitoringverfahren und neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden für die Erfassung von kausalen Zusammenhängen und Expositionspfaden von nGVO verstanden.

Abschließend wurde für jedes Monitoringverfahren und jede neuartige molekularbiologische Nachweismethode eine gewichtete Summe der Punktzahlen berechnet. Die Kriterien Sensitivität und Genauigkeit erhielten ein niedriges Gewicht von 0,5, da diese beiden Kriterien einander sehr ähnlich sind und eine inhaltliche Überlagerung vorliegt. Die Kriterien Nachverfolgung von nGVO und Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt erhielten ein hohes Gewicht von 1,5, da diese beiden Kriterien essentiell für ein Monitoring von nGVO sind. Die anderen Kriterien erhielten jeweils ein Gewicht von 1,0. Die Monitoringverfahren und neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden wurden gemäß der gewichteten Summe in absteigender Reihenfolge sortiert (siehe Anhang,). Monitoringverfahren und neuartige molekularbiologische Nachweismethoden mit einer hohen Gesamtpunktzahl sind für ein künftiges nGVO-Monitoring besser geeignet als solche mit einer niedrigen Gesamtpunktzahl.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Neuartige molekularbiologische Nachweismethoden

Wie schon im vorherigen Kapitel beschrieben schließt die Umsetzung der EU-Wasserrahmenrichtlinie ein Monitoring verschiedener Organismengruppen ein. Bisher beruht deren taxonomische Aufschlüsselung auf einer morphologischen Bestimmung einzelner Organismen. Die morphologische Bestimmung von Individuen ist eine gut etablierte und in das WRRL-Monitoringprogramm implementierte Methode, jedoch weist sie auch einige Nachteile auf. Neben einem hohen Zeitaufwand und einer niedrigen taxonomischen Auflösung ist die Methode durch die subjektiven Einflüsse der Analysten relativ fehleranfällig (Mergen et al., 2018).

In den letzten Jahren sind verschiedene neuartige molekularbiologische Nachweismethoden entwickelt und zur taxonomischen Aufschlüsselung von Organismen verwendet worden. Diese weisen einen geringeren Zeitaufwand, eine höhere Genauigkeit, eine bessere taxonomische Auflösung sowie die Möglichkeit zur Hochdurchsatz-Analytik auf. Bisher steht jedoch eine Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden aus,

wodurch eine Anwendung in den regulären Biomonitoringprogrammen zurzeit noch nicht möglich ist (Weigand et al., 2019).

Es beschäftigen sich jedoch mehrere Institutionen mit der Implementierung neuartiger molekularbiologischer Nachweismethoden in behördliche Monitoring-Verfahren. So haben das Bundesamt für Naturschutz und der Verein Deutscher Ingenieure (VDI) in Zusammenarbeit mit anderen Institutionen eine Handlungsempfehlung unter dem Namen „DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung?“ herausgegeben. Diese Handlungsempfehlung wurde von einer Reihe von Expert*innen erarbeitet und ist das Ergebnis eines mehrtägigen Workshops. Im Mittelpunkt stehen dabei eine aktuelle Stand- und eine Bedarfsanalyse sowie die Frage danach was es bei einer Standardisierung zu beachten gilt und wie diese zu erreichen ist (Bundesamt für Naturschutz, 2023). Das schweizerische Bundesamt (BAFU) hat seinerseits ebenfalls Richtlinien zur „Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen“ herausgegeben. Diese behandeln die potentielle Anwendung von Umwelt-DNA (environmental DNA, eDNA) für das Monitoring und die Bewertung aquatischer Ökosysteme und stellt zudem Protokolle für die Arbeit mit eDNA bereit (Bundesamt für Umwelt, 2020). An einer Standardisierung der Arbeitsabläufe, Protokolle, der biologischen Indizes und der Datenanalyse arbeitet außerdem das im Jahr 2016 ins Leben gerufene „AquaNet“. Das Ziel dieses internationalen Zusammenschlusses ist die Implementierung neuartige molekularbiologische Nachweismethoden in etablierte Monitoringprogramme und den Rechtsrahmen europäischer Richtlinien (Leese et al., 2016).

Eine Einbindung neuartiger molekularbiologischer Nachweismethoden in die etablierte Monitoringprogramme könnte somit bereits in naher Zukunft erfolgen.

Im Rahmen der Literaturrecherche wurden Publikationen zusammengetragen, welche sich mit dem Einsatz neuartiger molekularbiologischer Nachweismethoden im aquatischen Zusammenhang befassen. Der Fokus lag dabei auf dem aquatischen Biomonitoring bzw. der Detektion einer bestimmten Art in aquatischen Lebensräumen. Da das Ziel dieses Projekts das Monitoring von Gewässern in Bezug auf das Vorhandensein von nGVO-Organismen und deren Auswirkungen ist, wurden zudem Publikationen zusammengetragen, welche sich mit der Detektion von (Fremd-)Genen oder dem Nachweis von Mutationen in aquatischen Organismen beschäftigen. Alle gefundenen Publikationen wurden nach der behandelten Methodik und nach den vier ausgewählten Organismengruppen sortiert. Eine numerische Zusammenstellung ist in Tab. 20 abgebildet. Bei der angegebenen Anzahl gilt es zu beachten, dass manche Publikationen sich mit mehreren Organismengruppen oder mehreren Methoden befassen und somit doppelt aufgelistet werden. Am häufigsten finden dabei die Nachweismethoden Barcoding, Metabarcoding und qPCR (quantitative PCR) Anwendung im Bereich des aquatischen Monitorings. Methoden mit mehr als 20 Nennungen (blau dargestellt) werden in den nachfolgenden Texten ausführlicher behandelt. Aufgrund des großen Umfangs konnten nicht alle Publikationen im Rahmen dieser Studie weiter ausgeführt werden. Für jede Organismengruppe werden daher nur zwei bis drei Publikationen näher beschrieben.

In Abb. 15 ist die Verteilung der zusammengestellten Publikationen auch nochmal grafisch dargestellt. Die Publikationen werden dabei wieder je nach Organismengruppe und Nachweismethode unterteilt.

Tab. 20: Zusammenstellung aller ermittelten Publikationen zur Anwendung neuartiger molekularbiologischer Nachweismethoden im aquatischen Monitoring. Die Publikationen werden je nach Nachweismethode (vgl. Abkürzungszeichen) und Organismengruppe unterteilt. Nachweismethoden mit mehr als 20 Nennungen werden blau dargestellt.

Methode	Mücken	Bakterien	Mikroalgen	Fische	Anzahl Publikationen je Methode
Barcoding	111	0	45	150	306
Metabarcoding	28	152	88	219	487
Multiplex-PCR	10	27	2	6	45
qPCR	32	119	72	68	291
dPCR	9	34	14	32	89
LAMP	0	25	12	3	40
RPA	1	21	11	4	37
CRISPR/Cas	0	5	2	3	10
MALDI-TOF MS	19	37	4	8	68
ELISA	1	5	0	0	6
ELONA	0	3	2	0	5
HRCA	0	0	1	0	1
HRM	9	12	6	12	39
LFA	1	9	15	2	27
MHBMDAA	0	0	1	0	1
Mikrosatelliten	0	0	0	1	1
NPA	0	0	5	0	5
SHA	0	0	9	0	9
Anzahl Publikationen je Gruppe	670	738	797	1975	1467

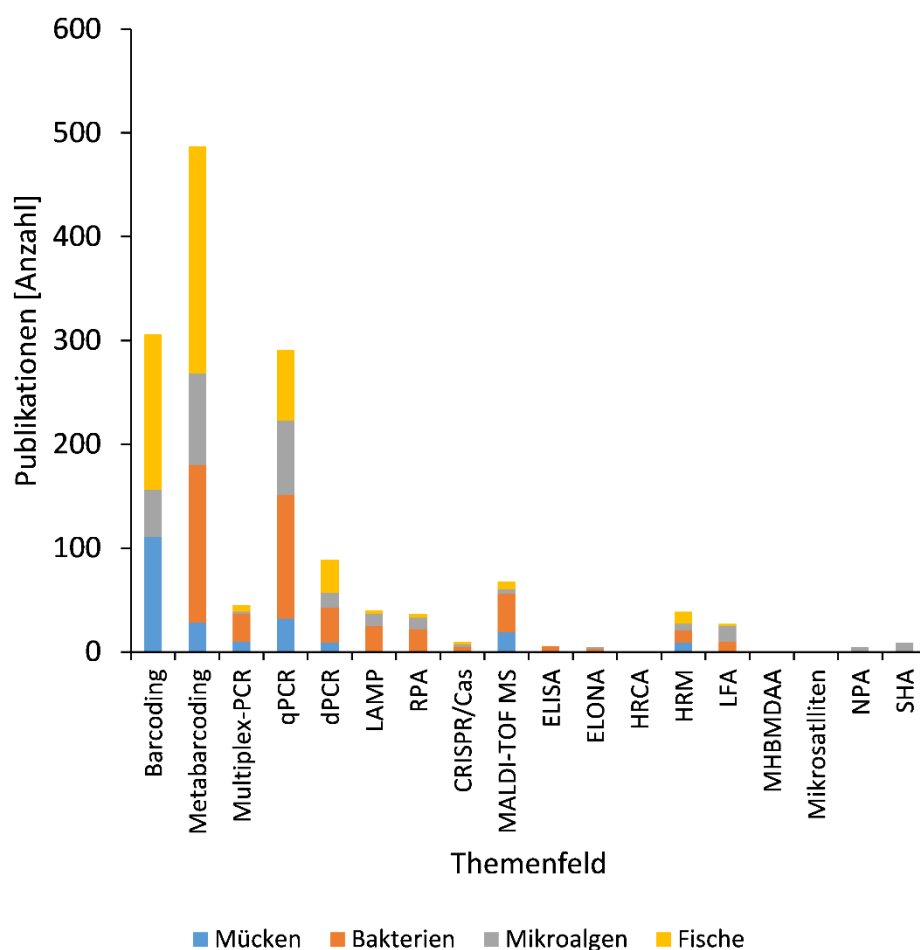


Abb. 15: Graphische Darstellung der Verteilung aller zusammengestellten Publikationen. Die Publikationen werden je nach Nachweismethode und Organismengruppe unterteilt. Die Ausführung der Abkürzungen ist Tab. 20 zu entnehmen.

4.2.1.1 Barcoding

Das DNA-Barcoding ist eine neuartige molekularbiologische Nachweismethode, die der taxonomischen Klassifizierung dient. Dem Verfahren liegt zugrunde, dass DNA-Sequenzen sich mit einer annähernd konstanten Rate durch Mutationen verändern. Abschnitte der DNA, welche besonders anfällig für Mutationen sind, werden hierbei vorzugsweise als sogenanntes Marker-Gen gewählt. Individuen einer Art weisen dabei gleiche oder sehr ähnliche Basenabfolgen innerhalb der entsprechenden DNA-Sequenz auf, währenddessen sie sich zwischen zwei verschiedenen Arten deutlich unterscheiden (Bromham, 2016). Diese spezifische Basenabfolge innerhalb der Sequenz gleicht der Kennzeichnung und Zuweisung von Artikel durch einen Strichcode, woher sich auch die Begriffsbezeichnung „Barcoding“ ableitet (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2021). Der Begriff Barcoding wurde im biologischen Kontext erstmals in einer Studie aus dem Jahr 2003 gebraucht (Hebert et al., 2003). Die Bezeichnung galt dabei lange nur für die Identifikation von Metazoen anhand der Sequenz des COI-Gens. Mittlerweile wird unter dem Begriff Barcoding jedoch oft die taxonomische Bestimmung einer Art anhand eines Marker-Gens im Allgemeinen verstanden.

Das Ausgangsmaterial für das DNA-Barcoding kann sowohl ganze Organismen, Larven, Eier, oder auch Teile oder Spuren des Organismus wie Körperteile, Gewebestücke, Haare oder Blut

sein (biome-id, 2023). Da die Qualität der DNA aus diesen Proben oft hoch ist, werden in der Regel sogenannte full-length Barcodes zur Identifizierung der Art verwendet. Diese sind je nach Genabschnitt ca. 500-1000 bp lang, wobei sich für verschiedene Organismengruppen unterschiedliche DNA-Sequenzen etabliert haben. Für aquatische Organismen finden dabei vor allem Sequenzabschnitte innerhalb des COI-, Cytb-, rbcL-, ITS- und des 16S-Locus Verwendung (Gong et al., 2018).

Das Barcoding ist dabei deutlich schneller, effizienter und genauer als traditionelle molekularbiologische Nachweismethoden, weist aber auch eine Reihe von Nachteilen auf. So eignet sich die Nachweismethode nur zur Bestimmung von Arten, deren Genom-Sequenzen bereits bekannt sind. Zur Auswertung der Barcoding-Daten wird zudem eine Referenzdatenbank für das verwendete Marker-Gen benötigt. Diese Referenzdaten sind für etablierte Marker-Gene schon zu großen Teilen vorhanden und öffentlich zugänglich, sind für einige Organismengruppen aber noch sehr lückenhaft (Weigand et al., 2019).

Das DNA-Barcoding wird im aquatischen Raum vor allem zu Identifikation einzelner Individuen oder zur Untersuchung der Artenvielfalt eines Gewässers eingesetzt und findet im Bereich der Ernährungssicherheit, der Fischerei, des Naturschutzes oder der Erkennung invasiver oder kryptischer Arten Anwendung (Elías-Gutiérrez et al., 2021).

Mücken

Das DNA-Barcoding wurde unter den neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden bisher mit deutlichem Abstand am häufigsten für die Organismengruppen der Mücken verwendet (Tab. 20, Abb. 15). Aus der Gesamtheit der vorliegenden Publikationen geht hervor, dass die Barcoding-Methode hauptsächlich zur taxonomischen Identifikation von Mücken verwendet wurde. Sie dient zum Beispiel als Ergänzung zur morphologischen Bestimmung, der Entdeckung und Charakterisierung neuer Arten, der Identifizierung von kryptischen Arten, dem Nachweis von invasiven Arten oder der Verbesserung von Referenz-Datenbanken. Thematisch beschäftigen sich viele Studien mit der Verbreitung von sogenannten Vektorarten, welche bestimmte Krankheiten wie zum Beispiel Malaria übertragen können. In den recherchierten Publikationen liegt der Fokus hauptsächlich auf dem ersten Nachweis einer solchen invasiven Vektorart in einem Gebiet, wodurch sich die Ausbreitung der Mückenart nachverfolgen lässt („first detection of“, „first finding of“, „first record of“). Aus methodischer Sicht wurde der COI- oder der ITS-Locus am häufigsten als Marker-Sequenz verwendet.

In der Studie von Tippelt et al. (2017) wurde dabei die Ausbreitung der thermophilen Mücke *Uranotaenia unguiculata* Edwards in Deutschland untersucht. Ihre Verbreitung war für viele Jahre auf den südlichen Teil Deutschlands begrenzt. Im Rahmen der Studie konnten jedoch eine nördliche Ausweitung der Verbreitungsgrenze festgestellt werden. Zur taxonomischen Identifikation der Mücken wurden sowohl eine morphologische Bestimmung, als auch ein COI-Barcoding durchgeführt. Das Auftreten der Art in Norddeutschland sehen die Autor*innen dabei als Beispiel für die Ausbreitung von Mückenarten als Folge der Klimaerwärmung.

In einer anderen Studie wurde das Vorkommen der invasiven Koreanischen Buschmücke *Aedes koreicus* erstmals in Deutschland untersucht. Im Rahmen dieses Monitorings wurden eine morphologische Identifizierung von, besser zu klassifizierenden, Mücken-Weibchen durchgeführt. Da die Koreanische schwer von der Japanischen Buschmücke zu unterscheiden ist, wurde anschließend ein Barcoding mit den Markern COI und ND4 durchgeführt. Die klassischen COI-Primer führten hier jedoch zu keinen oder falschen Amplifikaten. Hingegen zeigten Sequenzen des ND4-Locus ein hohes Maß an Homologie und waren somit nicht für eine

eindeutige Art-Zuweisung geeignet. Die Studie empfiehlt auf der Grundlage dieser Ergebnisse die Verwendung alternativer COI-Primer (Hohmeister et al. 2021).

Die Autor*innen Werner et al. (2020) führten in den neun Jahren von 2011 bis 2019 ein Bio-monitoring der Mücken im deutschen Raum durch. Das Monitoring untersucht dabei das Vorkommen, die Diversität und die Ausbreitung von Mückenarten in Deutschland mittels morphologischer Bestimmung. Ergänzend dazu wurden beschädigte Mücken sowie solche, die komplexen oder eng verwandten Arten gehören, mittels COI-Barcoding untersucht. Das Mücken-Monitoring wurde mittlerweile institutionalisiert und wird fortlaufend fortgeführt.

Während das DNA-Barcoding bereits für verschiedene Mücken-Monitoringprogramme genutzt wurde, ist es bisher noch nicht in behördliche Monitoringprogramme implementiert worden.

Die Barcoding-Methode beruht auf einer PCR mit, für das untersuchte Genfragment spezifischen, Primern. Die Verwendung einer PCR mit spezifischen Primern zur Identifikation von nGVO wäre ebenfalls möglich. Dabei ist zu beachten, dass der Begriff Barcoding die Identifikation einer Art anhand einer spezifischen Gensequenz beschreibt. Der Begriff lässt sich daher nicht auf das nGVO-Monitoring übertragen. Um einen Organismus auf genetische Veränderung zu untersuchen, muss das mutierte Gen jedoch bekannt sein. Alternativ wäre eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen denkbar. Eine Analyse des gesamten Genoms auf unbekannte Mutationen ist mittels dieser Methode jedoch nicht möglich.

Eine Implementierung der Barcoding-Methode könnte die klassischen Methoden in Hinblick auf die taxonomische Bestimmung einzelner Individuen unterstützen. Zudem könnte die Methode eine Untersuchung des Organismus auf eine bekannte oder typische Mutation ermöglichen. Unter den oben genannten Voraussetzungen würde die Methode sich dafür sehr gut eignen.

Bakterien

Im Fall der Bakterien wurde keine Publikation gefunden, die sich mit der sequenzbasierten-Identifikation einzelner Individuen aus dem aquatischen Lebensraum beschäftigen.

Mikroalgen

Das DNA-Barcoding wurde bisher schon relativ häufig bei Mikroalgen angewandt, wobei das Metabarcoding und die qPCR bevorzugte Methoden für diese Organismengruppe sind (Tab. 20, Abb. 15). Das Barcoding diente in den zusammengestellten Publikationen vor Allem der Art-Identifikation einzelner Organismen. Die Methode wurde dabei im Zusammenhang mit der Detektion einer Art, der Entdeckung und Charakterisierung einer neuen Art, der Identifizierung von kryptischen oder nah verwandten Arten sowie der Ergänzung von Referenzdatenbanken verwendet. Des Weiteren wurde das Barcoding zum Nachweis von saisonalen Veränderungen in Bezug auf das Mikroalgen-Vorkommen oder zur Detektion einer bestimmten Art als Bio-Indikator für die Wasserqualität genutzt. Die am häufigsten verwendeten Marker zur taxonomischen Identifikation der Algen sind dabei der ITS-, 18S- oder der rbcL-Locus. In ein paar Fällen wurde hingegen ein Abschnitt des COI-Gens als Marker verwendet.

In der Studie von Park et al., (2018) aus dem Jahr 2018 wurden saisonale Veränderungen in Bezug auf das Vorkommen von Mikroalgen vor der Küste Koreas mittels DNA-Barcoding untersucht. Dafür wurden die Algen zuerst mittels COI-Barcoding analysiert und anschließend artspezifische Primerpaare für die vierzehn häufigsten Arten entwickelt. Diese Primer zielten ebenfalls auf den COI-Locus ab und dienten der Ermittlung monatlicher Veränderungen in

Bezug auf das Vorkommen der untersuchten Mikroalgenarten. Dabei konnte für manche Arten eine saisonale Dynamik detektiert werden, während andere Arten das ganze Jahr über vorkamen.

Die Autor*innen Fawley und Fawley (2020) erarbeiten in diesem Artikel eine methodische Handlungsempfehlung zur Identifizierung von eukaryontischen Mikroalgen. Sie empfehlen dabei die Verwendung des 18S-, ITS- oder rbcL-Locus für das DNA-Barcoding von Mikroalgen. Dabei liegen für den 18S-Locus bisher die meisten Referenzdaten vor und Primer seien bereits für viele Arten etabliert. Strukturelle rRNA-Loci wie der 18S-Locus seien jedoch weniger variabel als Loci Protein-codierender Gene und könnten eine schlechtere taxonomische Auflösung bedingen. Die Autor*innen empfehlen daher für die Identifikation mancher Arten die alternative Nutzung bereits bekannter Marker für ITS-Regionen des nuklearen rRNA-Operons oder des Plastiden-rbcL Gens. Diese Loci würden vor allem bei eng verwandten Arten oder bei Arten innerhalb Grünalgen bessere Auflösungen bedingen. Die Autor*innen Barsanti et al. (2021) schlagen die Nutzung des 16S-Locus für prokaryotische Algen und des 18S-Locus für eukaryotische Mikroalgen vor.

Die taxonomische Identifikation von Mikroalgen mittels DNA-Barcoding wurde bisher schon in einigen Studien eingesetzt. Eine Einbindung der Methode in etablierte Monitoringprogramme ist bisher jedoch nicht erfolgt.

Die Methode beruht auf einer PCR mit, für das untersuchte Genfragment spezifischen, Primern. Die Verwendung einer PCR mit spezifischen Primern zur Identifikation von nGVO wäre ebenfalls möglich. Der Begriff Barcoding lässt sich analog zu den Mücken nicht auf das nGVO-Monitoring übertragen, die Nutzung der PCR mit spezifischen Primern zur Identifikation von nGVO wäre jedoch auch im Fall der Mikroalgen möglich. Dabei kann allerdings ebenfalls nur die Untersuchung der Algen auf eine bekannte Mutation oder auf typische genetische Veränderungen erfolgen.

Eine Implementierung der Barcoding-Methode in behördliche Monitoringprogramme zur Untersuchung der Mikroalgen wäre möglich. Da die Vereinzelung der Mikroalgen sowie die Untersuchung einzelner Algen relativ aufwendig sind, ist das Metabarcoding hier die bevorzugte Methode. Für die Untersuchung einzelner Algen auf genetische Veränderungen würde sich die Methode unter den oben genannten Voraussetzungen jedoch sehr gut eignen.

Fische

Bei den Fischen wurde das DNA-Barcoding bereits häufig im Bereich des aquatischen Biomonitorings verwendet (Tab. 20, Abb. 15) und dient vor Allem der taxonomischen Identifikation eines Organismus. Die Methode wurde hierbei häufig zum Nachweis einer Art, der Identifizierung kryptischer oder invasiven Arten, einer Nachverfolgung der Ausbreitung einer Art, der Detektion saisonaler Veränderungen oder der Erstellung von Referenzdaten genutzt. Des Weiteren wurde das DNA-Barcoding zur taxonomischen Aufschlüsselung von Fischprodukten oder von Ichthyoplankton verwendet. Der am häufigsten genutzten DNA-Marker ist dabei der COI-Locus, wobei der ITS-Locus ebenfalls häufig Anwendung fand.

Die Autor*innen Tsoupas et al. (2022) führten im Jahr 2021 ein DNA-Barcoding der Fische und Makroinvertebraten der Sieg in Deutschland durch. Das Ziel der Studie war ein Vergleich der Ergebnisse mit denen aus morphologischen Bestimmungen und eine Bewertung des DNA-Barcodings in Bezug auf eine Nutzung für behördliche Monitoringprogramme. Als Marker wurde dabei ein Abschnitt des COI-Gens gewählt. Für die Fische waren die Ergebnisse nahezu

identisch zur morphologisch-basierten Art-Zuweisung. Im Fall der Makroinvertebraten wurde ein Teil der Organismen unterschiedlich identifiziert. Des Weiteren konnten einige Makroinvertebraten, welche zuvor nur einer höheren systematischen Einheit zugeordnet werden konnten, mittels DNA-Barcoding eindeutig klassifiziert werden. Der Kosten- und Zeitaufwand des DNA-Barcodings war jedoch höher als bei der morphologischen Bestimmung.

In der Studie von Behrens-Chapuis, Herder und Geiger (2021) wurde das DNA-Barcoding beispielsweise zur Identifikation von griechischen Süßwasserfischen genutzt. Zudem sollten die Ergebnisse der Barcoding-Methode mit traditionellen Methoden zur Art-Bestimmung verglichen werden. Dafür wurden aus 18 Seen in Griechenland Proben entnommen und insgesamt 406 Fische untersucht. Für die genetische Identifikation der Fische wurde eine Region des COI-Gens gewählt. Für die meisten Organismen war eine eindeutige taxonomische Zuweisung möglich. In ein paar Fällen konnten sogar kryptische Arten identifiziert werden, die anhand der traditionellen Methoden nicht zu unterscheiden waren. Für einen Teil der Fische war jedoch keine eindeutige Identifikation möglich, da die interspezifischen genetischen Variationen mancher nah verwandten Arten zu gering waren. Für diese Organismen wäre eine zusätzliche Analyse nötig.

In China wurde die Barcoding-Methode zur Artidentifikation von Fischeiern aus dem Beibu-Golf genutzt. Das Ziel der Studie war dabei die Überwachung von Rekrutierungsprozessen und der Identifizierung von Laichplätzen. Da Fischeier sich morphologisch nur sehr begrenzt klassifizieren lassen, wurde das DNA-Barcoding zur taxonomischen Identifizierung genutzt. Als molekularer Marker wurden der COI- sowie der Cytb-Locus verwendet. Für 36,4 % der Fischeier konnte dabei eine eindeutige Klassifizierung erreicht werden. Für die Hälfte der Proben war die Abgrenzung zwischen verschiedenen Arten nicht eindeutig und für die übrigen Fischeier war keine Identifizierung möglich (Hou et al., 2022).

Das DNA-Barcoding wurde bereits für ein Monitoring von Fischen eingesetzt. Die Methode wurde dabei auch schon in Hinblick auf eine Nutzung in behördlichen Monitoringprogrammen mit den klassischen Methoden verglichen und bewertet. Dabei wurde sie als für das Fisch-Monitoring geeignet und als eine passende Ergänzung zu den herkömmlichen Methoden eingestuft.

Die Verwendung der Grundlagen des Barcodings, einer PCR mit spezifischen Primern, könnte dabei auch zur Identifikation von nGVO eingesetzt werden. Der Begriff Barcoding lässt sich hier jedoch ebenfalls nicht auf das nGVO-Monitoring übertragen. Analog zu den anderen Organismengruppen würde die Nachweismethode ebenfalls die Detektion von bekannten Mutationen in Fischen ermöglichen oder könnte alternativ zur Untersuchung eines Individuums auf typische genetische Veränderungen eingesetzt werden.

Eine Implementierung der Barcoding-Methode in etablierte Monitoringprogramme nach WRRRL wäre somit durchaus möglich und würde neben einer Ergänzung der taxonomischen Identifizierung auch ein nGVO-Monitoring unter den oben genannten Bedingungen ermöglichen.

4.2.1.2 Metabarcoding

Das Metabarcoding beruht auf dem Prinzip des DNA-Barcodings. Anstelle von einzelnen Individuen wird jedoch die taxonomische Aufschlüsselung einer Artengemeinschaft mittels Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien (high throughput sequencing; HTS) vorgenommen.

Die Methode generiert dabei Millionen von DNA-Sequenzen, welche die gleichzeitige Identifizierung sämtlicher Arten ermöglicht (Pawlowski et al., 2022).

Ausgangsmaterial kann dabei sowohl eine Mischprobe (bulk sample) als auch eDNA sein. Mischproben stellen dabei Sammelproben von Individuen aus der Umwelt dar und werden zum Beispiel mit Netzen oder Fallen gewonnen. Bei der eDNA handelt es sich um DNA, welche Lebewesen in Form von Hautzellen, Fäzes, Schuppen, etc. an ihre Umwelt abgegeben haben. Diese kann durch die Filtration von Wasser oder die Entnahme von Boden oder Sediment gewonnen werden (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2021).

So ist es möglich, eine Vielzahl von Organismen durch die Analyse einer einzigen Probe zu bestimmen. Das DNA-Metabarcoding gilt dadurch als kostengünstiger und effizienter als das Barcoding. Es ist jedoch zu beachten, dass für verschiedene Organismengruppen oft unterschiedliche Primer genutzt werden müssen und die Metabarcoding-Probe gegebenenfalls mehrfach analysiert werden muss. Die Marker-Sequenzen beider Methoden sind oft dieselben, jedoch werden unterschiedliche Primer verwendet und beim Metabarcoding ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert. Die Qualität der DNA ist in eDNA Proben dabei deutlich geringer als in frischen Gewebeproben, da die DNA frei vorliegt und mit der Zeit degradiert. Beim DNA-Metabarcoding wird daher nur ein 120-500 bp langes DNA-Fragment zur taxonomischen Identifizierung verwendet. Damit einher geht eine niedrigere Auflösung als bei der Verwendung eines full-length Barcodes. Zudem enthalten Umweltproben eine höhere Konzentration an Inhibitoren, was die Amplifikation der Genabschnitte zusätzlich erschwert. Des Weiteren ist die Gefahr einer Kontamination untereinander oder mit DNA von außen bei Umweltproben deutlich höher.

Im Vergleich zu herkömmlichen morphologisch-basierten Methoden weist das DNA-Metabarcoding eine weniger zeitintensive, nicht-invasive Probennahme auf, ist effizienter und ermöglicht die Identifizierung von unscheinbaren und unvollständigen Individuen. Für die meisten aquatischen Organismen hat sich dabei die Entnahme von eDNA als zuverlässiger herausgestellt. Im Fall von Wasserinsekten und Makrozoobenthos eignet sich jedoch die Untersuchung von Mischproben. Diese weist einen deutlich höheren Zeitaufwand und größenbedingte systematische Fehler bei der Probennahme auf, die Ergebnisse sind hingegen eher mit denen herkömmlicher Methoden vergleichbar. Das DNA-Metabarcoding erlaubt zudem nur eine indirekte Quantifizierung der Organismen und keine Bestimmung der Alters- oder Größenstruktur einer Population (Bundesamt für Umwelt, 2020; Liu et al., 2020).

Im Bereich des aquatischen Biomonitorings wird das DNA-Metabarcoding hauptsächlich für die Diversitätserhebung verwendet oder für die biologische Bewertung eines Gewässers anhand von biotischen Indizes. Im Fall der Biodiversitätserhebung lassen sich Zusammensetzung, Struktur und Diversität von Organismengemeinschaften analysieren, sodass eine fundierte ökologische Einschätzung vorgenommen werden kann. Zusätzlich dazu erlaubt die Analyse von biotischen Indizes eine Umweltverträglichkeitsprüfung (Bundesamt für Umwelt, 2020).

Mücken

Das DNA-Metabarcoding wurde bereits einige Male innerhalb der Organismengruppe der Mücken angewendet (Tab. 20, Abb. 15). Die meisten Publikationen nutzten die Metabarcoding-Methode dabei für ein Biodiversitätsmonitoring. Andere Anwendungsgebiete sind die Überwachung des Mückenvorkommens innerhalb eines Gebiets oder der Veränderung einer Gemeinschaft sowie die Detektion einer bestimmten Art in verschiedenen Lebensstadien. In der Regel erfolgte die Probennahme mit Hilfe von Fallen, wobei so genannte bulk samples

generiert und in die Analyse eingesetzt werden. Als molekulare Marker wurden in der Regel Abschnitte des COI-, 16S- oder ITS-Locus verwendet.

In der Studie von Theissinger et al. (2018) aus dem Jahr 2018 wurde das DNA-Metabarcoding zur Untersuchung des Chironomiden-Vorkommens und dessen Diversität in temporären Feuchtgebieten in Rheinland-Pfalz untersucht. Dabei wurde auch der Erfolg von Mückenbekämpfung auf die relative Häufigkeit und Artenvielfalt analysiert. Die Gruppe der Chironomiden gilt als wichtiger Indikator für die Überwachung von Süßwasserökosystemen, ist morphologisch jedoch schwer zu bestimmen. Zur Untersuchung der Chironomiden in den Feuchtgebieten wurden mit Hilfe von Insektenfallen Mischproben entnommen. Zu taxonomischen Aufschlüsselung der Arten wurde ein Abschnitt des COI-Gens als Marker-Sequenz verwendet. Dabei konnten ungefähr 70 % der Chironomiden auf Art-Ebene identifiziert werden. Zusätzlich dazu konnte gezeigt werden, dass die Mückenbekämpfungsmaßnahme kaum Auswirkungen auf die Diversität der Chironomiden hatte, reduzierte deren Vorkommen jedoch um 65 %.

In einem anderen Artikel wurde das Metabarcoding für eine Überwachung der räumlichen und zeitlichen Variation des Mücken-Vorkommens in Wassereinzugsgebieten in Brasilien genutzt. Die Studie sollte dabei einen Beitrag zur Etablierung der Methode zur behördlichen Überwachung von Mücken dienen. Neben adulten Tieren aus Mücken-Fallen wurden auch Mücken-Larven untersucht, welche von Makrophytenwurzeln gesammelt wurden. Für das Metabarcoding wurde dabei ein D2-rDNA-Marker genutzt. Die Autor*innen konnten bisher unbekannte zeitliche und räumliche Veränderungen der Artenzusammensetzung aufzeigen. Zudem beschreiben sie Vorteile der Metabarcoding-Methode in Bezug auf die taxonomische Auflösung, die Objektivität, den Durchsatz, die Praktikabilität sowie den zeitlichen und finanziellen Aufwand (Pedro et al., 2021).

Einen Vergleich zwischen der klassischen Probennahme mit Hilfe von Fallen und eDNA führten Gutiérrez-López et al. (2023) in jüngster Zeit durch. Dafür wurden Wasserproben an potenziellen Larvenbrutstellen eines Flusses in Afrika entnommen. Die Autor*innen konnten dabei zeigen, dass im Vergleich zur morphologischen Identifizierung eine höhere Diversität der Mückenarten sowie eine Reihe neuer Mückenarten nachgewiesen wurden. Die Mücken konnten aber größtenteils nur in eDNA-Proben detektiert werden, welche an Stellen genommen wurden an denen Larven sichtbar waren.

Das Metabarcoding wurde in einer Reihe von Studien bereits für ein Monitoring der Biodiversität innerhalb der Organismengruppe der Mücken angewandt. In etablierte Monitoringprogramme ist das Verfahren jedoch noch nicht implementiert worden.

Analog zum Barcoding beruht die Nachweismethode auf einer PCR mit, für das untersuchte Genfragment spezifischen, Primern. Ausgangsmaterial ist jedoch kein einzelnes Individuum, sondern eine Mischprobe oder Umwelt-DNA. Das Metabarcoding untersucht dabei viele Organismen gleichzeitig. Die Verwendung der Methode zur gleichzeitigen Identifikation von vielen genetisch veränderten Organismen wäre ebenfalls möglich. Der Begriff Metabarcoding lässt sich jedoch, analog zum Barcoding, nicht auf das nGVO-Monitoring übertragen. Auch hier muss das mutierte Gen wieder bekannt sein oder alternativ eine Analyse der Probe auf typische genetische Veränderungen durchgeführt werden. Eine Analyse des gesamten Genoms auf unbekannte Mutationen ist hierbei ebenfalls nicht möglich. Zudem müsste bei einer Nutzung der Metabarcoding-Methode im Rahmen eines nGVO-Monitorings darauf geachtet werden, dass die gefundenen Mutationen sich auch einer Mückenart zuordnen lassen.

Eine Implementierung der Nachweismethode in etablierte Monitoringprogramme würde die Bestimmung der Mücken-Diversität vereinfachen. Zudem könnte die Nachweismethode einen Überblick über das Vorkommen von bestimmten Mutationen ermöglichen.

Bakterien

Das DNA-Metabarcoding zeigt sich auf der Grundlage der Daten aus der Recherche als die bevorzugte neuartige molekularbiologische Nachweismethode für Bakterien (Tab. 20, Abb. 15). Sie wird dabei hauptsächlich zur Untersuchung der Artzusammensetzung oder zur allgemeinen Erfassung von Bakterien in einem Gebiet genutzt. Thematisch beschäftigen die Studien sich zum Beispiel mit der Verbreitung von Bakterien, der Quelle von Kontaminationen, dem Einfluss von Temperatur oder Gegenmaßnahmen auf das Bakterienvorkommen, einem Diversitätsmonitoring, dem Nachweis von Bakterien in aquatischen Organismen oder der Identifikation neuer Arten. Zusätzlich dient die Untersuchung des Bakterienvorkommens auch der Bewertung der Wasserqualität. Die Bakterien werden in der Regel aus Wasser-, Sediment- oder Biofilmpuben sowie aus aquatischen Lebewesen gewonnen. Letztere für den Zweck dieser Studie jedoch weniger interessant. Zur taxonomischen Identifizierung der Bakterien wird der 16S-Locus als genetischer Marker genutzt.

Die Autor*innen Danza et al. (2018) untersuchten 2018 die Diversität und die saisonale Dynamik von Bakterien in der Wassersäule des alpinen Cadagno-Sees in der Schweiz mittels Metabarcoding. Die Bakterien wurden dabei in Form von Wasser-Proben aus dem See entnommen. Mittels Hochdurchsatz-Pyrosequenzierung eines Fragments des 16S-Locus konnte die bakterielle Art-Zusammensetzung aufgeschlüsselt werden. Als dominante Artengruppen des Sees stellten sich Proteobakterien, Chlorobi, Verrucomicrobia und Actinobacteria heraus.

In der Studie von Stoeck et al. (2018) wurde das DNA-Metabarcoding zur Analyse der Zusammensetzung benthischer Bakterien unter einer Aquakultur verwendet. Das Bakterien-Vorkommen diente dabei als Bioindikator für die Überprüfung der Umweltverträglichkeit der Lachs-Farm. Für die Analyse wurden Sedimentproben unterhalb der Lachskäfige entnommen und mittels 16S-Metabarcoding hinsichtlich ihrer bakteriellen Art-Zusammensetzung untersucht. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Aquakultur einen erheblichen Einfluss auf die Zusammensetzung der benthischen Bakteriengemeinschaft hatte. Die Autor*innen stellten das DNA-Metabarcoding dabei als eine kostengünstige und zeiteffiziente Hochdurchsatz-Methode hervor, die einem Biomonitoring als Grundlage für Managementstrategien dienen kann.

In einer anderen Studie wurde die Metabarcoding-Methode zur Bestimmung der Bakterien-Zusammensetzung in einer Trinkwasseraufbereitungsanlage genutzt. Die Autor*innen verfolgten dabei einen integrativen Ansatz zur Bewertung der Wasserqualität in verschiedenen Aufbereitungs-Stadien anhand von mikrobiellen Indikatoren. Zur Bestimmung der Bakterien wurde der 16S-Locus als DNA-Marker verwendet. Die Entnahme von Wasser-Proben erfolgte aus neun verschiedenen Phasen der Trinkwasseraufbereitung. Die Bakterien-Zusammensetzung konnte dabei für alle neuen Phasen erfolgreich bestimmt und eine Dynamik in der Diversität der Bakterien entlang der Aufbereitung detektiert werden (Pinar-Méndez et al., 2022).

Das Metabarcoding wurde einige Male zur Untersuchung der Bakterien-Zusammensetzung bestimmter Gewässer verwendet. Die Methode wurde bisher jedoch noch nicht in behördlichen Monitoringprogrammen verwendet.

Analog zu den Mücken beruht die Methode auf einer PCR mit, für das untersuchte Genfragment spezifischen, Primern zur gleichzeitigen Analyse vieler Organismen. Die Verwendung der Nachweismethode zur gleichzeitigen Identifikation von vielen genetisch veränderten Bakterien wäre ebenfalls möglich. Der Begriff Metabarcoding lässt sich jedoch auch hier nicht auf das nGVO-Monitoring übertragen. Analog zu den Mücken muss das mutierte Gen bekannt sein oder alternativ eine Analyse auf typische genetische Veränderungen durchgeführt werden. Dabei müsste auch hier darauf geachtet werden, dass die gefundenen Mutationen sich anschließend einer Bakterienart zuordnen lassen.

Die Metabarcoding-Methode könnte in etablierte Monitoringprogramme integriert werden und die Bestimmung der Bakterienzusammensetzung vereinfachen. Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die Methode einen Überblick über das Vorkommen von bestimmten Mutationen geben.

Mikroalgen

Unter den neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden wurde das DNA-Metabarcoding bisher am häufigsten für die Organismengruppe der Mikroalgen verwendet (Tab. 20, Abb. 15). Es wurde dabei vor Allem zur Aufschlüsselung der Mikroalgenzusammensetzung von Gewässern verwendet. Diese wurde unter anderem im Kontext mit Biodiversitäts-Monitorings, der Verbreitung von bestimmten Algenarten, saisonalen Variationen sowie dem Einfluss von Nährstoffeinträgen oder Bakterienvorkommen auf Mikroalgen genutzt. Zudem findet die Methode Anwendung im Monitoring von toxischen Algenblüten, der ökologischen Bewertung von Gewässern anhand der Artzusammensetzung oder der Untersuchung von Abwasseraufbereitung. In manchen Fällen wurde die Methode hingegen auch zum genomweiten Screening von Mutanten benutzt. Aus methodischer Sicht wurden vor allem genetische Marker verwendet, die auf der Sequenz des 18S- oder ITS-Locus beruhen. Zum Teil wurde aber auch ein Abschnitt des *rbcl*-Gens als DNA-Marker verwendet.

Chonova et al. (2019) nutzen das DNA-Metabarcoding zur Untersuchung der benthischen Mikroalgengemeinschaft eines alpinen Flusses, welcher unter Einfluss von Abwasser aus Abwasseraufbereitungsanlagen steht. Die Mikroalgen-Zusammensetzung gibt dabei oft einen Aufschluss über die Wasserqualität des Fließgewässers. Im Rahmen dieser Studie sollte der Einfluss von Krankenhausabwasser sowie von städtischem Abwasser auf die Zusammensetzung der Diatomeen, einer Gruppe innerhalb der Mikroalgen, ermittelt werden. Die Metabarcoding-Ergebnisse zeigten dabei einen starken Einfluss des Abwassers auf die Diversität und Struktur der benthischen Mikroalgengemeinschaft. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Wasser des Flusses an den Abwassereinleitungsstellen mit verschiedenen chemischen Substanzen kontaminiert war. Anhand des biologischen Diatomeenindex konnten die Autor*innen eine Verschlechterung des ökologischen Zustandes des Gewässers aufgrund der Abwassereinleitung belegen.

In der Studie von Ballesteros et al. (2021) aus dem Jahr 2021 wurde die Mikroalgenzusammensetzung verschiedener Gewässer in Ecuador charakterisiert. Dabei wurden Wasserproben aus verschiedenen Teichen, Wasserspeichern, Lagunen, Seen und Flüssen entnommen und mittels 18S- und *rbcl*- sowie 16S- und ITS-Markern in Hinblick auf das Vorkommen von Chlorophyta und Cyanophyta untersucht. Die Ergebnisse zeigten dabei die Notwendigkeit der Nutzung von zwei verschiedenen Markern zur eindeutigen Identifizierung mancher Mikroalgenarten.

Die Autor*innen Wang et al. (2022) nutzten die Metabarcoding-Methode zur Detektion von toxischen Mikroalgen in verschiedenen Küstengebieten Chinas. Die Proben wurden dabei aus dem Sediment von vier Küstengebiete entnommen und mittels Metabarcoding der 18S-Region hinsichtlich des Vorkommens schädlicher Mikroalgenarten charakterisiert. Anhand der Ergebnisse konnte die Mikroalgendiversität der vier Küstengebiete miteinander verglichen werden. Zusätzlich wurde das Vorkommen toxischer Algenarten mit dem Vorhandensein verschiedener biogener Stoffe sowie dem Feuchtigkeitsgehalt des Sediments verglichen. Hierbei konnte eine positive Korrelation zwischen einer Eutrophierung und dem Vorhandensein schädlicher Kieselalgen festgestellt werden.

Die Metabarcoding-Methode wurde bereits in einer Reihe von Studien zur Untersuchung des Mikroalgenvorkommens in bestimmten Gewässern genutzt. In etablierte Monitoringprogramme ist das Metabarcoding bisher jedoch nicht implementiert.

Analog zu den Mücken und Bakterien beruht die Methode auf einer PCR mit, für das untersuchte Genfragment spezifischen, Primern für die gleichzeitige Untersuchung von vielen Organismen. Eine Verwendung der Methode zur Identifikation von genetisch veränderten Mikroalgen wäre dabei ebenfalls möglich. Der Begriff Metabarcoding lässt sich jedoch auch hier nicht auf das nGVO-Monitoring übertragen. Analog zu den anderen Organismengruppen muss entweder das mutierte Gen bekannt sein, oder es kann eine Analyse auf typische genetische Veränderungen durchgeführt werden. Eine Untersuchung des gesamten Genoms auf unbekannte Mutationen ist nicht möglich. Zudem müsste ebenfalls darauf geachtet werden, dass die gefundenen Mutationen sich anschließend einer Mikroalgenart zuordnen lassen.

Bei einer Implementierung in bestehende Verfahren könnte das Metabarcoding die Bestimmung des Mikroalgenvorkommens im Rahmen etablierter Monitoringprogramme nach WRRRL vereinfachen. In Bezug auf ein nGVO-Monitoring könnte die Methode zudem einen Überblick über das Vorkommen von bestimmten Mutationen in Mikroalgen geben.

Fische

Das DNA-Metabarcoding ist die Methode, welche auch im Fall der Fische am häufigsten angewendet wurde (Tab. 20, Abb. 15). Sie wird dabei größtenteils im Rahmen eines Biodiversitäts-Monitorings genutzt. Des Weiteren findet sie aber auch Anwendung bei der Detektion invasiver Arten(gruppen), der saisonalen und räumlichen Dynamik der Artzusammensetzung, der Identifikation von Arten aus Wasserproben oder Fischprodukten sowie der Quantifizierung des Fischvorkommens in einem Gewässer. Neben dem Biomonitoring von adulten Tieren wird das Metabarcoding jedoch auch zum Monitoring des Ichthyoplanktons in Hinblick auf dessen Zusammensetzung und die Reproduktionsdynamik von Fischarten genutzt. Neben dem COI-Locus wird vor allem der 12S-Locus zur taxonomischen Aufschlüsselung der Fischarten verwendet.

Die Autor*innen Goutte et al. (2020) nutzen das Metabarcoding-Verfahren beispielsweise zur Charakterisierung von Süßwasserfischgemeinschaften großer Fließgewässer in Frankreich. Das Metabarcoding wurde dabei mit der Elektrofischereibasierten Untersuchung verglichen, welche bisher zur jährlichen Analyse der Gewässer nach der WRRRL dient. In der Studie konnte gezeigt werden, dass die Analyse von eDNA im Vergleich zu einer jährlichen sowie einer 3–6-jährigen Elektrofischerei-Erhebung effizienter ist und bessere Ergebnisse in Bezug auf die Arterkennung liefert. Im Vergleich zu einer langfristigen, 14-jährigen Erhebung mittels Elektrofischerei lieferte die eDNA-Analyse hingegen ähnliche bis weniger gute Ergebnisse.

In einer anderen Studie wird das DNA-Metabarcoding zur Untersuchung der Diversität der Fische eines großen Meeresgebietes verwendet. Dabei wurde die Analyse von eDNA mittels Metabarcoding mit der klassischen, auf Schleppnetzen-basierenden Methode verglichen. Für das DNA-Metabarcoding wurde eine kurze Region des 12S-Locus als Marker-Sequenz verwendet. Bei beiden Methoden waren die Europäische Sardelle, die Atlantische Makrele und der Blauer Wittling die am häufigsten vorkommenden Arten. Die eDNA-Analyse konnte jedoch mehr Knochenfisch- und Elasmobranchierarten nachweisen als die Schleppnetzuntersuchung. Zudem konnten die Autor*innen zeigen, dass die ermittelte Verteilung der Arten mit dem aktuellen ökologischen Kenntnissen zu der jeweiligen Fischart übereinstimmt. Die Studie schlägt die Metabarcoding-Analyse daher als kostengünstige, zeiteffiziente und nichtinvasive Methode zur Ergänzung etablierter Monitoringprogramme vor (Fraija-Fernández et al., 2020).

Eine andere Studie untersuchte die Artenvielfalt und -verteilung von Fischlarven in einer Flussmündung in den Mangroven Malaysias. Das Metabarcoding zur taxonomischen Identifikation der Larven soll dabei die Informationen zu adulten Fischen ergänzen. Die Ergebnisse sollen anschließend der Analyse der Fortpflanzung und des Laichverhaltens, der Wahl der Aufzuchtgebiete sowie der Wanderung der Fische dienen. Für die Metabarcoding-Analyse wurden zum einen ein COI-Marker und zum anderen ein Marker für den 12S-Locus verwendet. Die Methode konnte dabei erfolgreich zur Identifizierung der Larven verwendet werden. Eine Validierung der Ergebnisse mittels Barcoding-Analyse lieferte jedoch zum Teil abweichende Ergebnisse und deutete auf eine Kontamination der Metabarcoding-Proben während der Probennahme oder Prozessierung im Labor hin (Alshari et al., 2021).

Das Metabarcoding wurde bereits einige Male zur taxonomischen Aufschlüsselung von Fischen genutzt. In etablierte Monitoringprogramme ist das Verfahren noch nicht implementiert worden. Es wurde jedoch von einigen Wissenschaftler*innen eine Einbindung des Metabarcodings in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL vorgeschlagen.

Analog zu den anderen Organismengruppen beruht das Verfahren auf einer PCR mit, für das untersuchte Genfragment spezifischen, Primern zur gleichzeitigen Untersuchung vieler Fische. Eine Verwendung der Methode zur Identifikation von vielen genetisch veränderten Fischen gleichzeitig wäre dabei ebenfalls denkbar. Der Begriff Metabarcoding lässt sich jedoch auch hier nicht auf das nGVO-Monitoring übertragen. Analog zu den Mücken, Bakterien und Algen muss das mutierte Gen bekannt sein oder eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen durchgeführt werden, da eine Analyse des gesamten Genoms auf unbekannte Mutationen nicht möglich ist. Zudem müsste auch hier wieder darauf geachtet werden, dass die gefundenen Mutationen sich einer Fischart zuordnen lassen.

Eine Implementierung des Metabarcodings in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL würde die Bestimmung des Fischvorkommens sinnvoll ergänzen. Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte das Metabarcoding zudem einen Überblick über das Vorhandensein von bestimmten Mutationen in Fischen geben.

4.2.1.3 Multiplex-PCR

Auch bei dem Nachweisverfahren der Multiplex-PCR wird die taxonomische Identifikation von Organismen anhand einer Marker-Sequenz vorgenommen. Bei der Multiplex-PCR werden dabei mehrere Primerkombinationen in eine PCR-Reaktion zusammengeführt, was die zeitgleiche Amplifikation mehrerer Sequenzen in einem einzigen Reaktionsansatz ermöglicht. Die Nachweismethode lässt sich dabei zwischen dem Barcoding und dem Metabarcoding einordnen. Im Vergleich zum Barcoding ist die mPCR zeitsparender und effizienter, da sie die

gleichzeitige Detektion mehrerer Arten ermöglicht. Der Umfang der taxonomischen Aufschlüsselung ist im Vergleich zum Metabarcoding jedoch deutlich eingeschränkt.

Die Entwicklung einer Multiplex-PCR zudem ist relativ aufwendig. Die genutzten Primerkombinationen müssen dabei die Reaktionsbedingungen der PCR, wie Konzentrationen und Temperatur, aufeinander abgestimmt werden. Neben einer genauen Planung sind dabei oft auch einige Optimierungsdurchläufe nötig. Des Weiteren ist eine Zuordnung der Amplifikate nur möglich, wenn diese sich hinsichtlich ihrer Länge eindeutig voneinander unterscheiden. Andernfalls ist eine Auswertung nur durch eine Markierung der Fragmente mit fluoreszierenden Sonden möglich (Markoulatos et al., 2002; Arnemann, 2019).

Neben der Standard-PCR kann die Multiplex-PCR auch auf die qPCR oder die digitale PCR (dPCR) angewandt werden (Bundesamt für Umwelt, 2020).

Im aquatischen Raum wird die Multiplex-PCR vor allem zur gleichzeitigen Detektion von mehreren invasiven, kryptischen oder nah verwandten Arten eingesetzt (Information aus Referenzdatenbank gewonnen).

Mücken

Die Multiplex-PCR wurde bisher schon ein paar Mal innerhalb der Organismengruppe der Mücken angewendet (Tab. 20, Abb. 15). Die Methode wurde dabei hauptsächlich zur gleichzeitigen Identifikation von mehreren (nahe verwandten) Arten genutzt. Sie fand jedoch auch Anwendung in der Identifikation von kryptischen Spezies, dem Nachweis von saisonalen Veränderungen oder der Detektion von Mutationen.

In der Studie von (Bang et al., 2021a) wurde ein Multiplex-PCR-Assay zur gleichzeitigen taxonomischen Identifikation von sechs Aedini-Arten entwickelt. Bei diesen handelte es sich dabei um die Arten *Aedes flavopictus*, *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus koreicus*, *Ochlerotatus japonicus*, *Ochlerotatus togoi* und *Ochlerotatus hatorii*. Diese Arten können potentiell verschiedene Krankheitserreger auf den Menschen übertragen und sind morphologisch nur schwer voneinander zu unterscheiden. Als DNA-Marker wurde eine Region des ITS2-Locus genutzt, welche sich zwischen allen sechs Arten unterscheidet. Die entwickelten Multiplex-Primer konnten dabei artspezifische Fragmente generieren, die sich eindeutig in ihrer Größe unterscheiden ließen. Anhand der Ergebnisse führten die Autor*innen anschließend eine taxonomische Identifikation der Arten sowie eine Distanzanalyse zwischen den Arten durch.

In einer anderen Studie wurde die Multiplex-PCR zur zeitgleichen taxonomischen Identifizierung von acht Anophelesarten genutzt. Dazu zählten die Arten *Anopheles sinensis*, *Anopheles pullus*, *Anopheles belenrae*, *Anopheles lesteri*, *Anopheles kleini*, *Anopheles sineroides*, *Anopheles koreicus* und *Anopheles lindesayi*. Diese Arten sind dabei potentielle Überträger der Malaria-Infektion und lassen sich zum Teil morphologisch nicht oder nur sehr schwer bestimmen. Im Rahmen des Multiplex-PCR-Assays wurden dabei artspezifische Primer für alle acht Arten entwickelt, die auf den ITS2-Locus abzielen und unterschiedlich lange Amplifikate generierten. Anhand dieser Nachweismethode konnte dabei eine gleichzeitige, schnelle und genaue taxonomische Identifikation aller acht Anopheles-Arten erreicht werden (Bang, et al., 2021b).

Die Methode der Multiplex-PCR ist noch nicht in etablierte Monitoringprogramme implementiert.

Die Multiplex-PCR könnte im Rahmen eines nGVO-Monitoring der gleichzeitigen Untersuchung von ein paar Mückenarten auf ein mutiertes Gen oder auch von mehreren Mutationen innerhalb eines Individuums dienen. Zur Identifikation der genetischen Veränderung muss das

mutierte Gen jedoch wieder bekannt sein. Alternativ wäre auch hier eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen denkbar. Eine Analyse des gesamten Genoms auf unbekannte Mutationen ist folglich auch mittels Multiplex-PCR nicht möglich.

Eine Implementierung der Multiplex-PCR könnte die klassischen Methoden zur taxonomischen Bestimmung von Mücken unterstützen. Zudem könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode eine Untersuchung der Mücken auf eine bekannte oder typische Mutation im Rahmen eines nGVO-Monitorings ermöglichen. Im Gegensatz zum Barcoding erlaubt die Multiplex-PCR dabei eine gleichzeitige Untersuchung auf mehrere genetische Veränderungen. Sowohl die Planung als auch die Entwicklung ist jedoch deutlich aufwendiger.

Bakterien

Im Rahmen der Recherche konnten einige Publikationen zur Anwendung von Multiplex-PCR-Assays in Bakterien gefunden werden (Tab. 20, Abb. 15). Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode wurde dabei zur zeitgleichen Detektion von mehreren Bakterienarten aus Umwelt- oder Fischproben genutzt.

Kheiri et al. (2017) nutzten die Multiplex-PCR zur gleichzeitigen taxonomischen Identifikation von aquatischen Bakterienarten. Dabei entwickelten sie zwei verschiedene Ansätze, die jeweils zum Nachweis von drei Bakterienarten aus Proben der Oberfläche eines Gewässers dienten. Der erste Multiplex-PCR-Assay basierte auf der Detektion von *Escherichia coli* anhand des uidA-Gens, *Shigella sp.* über das Gen int und *Pseudomonas aeruginosa* mit Hilfe der gyrB-Gens. In dem zweiten Ansatz konnte ein DNA-Marker für das invA-Gen zur Identifikation von *Salmonella sp.*, ein ompW-Marker für die Art *Vibrio cholera* und das lacZ-Gen zur Detektion von coliformen Bakterien verwendet werden.

In einer anderen Studie wurde die Verbreitung von verschiedenen *Aeromonas*-Arten mittels Multiplex-PCR untersucht. Dafür wurden hundert Wasserproben aus Flüssen, Quellen, Brunnen, Teichen, dem Meer, chloriertem Wasser und Abwasser entnommen und im Labor analysiert. Dabei wurde eine Multiplex-PCR zur gleichzeitigen Identifikation der Arten *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media* und *Aeromonas veronii* verwendet, welche auf das gcat-Gen abzielt. Mittels dieser Methode konnten die vier Arten in 70 % der untersuchten Proben, in welchen zuvor *Aeromonas spp.* nachgewiesen wurde, detektiert werden (Rafei et al., 2018).

Die Multiplex-PCR ist auch im Fall der Bakterien noch nicht in etablierte Monitoringprogramme implementiert worden.

Analog zu den Bakterien könnte die Nachweismethode der gleichzeitigen Untersuchung von ein paar mutierten Bakterien oder von mehreren Mutationen innerhalb eines Bakteriums dienen. Auch hier muss das mutierte Gen aber bekannt sein, oder alternativ kann eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen durchgeführt werden, da eine Untersuchung auf unbekannte Mutationen mittels Multiplex-PCR nicht möglich ist.

Eine Implementierung der Multiplex-PCR in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL könnte die taxonomische Bestimmung von Bakterien ergänzen. Zudem könnte die Methode der Identifikation von bekannten oder typischen Mutationen in Bakterien im Rahmen eines nGVO-Monitorings dienen. Im Gegensatz zum Barcoding erlaubt die Multiplex-PCR dabei eine gleichzeitige Untersuchung von mehreren genetischen Veränderungen. Die Planung und Entwicklung sind jedoch deutlich aufwendiger.

Mikroalgen

Im Fall der Mikroalgen wurden im Rahmen der Literaturrecherche nur zwei Publikationen gefunden, welche die Multiplex-PCR-Methode anwenden (Tab. 20, Abb. 15). Thematisch beschäftigen sich diese beiden Publikationen dabei mit der gleichzeitigen Detektion von mehreren toxischen Mikroalgenarten.

In der einen Studie wurde die Multiplex-PCR zum Nachweis von schädlichen Mikroalgen entlang der chinesischen Küste verwendet. Die Autor*innen entwickelten dabei einen Ansatz, der auf den ITS-Locus sowie das rDNA-Gen der großen Untereinheit der Mikroalgenarten abzielt. Anhand der Multiplex-PCR konnten dabei die sechs toxischen Mikroalgen *Karlodinium veneticum*, *Chattonella marina*, *Skeletonema sp.*, *Scrippsiella trochoidea*, *Karenia mikimotoi* und *Prorocentrum donghaiense* erfolgreich aus entnommenen Wasserproben identifiziert werden (Sun et al., 2019).

Die andere Studie umfasst die Entwicklung eines Multiplex-PCR-Assays zu Detektion von toxischen Mikroalgen aus dem Ostchinesischen Meer. Bei diesen Arten handelt es sich um die drei dort am häufigsten vorkommenden Arten *Heterosigma akashiwo*, *Prorocentrum donghaiense* und *Karenia mikimotoi*. Die entwickelten, artspezifischen Primer basierten dabei auf der D1-D2-Region rDNA der großen ribosomalen Untereinheit. Die Multiplex-PCR konnte dabei erfolgreich für einen spezifischen Nachweis der drei Mikroalgenarten etabliert werden (Wu et al., 2023).

Wie auch bei den anderen Organismengruppen wurde die Multiplex-PCR bisher noch nicht in etablierte Monitoringprogramme zur Untersuchung von Mikroalgen implementiert.

Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode könnte auch im Fall der Mikroalgen zur gleichzeitigen Untersuchung von ein paar mutierten Algen oder von mehreren Mutationen innerhalb eines Individuums dienen. Analog zu den Mücken und Bakterien muss das mutierte Gen bekannt sein, oder es kann alternativ eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen durchgeführt werden. Eine Untersuchung des gesamten Genoms auf unbekannte Mutationen mittels Multiplex-PCR ist folglich auch im Fall der Algen nicht möglich.

Eine Implementierung der Methode in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL könnte dabei die taxonomische Bestimmung von Mikroalgen unterstützen. In Bezug auf ein nGVO-Monitoring könnte die Multiplex-PCR zudem der Identifikation von bekannten oder typischen Mutationen in Mikroalgen dienen. Im Gegensatz zum Barcoding erlaubt die Multiplex-PCR dabei eine gleichzeitige Untersuchung von mehreren genetischen Veränderungen. Planung und Entwicklung sind hingegen deutlich aufwendiger.

Fische

Für die Fische wurde die Multiplex-PCR-Methode bisher nur selten verwendet (Tab. 20, Abb. 15). In den zusammengestellten Publikationen diente das Verfahren dabei zur parallelen Detektion von (gefährdeten) Fischarten in einem Gewässer.

In der Studie von Hulley et al. (2019) wurde der Multiplex-Ansatz mit der qPCR-Methode kombiniert und für den parallelen Nachweis von verschiedenen Süßwasserfischarten verwendet. Die Autor*innen entwickelten dabei artspezifische Primer und Sonden, die auf das COI-Gen abzielten und der Identifikation des wirtschaftlich wichtigen Weißfischs, Gelbbarschs, Regenbogenstints, der Bachforelle, des Schwarzbarschs, des Runder Felchens, des Spottail Shiners und des Tiefsee-Skorpions dienten. In der Studie konnte die Multiplex-qPCR dabei eine 100 %-ige Genauigkeit bei der Art-Identifikation erreichen. Eine durchgeführte Kosten-

/Zeitvergleichsanalyse mit anderen Identifizierungs-Methoden stellte die Multiplex-qPCR dabei als die kostengünstigste und zeiteffizienteste Methode hervor.

Die Autor*innen Nachtigall et al. (2017) verwendeten die Multiplex-PCR zur molekularen Identifizierung des vom Aussterben bedrohten Dolchhais (*Isogomphodon oxyrhynchus*). Dabei wurde ein Multiplex-PCR-Assay etabliert, der auf das ITS2 abzielt und zur spezifischen Detektion des Dolchhais aus Proben von Fischmärkten dienen konnte.

Auch im Fall der Fische wurde die Multiplex-PCR bisher noch nicht in etablierte Monitoringprogramme implementiert.

Analog zu den anderen Organismengruppen könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei der gleichzeitigen Untersuchung von ein paar mutierten Fischen oder von mehreren Mutationen innerhalb eines Organismus dienen. Auch bei den Fischen muss das mutierte Gen jedoch bekannt sein, oder es kann alternativ eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen durchgeführt werden, da die Analyse des gesamten Genoms auf unbekannte Mutationen mittels Multiplex-PCR nicht möglich ist.

Eine Implementierung der Multiple-PCR in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL könnte dabei die klassischen Methoden zur taxonomischen Identifizierung von Fischen unterstützen. Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die Multiplex-PCR zudem der Analyse von bekannten oder typischen Mutationen in Fischen dienen. Im Gegensatz zum Barcoding erlaubt die Multiplex-PCR dabei eine gleichzeitige Untersuchung auf mehrere genetische Veränderungen. Die Planung und Entwicklung sind hingegen deutlich aufwendiger.

4.2.1.4 qPCR

Bei der quantitativen PCR handelt es sich um ein PCR-Verfahren, welches eine Quantifizierung von DNA oder RNA ermöglicht. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode beruht dabei auf der Nachverfolgung der Amplifikation mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff oder -sonde in Echtzeit. Die Fluoreszenz nimmt proportional zu der Menge der PCR-Produkte zu und ermöglicht so ein Rückschluss auf die DNA- bzw. RNA-Menge. Bei den Fluoreszenzsonden handelt es sich um sequenzspezifische DNA-Sonden, die mit einem fluoreszierenden Reporter markiert sind. Dieser wird bei einer Hybridisierung der Sonde mit ihrer komplementären Sequenz freigesetzt. Alternativ können Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die unspezifisch in die amplifizierte doppelsträngige DNA interkalieren und so das Fluoreszenzsignal freisetzen. Die Spezifität der Reaktion wird hier über die für die Amplifizierung verwendeten Primer erreicht. Die Nutzung von Sonden gilt als spezifischer und sensitiver. Jedoch ist die Entwicklung und Etablierung der Target-spezifischen Sonden relativ aufwendig (Bundesamt für Umwelt, 2020).

Ausgangsmaterial für die qPCR können sowohl biologische Proben, als auch Umweltproben sein. Zudem kann sowohl die DNA, als auch die RNA aus der jeweiligen Probe untersucht werden. Bei einer Verwendung von RNA als Template muss der qPCR jedoch eine Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) vorhergehen. Bei diesem Schritt wird mit Hilfe der Reversen-Transkriptase eine komplementäre DNA generiert (cDNA), welche anschließend durch eine Amplifikation in eine doppelsträngige cDNA umgewandelt wird und anschließend als Matrize in die qPCR eingesetzt werden kann. Die Analyse von RNA ermöglicht dabei zum einen Quantifizierung von Messenger-RNA (mRNA) zur Genexpressionsanalyse oder der Detektion von viraler RNA in der Diagnostik (Adams, 2020). DNA wird in der qPCR vor allem zur Quantifizierung oder Detektion von Organismen eingesetzt. Zusammen mit der dPCR gilt dieser Ansatz dabei als die

geeignetste neuartige molekularbiologische Nachweismethode für den Nachweis einzelner Arten innerhalb einer Umweltprobe (Bundesamt für Umwelt, 2020). Aus der Referenzdatenbank geht hervor, dass die qPCR im aquatischen Zusammenhang neben der Detektion oder Quantifizierung von einzelnen Arten oder Artengruppen, auch für Expressionsanalysen eingesetzt wird.

Eine wesentliche Einschränkung der qPCR ist jedoch die Sensibilität gegenüber Inhibitoren. Diese können sowohl die PCR-Reaktion an sich hemmen, als auch die Fluoreszenz der verwendeten Fluorophore löschen. Ansätze für eine Umgehung der Inhibition sind dabei die Verdünnung oder Reinigung der DNA- bzw. RNA-Extrakte sowie die Nutzung Inhibitortoleranter DNA-Polymerasen (Sidstedt, Rådström und Hedman, 2020).

Die qPCR-Methode war lange Zeit nicht standardisiert. Aufgrund von mangelhaften Ausführungen und der Nutzung ungeeigneter Datenanalysemethoden war eine Reihe von veröffentlichten Daten inkonsistent und falsch. Im Jahr 2009 wurden daher Richtlinien zur qPCR unter dem Namen „Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE)“ veröffentlicht. Diese geben experimentelle Details, Datenanalyse und Berichtsprinzipien vor und ermöglichen die Integrität der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode als genaue und zuverlässige Technologie zu Quantifizierung von DNA oder RNA (Bustin et al., 2009).

Mücken

Die qPCR wurde nach den Daten der Literaturrecherche bereits einige Male in Mücken angewendet (Tab. 20, Abb. 15). Die Methode wurde dabei hauptsächlich zur Expressionsanalyse bestimmter Gene genutzt. Aus genetischer Sicht wurde sie zudem zum Nachweis von Fremdgenen oder des knock-downs von Genen eingesetzt. Aus biologischer Sicht findet die qPCR Anwendung bei der Detektion von invasiven Mückenarten, dem (quantitativen) Nachweis einer bestimmten Art aus einer Mischprobe oder um den Effekt verschiedener Parameter auf das Mückenvorkommen zu untersuchen.

In der Studie von Dörge et al. (2020) wurden unterirdisch überwinternde *Culex pipiens*-Unterarten in Mitteldeutschland mittels qPCR untersucht. Dabei wurden 757 Mückenweibchen aus 52 verschiedenen Standorten, die in den letzten 23 Jahren gesammelt wurden, mittels qPCR analysiert und die Auswirkung verschiedener Parameter auf die Mücken betrachtet. Während manche Unterarten systematisch vorkommen, konnten andere Unterarten nur selten nachgewiesen werden. Feste Muster in der Artenzusammensetzung konnten dabei nicht festgestellt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Wetterbedingungen hauptsächlich Auswirkungen auf Mücken in ihrer aktiven Phase haben und die überwinternden Mücken dafür eher von Parametern der unterirdischen Winterquartiere abhängig sind.

Die qPCR wurde bisher nur selten zur Detektion von Mücken angewandt. Zum Nachweis bzw. zur Expressionsanalyse bestimmter Gene wurde sie jedoch schon öfter verwendet. In etablierte Monitoringprogrammen ist die qPCR noch nicht eingesetzt worden.

Die qPCR könnte dabei zum Nachweis von genetischen Veränderungen in Mücken im Rahmen eines nGVO-Monitorings verwendet werden. Analog zu den anderen PCR-basierten Methoden muss die Mutation jedoch bekannt sein. Alternativ wäre auch hier wieder die Untersuchung von Mücken auf typische genetische Veränderungen möglich. Eine Untersuchung auf unbekannte Mutationen ist auch mittels der qPCR nicht möglich.

Die Methode könnte dabei in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL integriert werden und zum Nachweis von bestimmten Arten oder Artengruppen dienen. Zudem könnten mittels qPCR genetische Veränderungen in Mücken nachgewiesen und so das etablierte Monitoringprogramm mit einer nGVO-Überwachung ergänzt werden. Unter den oben genannten Voraussetzungen wäre die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei sehr gut dafür geeignet.

Bakterien

Die qPCR fand in Zusammenhang mit der Organismengruppe der Bakterien bereits sehr häufig Anwendung (Tab. 20, Abb. 15). Sie wurde dabei vor allem zum Nachweis oder zur Quantifizierung von (Indikator-)Arten genutzt. In manchen Studien wurde die qPCR jedoch auch zur Detektion einer Kontaminationsquelle oder dem Nachweis bakterieller Resistenzgene aus Wasserproben eingesetzt.

In der Studie von Yuan et al. (2018) wurde die qPCR-Methode mit einer Propidiummonoazid-Färbung kombiniert, um lebende *Escherichia coli*-Zellen in Gewässern nachzuweisen. Anhand der Propidiummonoazid-Färbung konnte in der qPCR dabei zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden. Als DNA-Marker wurde das *ycjM*-Gen gewählt, wodurch ausschließlich aus Kontamination stammende *Escherichia coli*-Zellen detektiert wurden. Die Ergebnisse der Studie waren dabei mit anderen, kulturbasierten Standardmethoden vergleichbar.

Die Autor*innen Nguyen et al. (2018) nutzten ein tragbares, Feldversuch-geeignetes qPCR-System zum Nachweis des Bakteriums *Flavobacterium psychrophilum* im Wasser. In der Studie wurde dabei das „Biomeme handheld qPCR system“ für die Vor-Ort-Analyse genutzt. Parallel wurde eine qPCR nach klassischen Protokollen vorgenommen und die Ergebnisse anschließend miteinander verglichen. Die Proben wurden dabei über 23 Tage aus Fischtanks entnommen, in welchen zuvor infizierte Fische untergebracht waren. Beide qPCR-Ansätze konnten erfolgreich zum quantitativen Nachweis von *Flavobacterium psychrophilum* verwendet werden und lieferten dabei vergleichbare Ergebnisse.

In einer anderen Studie wurde die Wirkung eines Desinfektionsmittels auf die mikrobielle Zusammensetzung einer *Oncorhynchus mykiss*-Aquakultur mittels qPCR untersucht. Betrachtet wurde dabei die Quantität von Bakterienarten, welche der Aquakultur als mikrobielle Biofilter dienen. Die Zusammensetzung wurde dabei anhand der Metabarcoding-Methode beobachtet, wobei die Häufigkeit der Bakterien durch eine qPCR ermittelt wurde. Beide neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden zielten dabei auf den 16S-Locus ab. Die Ergebnisse zeigten dabei eine anfängliche Abnahme ammoniakoxidierender Bakterien und nitratoxidierender Bakterien im Falle einer Desinfizierung des Wassers. Zum Ende des Versuchs hin nahmen diese jedoch wieder zu (Suurnäkki et al., 2020).

In Bakterien wurde die qPCR bereits häufig zum Nachweis von bestimmten Arten oder Artengruppen in Gewässern genutzt. In etablierte Monitoringprogramme ist die Methode jedoch noch nicht integriert worden.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die qPCR auch zum Nachweis von genetischen Veränderungen in Bakterien eingesetzt werden. Analog zu den Mücken muss die Mutation jedoch bekannt sein, oder es kann alternativ eine Untersuchung von Bakterien auf typische genetische Veränderungen erfolgen. Eine Analyse auf unbekannte Mutationen ist auch hier nicht möglich.

Eine Implementierung der qPCR in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL könnte zum Nachweis von bestimmten Arten oder Artengruppen dienen und die Programme um ein nGVO-Monitoring ergänzen. Unter den oben genannten Voraussetzungen wäre die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei sehr gut dafür geeignet.

Mikroalgen

Die qPCR wurde bereits relativ häufig in Mikroalgen angewandt (Tab. 20, Abb. 15). Thematisch dient sie dabei zum quantitativen Nachweis einer bestimmten Art oder des allgemeinen Mikroalgenvorkommens. Des Weiteren wurde die Methode bisher zur Expressionsanalyse bestimmter Gene oder der Untersuchung von zellinternen Biomarkern verwendet.

Hatfield et al. (2019) nutzten das qPCR-Verfahren in ihrer Studie für einen Nachweis der toxischen Mikroalge *Alexandrium sp.* aus europäischen Meeresgebieten. Als DNA-Marker wurde dabei eine Sequenz des 18S-Locus verwendet. Die Ergebnisse der qPCR wurden anschließend mit denen einer Lichtmikroskopie-basierten Untersuchung verglichen. Beide Arten eigneten sich dabei zum Nachweis und zur Quantifizierung der schädlichen Algenart. Die qPCR-Methode war jedoch spezifischer, sensitiver und zeigte eine höhere Korrelation mit Toxizitätsdaten.

In einer anderen Studie wurde die qPCR zur Untersuchung des Phytoplanktons in zwölf großen Flüssen Amerikas über drei Jahre untersucht. Zu dem untersuchten Phytoplankton zählte dabei auch eine Reihe von Mikroalgen. Die Zusammensetzung und das Vorkommen des Phytoplanktons wurden zur Beurteilung des Zustands der Gewässer genutzt. Die qPCR-basierte Identifizierung und Quantifizierung des Phytoplanktons sollte zusätzlich mit der klassischen Mikroskopie verglichen werden. Die Ergebnisse beider Methoden wiesen dabei eine positive Korrelation zueinander auf (Zhang et al., 2023).

Die qPCR wurde bereits in einigen Studien zum (quantitativen) Nachweis von bestimmten Mikroalgenarten oder Artengruppen in Gewässern genutzt. In etablierte Monitoringprogrammen wird die Methode bisher jedoch noch nicht eingesetzt.

Die qPCR könnte zudem dem Nachweis von genetischen Veränderungen in Mikroalgen im Rahmen eines nGVO-Monitorings dienen. Auch im Fall der Algen muss die Mutation jedoch bekannt sein oder alternativ eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen erfolgen. Eine Detektion von unbekannten Mutationen ist dabei auch für Mikroalgen nicht möglich.

Im Rahmen etablierter Monitoringprogramme nach WRRL könnte die qPCR zum Nachweis von bestimmten Mikroalgenarten oder Artengruppen dienen oder diese Programme um eine Detektion von genetisch veränderten Algen ergänzen. Unter den oben genannten Voraussetzungen wäre die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei sehr gut dafür geeignet.

Fische

Im Rahmen der Literaturrecherche konnten einige Publikationen zusammengestellt werden, welche sich mit einer Anwendung der qPCR in Fischen beschäftigen (Tab. 20, Abb. 15). Die Methode wurde dabei vor allem zur Detektion von gefährdeten oder invasiven Fischarten verwendet. In manchen Studien wurde das Verfahren jedoch auch zur Expressionsanalyse eines bestimmten Gens genutzt.

Die Autor*innen Atkinson et al. (2018) nutzen die qPCR zum quantitativen Nachweis des Atlantischen Lachses aus Umweltproben. Die Ergebnisse sollten dabei einer Untersuchung der Verbreitung dieser Art dienen. Die qPCR-Analyse erfolgte dabei mit artspezifischen Primern, welche auf das COI-Gen abzielten. Die Methode konnte dabei erfolgreich zum quantitativen Nachweis des Atlantischen Lachses genutzt werden und stellte eine alternative, nicht-invasive Methode zur Bestimmung der Verbreitung dieser Art dar.

In einer anderen Studie wurde die qPCR für eine Detektion des Dickkopfkarpfens in Ichthyoplankton-Proben verwendet. Im Rahmen dieser Studie sollte dabei ein auf der qPCR-basierendes, genetisches Screening-Tool entwickelt werden, welches als Alternative zu den herkömmlichen, kosten- und zeitaufwendigen Methoden dienen kann. Die Proben wurden dabei aus drei verschiedenen Flüssen entnommen und die qPCR mit einem Duplex-Assay kombiniert. Dieser diente dabei einer vorhergehenden Selektion von Proben, bei denen das Vorkommen des Dickkopfkarpfens wahrscheinlich ist. Anhand der qPCR konnten dabei Vorkommen und relative Häufigkeit dieser Art innerhalb des Ichthyoplanktons erfolgreich ermittelt werden (Fritts et al., 2019).

Pont et al. (2023) nutzten die qPCR in Kombination mit dem Metabarcoding für ein quantitatives, umfassendes Monitoring verschiedener Fischgemeinschaften der Donau. Die qPCR diente dabei zur Ermittlung der absoluten Häufigkeit der untersuchten Fischarten. Die relativen Häufigkeiten aus dem Metabarcoding ähnelten dabei den Ergebnissen der absoluten Quantifizierung mittels qPCR. Anhand der Ergebnisse dieser Studie ließen sich dabei Längsveränderungen der Fischgemeinschaften entlang der Donau nachweisen. Die Autor*innen schlagen die Kombination aus Metabarcoding und qPCR dabei als Methode für ein Biomonitoring und zur Abschätzung der Artenhäufigkeit vor.

Die qPCR wurde schon in einigen Studien zum Nachweis von Fischen genutzt. In etablierte Monitoringprogramme wurde die Methode bisher jedoch noch nicht implementiert.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die qPCR dabei zum Nachweis von genetisch veränderten Fischen dienen. Hierbei muss jedoch wieder die Mutation bekannt sein oder alternativ eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen durchgeführt werden. Eine Detektion von unbekannten Mutationen ist analog zu den anderen Organismengruppen nicht möglich.

Eine Implementierung der qPCR in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL könnte dem Nachweis von bestimmten Fischarten oder Artengruppen dienen und eine Identifikation von genetisch veränderten Fischen ermöglichen. Unter den oben genannten Voraussetzungen wäre die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei sehr gut dafür geeignet.

4.2.1.5 dPCR

Bei der digitalen PCR handelt es sich ebenfalls um eine neuartige molekularbiologische Nachweismethode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Diese stellt die neuste Entwicklung unter den PCR-Verfahren dar und ähnelt der qPCR-Methode. Wie auch bei der qPCR werden Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzmarkierte Sonden zur Quantifizierung der DNA- oder RNA-Menge in einer Probe verwendet. Technisch unterscheiden sich beide neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden jedoch voneinander. Bei der dPCR werden die eingesetzten DNA/cDNA-Moleküle jeweils in einen von vielen Reaktionsräumen vereinzelt. Dafür werden Mikrofluidik-Chips, Microarrays, Mikrotröpfchen oder Tröpfchenkristallen auf Basis von Öl-Wasser-Emulsionen (digital droplet PCR, ddPCR) verwendet. Durch die Trennung der

einzelnen Moleküle kann anhand der Anzahl an Reaktionskammern, die ein positives Fluoreszenzsignal zeigen auf die Anzahl der in der Probe vorhandenen DNA-Moleküle geschlossen werden. (Bundesamt für Umwelt, 2020; Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik, 2023).

Während die qPCR eine Einschätzung der DNA/RNA-Menge anhand eines Standards ermöglicht, erlaubt die dPCR die Bestimmung der absoluten Kopienzahl. Im Vergleich zur qPCR weist die dPCR zudem eine höhere Präzision, Spezifität und Sensitivität auf. Des Weiteren ist die dPCR weniger fehleranfällig, da die Quantifizierung nicht durch Inhibitoren, Hintergrundsignale oder Änderungen in der Amplifikationseffizienz beeinflusst wird. Vorteile der qPCR sind jedoch ein höherer Durchsatz, ein geringerer Aufwand und gut etablierte Protokolle (QIAGEN GmbH, 2023).

Die dPCR wurde bereits mehrfach für das aquatische Biomonitoring eingesetzt und dient vor allem dem Nachweis einzelner Arten aus einer Umweltprobe (Bundesamt für Umwelt, 2020).

Mücken

Im Rahmen dieser Recherche konnten für die dPCR-Methode eine Reihe von Publikationen gefunden werden, welche sich auf die Organismengruppe der Mücken beziehen (Tab. 20, Abb. 15). Die Studien wenden die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei ausschließlich für genetische Untersuchungen an. Die dPCR findet beispielsweise Anwendung bei der Detektion von (Fremd-)Genen, Mutationen, CRISPR/Cas-basierten Editierungen oder der Funktionsanalyse eines Gens. Des Weiteren wird das Verfahren zur Untersuchung molekularer Veränderungen nach einer bestimmten Fütterung genutzt.

In der Studie von (Carballar-Lejarazú et al., 2020) wurde die dPCR zum Nachweis von CRISPR/Cas-vermittelten Indels in Mücken verwendet. Die dPCR wurde dabei mit Indel Detection by Amplicon Analysis (IDAA) verglichen. Beide Methoden konnten dabei genaue und reproduzierbare Ergebnisse zur Editierungs-Frequenz in mehreren Mücken-Proben dienen. Die Autor*innen stellen dabei heraus, dass beide Techniken sich auch für Hochdurchsatzanalysen in Käfigversuchen und in geschlossenen Feldtests von Gene-Drive-Mücken eignen würden.

Carballar-Lejarazú et al. (2021) veröffentlichten ein Protokoll zum Nachweis von Indel-Mutationen in gentechnisch veränderten Anopheles-Mückenpopulationen mittels dPCR. In dem Protokoll werden dabei alle Schritte einer Identifizierung und Quantifizierung von CRISPR/Cas-vermittelten Indels in Mücken ausgeführt. Die Autor*innen konnten dabei den Prozentsatz von Indel-Allelen in verschiedenen geneditierten Mücken anhand der dPCR-Methode ermitteln. Sie schlagen die Methode zur Untersuchung der Präsenz und relative Häufigkeit von Indel-Mutationen in geneditierten Mückenpopulationen vor.

Die dPCR wurde in Mücken bisher ausschließlich zur genetischen Untersuchung eingesetzt. In etablierte Monitoringprogramme wurde die neuartige molekularbiologische Nachweismethode zudem noch nicht angewendet.

Analog zu der qPCR könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode zum Nachweis von genetisch veränderten Mücken im Rahmen eines nGVO-Monitorings dienen. Auch im Fall der dPCR muss jedoch die Mutation bekannt sein. Alternativ kann ebenfalls wieder eine Untersuchung von Mücken auf typische genetische Veränderungen erfolgen. Eine Analyse von Mücken auf unbekannte Mutationen ist analog zu den anderen PCR-basierten Methoden nicht möglich.

Die dPCR könnte in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL zum Nachweis bestimmter Mückenarten oder Artengruppen eingesetzt werden. Des Weiteren würde die neuartige molekularbiologische Nachweismethode eine Identifikation von genetisch veränderten Mücken im Rahmen eines nGVO-Monitorings ermöglichen. Unter den oben genannten Voraussetzungen wäre die neuartige molekularbiologische Nachweismethode sehr gut dafür geeignet. Die dPCR weist dabei eine höhere Genauigkeit, Spezifität und Sensitivität als die qPCR auf und ist weniger fehleranfällig. Die qPCR ist bisher jedoch besser etabliert und weiterverbreitet, sie ermöglicht zudem einen höheren Durchsatz, ist kostengünstiger und weniger aufwendig.

Bakterien

Die dPCR wurde bereits einige Male innerhalb der Organismengruppe der Bakterien angewandt (Tab. 20, Abb. 15). Sie wurde dabei zum Beispiel zur Detektion sowie zur Quantifizierung einer Art, zur Untersuchung der Verbreitung von Bakterienarten oder zur Identifizierung einer Kontaminationsquelle genutzt. Des Weiteren findet die dPCR Anwendung beim Monitoring der Wasserqualität auf der Grundlage des Vorkommens bestimmter Bakterienarten sowie dem Nachweis von Veränderungen in der Artzusammensetzung nach einer Handlung zur Verbesserung der Wasserqualität.

Das Review von Tiwari et al. (2022) beschreibt die dPCR zur Quantifizierung von bakteriellen Indikatorarten in Gewässern. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dient dabei vor Allem der Überwachung der Wasserqualität. Die dPCR wurde bereits zur quantitativen Untersuchung von fäkalen Indikatorbakterien, dem Nachweis von Markergenen zur Identifikation mikrobieller Quellen sowie der quantitativen Detektion von Krankheitserregern in verschiedenen Gewässern eingesetzt. Laut den Autor*innen stellt die dPCR eine kostengünstige und zeiteffiziente Methode zur Überwachung der aquatischen Mikroorganismen dar. Sie raten jedoch dazu sich nicht alleine auf diese neuartige molekularbiologische Nachweismethode zu verlassen und stellen bisherige Unsicherheiten und Einschränkungen heraus.

Crain et al. (2021) nutzen die dPCR zum Nachweis von *Enterococcus sp.* in Küstengewässern und zur darauf basierenden Bewertung der Wasserqualität. Die entnommenen Wasserproben wurden dabei sowohl mittels dPCR, als auch durch die qPCR untersucht und die Ergebnisse beider neuartiger molekularbiologischer Nachweismethoden verglichen. Sowohl die dPCR, als auch die qPCR ermöglichten dabei die quantitative Bestimmung des *Enterococcus sp.*-Vorkommens mit hoher Genauigkeit.

Die dPCR wurde bereits in einigen Studien zur Detektion von bestimmten Bakterien in ausgewählten Gewässern eingesetzt. In etablierte Monitoringprogramme ist die neuartige molekularbiologische Nachweismethode jedoch noch nicht implementiert worden.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnten neuartige molekularbiologische Nachweismethoden dabei zum Nachweis von genetisch veränderten Bakterien dienen. Auch hier muss die Mutation jedoch bekannt sein, oder alternativ könnte eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen erfolgen, da eine Analyse auf unbekannte Mutationen nicht möglich ist.

Im Rahmen von etablierten Monitoringprogrammen nach WRRL könnte die dPCR zum Nachweis von Bakterien(-Arten) eingesetzt werden oder diese Instrumente um ein nGVO-Monitoring erweitern. Unter den oben genannten Voraussetzungen wäre die neuartige molekularbiologische Nachweismethode sehr gut dafür geeignet. Die dPCR weist dabei eine höhere Genauigkeit, Spezifität und Sensitivität als die qPCR auf und ist weniger fehleranfällig. Die qPCR

ist bisher jedoch besser etabliert und weiterverbreitet, sie ermöglicht zudem einen höheren Durchsatz, ist kostengünstiger und weniger aufwendig.

Mikroalgen

Im Falle der Mikroalgen wurde die dPCR bereits in einer Reihe von Publikationen angewendet (Tab. 20, Abb. 15). Thematisch beziehen sich diese Publikationen zum Beispiel auf die Quantifizierung einer (toxischen) Mikroalgenart in einem Gewässer sowie der Detektion von saisonalen Dynamiken. Zusätzlich dazu wird die Methode auch in der Biotechnologie oder der Analyse von Genexpressionen genutzt.

Lee et al. (2020) nutzen die dPCR zur Quantifizierung von schädlichen *Alexandrium*-Arten. Die Studie soll der Entwicklung eines dPCR-Ansatzes zur Ergänzung der herkömmlichen Methoden etablierter Monitoringprogramme für toxische Algenarten dienen. Im Rahmen dieser Studie wurde die dPCR dabei zur Identifizierung und Quantifizierung der drei Mikroalgenarten *Alexandrium affine*, *Alexandrium catenella* und *Alexandrium pacificum* verwendet. Als Marker wurde dabei ein Abschnitt des ITS-Locus gewählt. Die Ergebnisse konnten dabei erfolgreich zum quantitativen Nachweis der drei Arten sowie zur Detektion von saisonalen Veränderungen eingesetzt werden.

In der Studie von Min und Kim (2023) wurde das dPCR-Verfahren zu Quantifizierung von *Alexandrium*-Arten in der sogenannten Koreastraße genutzt. Die Ergebnisse sollten dabei der Validierung von im Rahmen der Publikation erstellten Vorhersagen zum saisonalen Vorkommen der Mikroalgenarten gemacht werden. Die dPCR konnte dabei erfolgreich zum Nachweis solcher saisonalen Veränderungen in der Häufigkeit der drei *Alexandrium*-Arten genutzt werden.

Die dPCR wurde bereits einige Male zum (quantitativen) Nachweis von Mikroalgen eingesetzt. In etablierte Monitoringprogramme ist die neuartige molekularbiologische Nachweismethode jedoch auch im Fall der Algen bisher nicht integriert worden.

Die dPCR könnte dabei im Rahmen eines nGVO-Monitorings zum Nachweis von genetisch veränderten Mikroalgen dienen. Analog zu den anderen Organismengruppen muss die Mutation jedoch bekannt sein, oder alternativ kann eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen erfolgen.

Die dPCR könnte in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL zur Detektion von Mikroalgen eingesetzt werden. Zudem könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode ein Monitoring von nGVO ermöglichen. Die dPCR weist dabei eine höhere Genauigkeit, Spezifität und Sensitivität als die qPCR auf und ist weniger fehleranfällig. Die qPCR ist bisher jedoch besser etabliert und weiterverbreitet, sie ermöglicht zudem einen höheren Durchsatz, ist kostengünstiger und weniger aufwendig.

Fische

Die dPCR-Methode wurde bereits relativ häufig innerhalb der Organismengruppe der Fische angewandt (Tab. 20, Abb. 15). Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode wurde dabei unter anderem zur Detektion einer bestimmten Art, der Untersuchung des Fischvorkommens in einem Gebiet, dem Nachweis von saisonalen Veränderungen sowie der Quantifizierung der Reproduktivität bzw. Laichaktivität der Fische. Des Weiteren wurde die dPCR bereits zum Nachweis sowie der Quantifizierung einer Art in prozessierten Produkten eingesetzt.

Die Autor*innen Thomson-Laing et al. (2021) wendeten die dPCR zum Nachweis von Langflossenaalen und Kurzflossenaalen in limnischen Gewässern an. In der Studie wurden dabei

Wasser- sowie Sedimentproben entnommen und anschließend eine dPCR durchgeführt, welche auf den Cytb- sowie den 16S-Locus abzielt. Die Wasserproben wurden zusätzlich mittels Metabarcoding untersucht und die Ergebnisse beider Methoden miteinander verglichen. Die dPCR konnte dabei erfolgreich zur absoluten Quantifizierung beider Aalarten verwendet werden. Die Häufigkeiten korrelierten dabei stark mit den relativen Häufigkeiten aus der Metabarcoding-Analyse.

In einer weiteren Studie wurde die dPCR-Analyse zum Monitoring der gefährdeten Störart *Acipenser sinensis* eingesetzt. Dafür wurden über mehrere Monate Wasserproben an mehreren Stellen des natürlichen Lebensraums des Störs entnommen und im Labor analysiert. Im Rahmen dieser Studie wurden artspezifische dPCR-Primer entwickelt und zum Nachweis der Fischart in den eDNA-Proben genutzt. Die Methode konnte dabei erfolgreich zur quantitativen Bestimmung des *Acipenser sinensis*-Bestandes genutzt werden (Yu et al., 2021).

Die dPCR wurde bereits in einigen Studien zum Nachweis von Fischen angewendet. In etablierte Monitoringprogramme wurde die neuartige molekularbiologische Nachweismethode jedoch bisher nicht implementiert.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die dPCR dabei zum Nachweis von genetisch veränderten Fischen eingesetzt werden. Die Mutation muss jedoch auch hier bekannt sein, oder alternativ könnten Fische auf typische genetische Veränderungen untersucht werden.

In etablierte Monitoringprogramme nach WRRL könnte die dPCR dem Nachweis von Fischen dienen oder im Rahmen eines nGVO-Monitorings zur Detektion von genetischen veränderten Fischen eingesetzt werden. Die dPCR weist dabei eine höhere Genauigkeit, Spezifität und Sensitivität als die qPCR auf und ist weniger fehleranfällig. Die qPCR ist bisher jedoch besser etabliert und weiterverbreitet, sie ermöglicht zudem einen höheren Durchsatz, ist kostengünstiger und weniger aufwendig.

4.2.1.6 LAMP

Die Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ist eine isotherme neuartige molekularbiologische Nachweismethode zur DNA-Amplifikation. Die LAMP stellt eine Alternative zur PCR dar, wobei sie im Gegensatz zur PCR bei konstanter Temperatur abläuft. Für die Amplifikation werden vier bis sechs Primer und eine Polymerase mit strand-displacement-Aktivität verwendet. Die Primer gliedern sich dabei in zwei äußere und zwei innere Primer auf sowie zwei optionale Primer, die mit dem Amplikon hybridisieren und DNA-Schleifen ausbilden. Der Nachweis der Amplifikation erfolgt visuell und kann je nach verwendeter Technik photometrisch oder mit dem bloßen Auge detektiert werden.

Im Falle einer vorhergehenden Reversen Transkription kann neben der DNA auch RNA als Ausgangs-Nukleinsäure dienen. Die LAMP-Methode lässt sich mit vielen anderen Methoden kombinieren und bietet zusätzlich die Möglichkeit eines Multiplexings und einer Quantifizierung (Becherer et al., 2020).

Die LAMP-Methode konnte bereits erfolgreich als aquatisches Biomonitoring-Verfahren zur Detektion verschiedenster Arten aus Umweltproben angewandt werden (Deliveyne et al., 2023).

Die Methode erreicht aufgrund der erhöhten Anzahl an Primern eine äußerst hohe Spezifität der Reaktion. Zusätzlich gilt sie als zuverlässig, effizient, kostengünstig und sehr schnell. Da die neuartige molekularbiologische Nachweismethode sehr unaufwändig und ohne große Ausstattung durchzuführen ist, eignet es sich sehr gut für Feldversuche. Nachteilig ist jedoch ein

sehr komplexes und aufwendiges Primerdesign, welches durch die Verwendung mehrerer Primer gleichzeitig bedingt wird. Des Weiteren steht bisher eine weitreichende Etablierung und Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode noch aus (Becherer et al., 2020; Deliveyne et al., 2023).

Mücken

Im Rahmen dieser Recherche wurden keine Publikationen gefunden, welche die Anwendung der LAMP-Methode in Mücken beschreiben.

Bakterien

Das LAMP-Verfahren wurde bereits einige Male bei aquatischen Bakterien angewandt. Es wurde dabei hauptsächlich zur Detektion einer Bakterienart aus der Umwelt verwendet (Tab. 20, Abb. 15). Des Weiteren wurde die LAMP-Methode auch zum Nachweis von Bakterien in Fischprodukten, der Determination von (fäkalen) Indikatorarten oder der Detektion bestimmter (Fremd-)Gene in Bakterien genutzt.

In einer Studie von Martzy et al. (2017) wurde die LAMP-Methode für einen schnellen Nachweis von Enterokokken aus Wasserproben eingesetzt. Das Vorhandensein von *Enterococcus* sp. lässt dabei auf eine fäkale Kontamination des Wassers schließen. Im Rahmen dieser Studie wurden sechs spezifische Primer entwickelt, die auf das 23S rRNA-Gen abzielten. Die Reaktion wurde anschließend für 45 Minuten in einem Heizblock bei konstanter Temperatur ausgetragen. Das Ergebnis konnte mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs innerhalb einer Minute visualisiert werden und war mit dem bloßen Auge zu erkennen. Die Methode führte dabei erfolgreich zu einem Nachweis von *Enterococcus* sp. aus Gewässern. Eine Validierung mit Hilfe einer qPCR konnte dabei zeigen, dass der LAMP-basierte Nachweis von Enterokokken sehr spezifisch und sensitiv ist.

Die Autor*innen Lee et al. (2019) nutzten die LAMP-Methode ebenfalls zur Detektion fäkaler Indikatorarten aus Wasserproben. Die beiden Bakterienarten *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis* sollten dabei sowohl aus Süßwasser, als auch aus Meerwasser nachgewiesen werden. Für die Durchführung der Studie wurden sechs Enterokokken-spezifische Primer designet, welche auf das uidA-Gen und das 23S rRNA-Gen abzielten. Die Autor*innen verwendeten dabei ein tragbares LAMP-Gerät in Verbindung mit einer Spritzenfilter-basierenden DNA-Extraktionsmethode. Anhand dieser Methode konnte dabei eine Untersuchung auf Enterokokken zur Beurteilung der Wasserqualität innerhalb von einer Stunde erfolgen.

Die LAMP-Methode wurde bereits zur Detektion von aquatischen Bakterien eingesetzt, aber ist bisher noch nicht in etablierte Monitoringprogramme integriert worden.

Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode könnte im Rahmen eines nGVO-Monitorings zum Nachweis von genetischen Veränderungen in Bakterien eingesetzt werden und eignet sich dabei auch sehr gut für Feldversuche. Die Mutation muss jedoch bei der LAMP-Methode ebenfalls bekannt sein. Alternativ wäre auch hier eine Untersuchung von Bakterien auf typische genetische Veränderungen möglich. Eine Detektion von unbekannten Mutationen ist dabei nicht möglich.

Im Rahmen von etablierten Monitoringprogrammen könnte die LAMP-Methode einen Nachweis von Bakterien vor Ort oder im Labor ermöglichen sowie genetische Veränderungen in Bakterien nachweisen. Unter den oben genannten Voraussetzungen würde die neuartige molekularbiologische Nachweismethode sich dafür sehr gut eignen. Sie ist dabei sehr spezifisch,

schnell und kostengünstig. Das Design der Primer ist jedoch sehr komplex und aufwendig. Zudem ist eine Standardisierung der Methode noch ausstehend.

Mikroalgen

Im Rahmen dieser Literaturrecherche konnten eine Reihe von Publikationen zur Verwendung der LAMP-Methode in Mikroalgen gefunden werden (Tab. 20, Abb. 15). Die Methode wurde dabei vor Allem zur Detektion einer Mikroalgenart genutzt.

In der Studie von Fujiyoshi et al. (2021) wurde das LAMP-Verfahren zur schnellen Erkennung von marinen Mikroalgenarten an vier Standorten in Chile verwendet. Bei diesen Arten handelte es sich dabei um die toxischen Algen *Alexandrium pacificum* und *Alexandrium catenella*. Für jeder dieser Arten wurden dabei sechs artspezifische Primer entwickelt, die auf den 28S-Locus abzielten. Die Autor*innen entwickelten zusätzlich ein sogenanntes „Suitcase Lab“ zur Probennahme, Filtration, DNA-Extraktion, LAMP und dem Nachweis der Ergebnisse vor Ort. Bei im Rahmen dieser Studie durchgeführten Feldversuchen konnte dieses System dabei erfolgreich zum qualitativen Nachweis von *Alexandrium sp.* aus verschiedenen Gewässern verwendet werden. Die Ergebnisse waren dabei mit denen einer mikroskopischen Untersuchung vergleichbar.

In einer anderen Studie wurde die LAMP-Methode zum Nachweis der zwei benthischen Mikroalgenarten *Ostreopsis cf. ovata* und *Amphidinium massartii* verwendet. Dafür wurden jeweils sechs artspezifische LAMP-Primer designt, die auf das ITS-Gen sowie das LSU-Gen abzielten. Die analysierten Proben stammten dabei aus koreanischen Küstengewässern. Die LAMP-Methode konnte dabei erfolgreich zum Nachweis der beiden Mikroalgenarten aus den Umweltproben verwendet werden. Die Sensitivität der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden war dabei mit gebräuchlichen molekularen Methoden wie der PCR oder der qPCR sowie mit einer mikroskopischen Untersuchung vergleichbar (Lee et al., 2021).

In einer Reihe von Studien wurde die LAMP-Methode bereits für ein Monitoring von Mikroalgen eingesetzt. Die Methode ist jedoch bisher nicht in etablierte Monitoringprogramme implementiert worden.

Die LAMP-Methode könnte dabei zum Nachweis von genetisch veränderten Mikroalgen im Rahmen eines nGVO-Monitorings eingesetzt werden. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode eignet sich auch im Falle der Algen sehr gut für Feldversuche. Die Mutation muss jedoch analog zu den Bakterien bekannt sein, oder alternativ kann eine Untersuchung auf typische genetische Veränderungen erfolgen.

Die Methode kann in etablierten Monitoringprogrammen nach WRRL zum Nachweis von Mikroalgen vor Ort oder im Labor dienen. Ergänzend dazu könnte ein nGVO-Monitoring realisiert werden. Unter den oben genannten Voraussetzungen würde die neuartige molekularbiologische Nachweismethode sich dafür sehr gut eignen. Sie ist dabei sehr spezifisch, schnell und kostengünstig. Das Design der Primer ist jedoch sehr komplex und aufwendig. Zudem ist eine Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode noch ausstehend.

Fische

Innerhalb der Organismengruppe der Fische wurde die LAMP-Methode bisher nur selten eingesetzt (Tab. 20, Abb. 15). Anwendung fand die Methode dabei bisher in der Unterscheidung zweier Arten oder der Überprüfung der Deklaration von Fischprodukten.

Die Autor*innen Spielmann et al. (2019) setzten das LAMP-Verfahren zur Abgrenzung des Europäischen Aal (*Anguilla anguilla*) von anderen Arten der Gattung *Anguilla* ein. Dafür wurden artspezifische LAMP-Primer, welche auf den CLEC-Locus abzielten, für den Europäischen Aal sowie für drei nah verwandte Arten entwickelt. Im Rahmen dieser Studie konnte die LAMP-Methode durch eine Reihe von Tests als eine schnelle, sensitive und spezifische Methode zur Identifikation des Europäischen Aal und seiner nahen Verwandten herausgestellt werden. Die Autor*innen weisen dabei auch auf eine Eignung der Methode für Feldversuche hin.

In einer anderen Studie wurde die LAMP-Methode zur Identifikation der Thunfischart *Katsuwonus pelamis* aus prozessierten Fischprodukten verwendet. Die Autor*innen entwickelten dabei LAMP-Primer, die auf das Cytb-Gen abzielten und testeten deren Spezifität gegenüber einer Reihe von anderen Fischarten. Die Primer wurden anschließend zur Untersuchung verschiedener verarbeiteter Produkte mittels LAMP-Verfahren eingesetzt. Die Art *Katsuwonus pelamis* konnte dabei in ein paar Proben nachgewiesen werden, bei einer Reihe von Produkten stellte sich jedoch eine falsche Kennzeichnung raus. Die Ergebnisse der LAMP-Methode konnten dabei anhand einer DNA-Sequenzierung bestätigt werden (Xiong et al., 2021).

Die LAMP-Methode wurde in Fischen bisher eher selten zur taxonomischen Identifizierung eingesetzt und wurde auch noch nicht in etablierte Monitoringprogramme implementiert.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dem Nachweis von genetisch veränderten Fischen dienen. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode eignet sich dabei ebenfalls sehr gut für Feldversuche. Die Mutation muss jedoch analog zu den anderen Organismengruppen bekannt sein. Alternativ könnte auch hier eine Untersuchung von Fischen auf typische genetische Veränderungen erfolgen.

Die LAMP-Methode könnte etablierte Monitoringprogramme nach WRRL in der taxonomischen Bestimmung der Fische unterstützen oder diese mit einem Nachweis von genetisch veränderten Organismen ergänzen. Unter den oben genannten Voraussetzungen würde die neuartige molekularbiologische Nachweismethode sich dafür sehr gut eignen. Sie ist dabei sehr spezifisch, schnell und kostengünstig. Das Design der Primer ist jedoch sehr komplex und aufwendig. Zudem ist eine Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode noch ausstehend.

4.2.1.7 RPA

Wie die LAMP-Methode ist auch die Recombinase Polymerase Amplifikation (RPA) ein isothermes Verfahren zur Amplifikation von DNA. Neben einer Polymerase mit strand-displacement-Aktivität verwendet das RPA-Verfahren dabei auch eine Rekombinase und ein Einzelstrang-bindendes Protein. Die Rekombinase unterstützt dabei die Anlagerung der Primer an die Template-DNA und ermöglicht zusammen mit dem Einzelstrang-bindenden Protein die Initiation der Amplifikation. Wie bei der LAMP werden auch bei der RPA zwei innere und zwei äußere Primer verwendet. Die Amplifikation findet hier aber bei deutlich geringerer Temperatur statt und kann mit geringer Geschwindigkeit sogar bei Raumtemperatur ablaufen. Der Nachweis der Amplifikation kann zum Beispiel durch einen Lateral Flow Assay (LFA), eine Gelelektrophorese, eine Farbreaktion oder eine Fluoreszenzmessung erfolgen.

Die RPA-Methode kann dabei ebenfalls DNA oder RNA analysieren sowie mit anderen Methoden kombiniert und für ein Multiplexing oder eine Quantifizierung verwendet werden (Lobato und O'Sullivan, 2018; Li, Macdonald und Stetten, 2019).

Bisher wurde das RPA-Verfahren im aquatischen Kontext vor allem zur Detektion einer Art aus einer Umweltprobe oder zum Nachweis von Mutationen verwendet (Information aus Referenzdatenbank gewonnen).

Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode gilt dabei als einfach anwendbar, schnell, sensitiv und sehr spezifisch. Gegenüber anderen isothermen Amplifikationsmethoden sind vor allem die niedrige Reaktionstemperatur und der noch niedrigere Zeitaufwand von 15-25 Minuten für eine Amplifikation vorteilhaft. Wie andere isothermen Amplifikationsverfahren eignet sich die RPA dabei auch sehr gut für Feldversuche. Die Entwicklung und Optimierung der Primer ist jedoch relativ aufwendig und die neuartige molekularbiologische Nachweismethode ist methodisch zum Teil sehr eingeschränkt (Kits unflexibel und nicht frei verkäuflich, Aufreinigung vor manchen Auswertungsverfahren nötig, Inkompatibilität mit Taq-Man-Sonden, etc.). Wie die LAMP-Methode ist auch die RPA bisher nicht standardisiert und bedarf noch weitreichender Etablierungen (Lobato und O’Sullivan, 2018; Li, Macdonald und Stetten, 2019).

Mücken

Im Fall der Mücken konnte nur eine Publikation zur Anwendung der RPA-Methode in Mücken gefunden werden (Tab. 20, Abb. 15).

Bei dieser Studie Ahmed et al. (2022) wurde die RPA-Methode mit einem Lateral-Flow-Assay kombiniert und zur Detektion einer Mutation in *Aedes aegypti* eingesetzt. Bei dieser Mutation handelt es sich dabei um die knock down resistance (kdr) mit der Bezeichnung F1534C, welche eine Resistenz gegenüber dem Insektizid Pyrethroid bedingt. Parallel zu dem RPA-LFA-Ansatz wurde eine Allel-spezifische qPCR zur Validierung der Ergebnisse durchgeführt. Die RPA-Methode erlaubte dabei einen Nachweis der kdr-Mutation in sowohl homozygoten, als auch heterozygoten *Aedes aegypti*-Mücken. In den durchgeführten Versuchen wies die Methode eine Spezifität und Sensitivität von 100 % auf. Die Probenverarbeitungs- und Analysezeit lag bei der qPCR dabei bei ungefähr sechs Stunden, bei dem RPA-LFA-Verfahren hingegen bei ungefähr 25 Minuten.

Die RPA-Methode ist bisher in keines der etablierten Monitoringprogramme integriert worden. Es konnte jedoch eine Publikation gefunden werden, in welcher die neuartige molekularbiologische Nachweismethode zum Nachweis einer Mutation in Mücken eingesetzt wurde.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die Methode dabei dem Nachweis von genetischen Veränderungen in Mücken dienen. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode eignet sich wie die LAMP-Methode ebenfalls sehr gut für Feldversuche. Die Mutation muss jedoch auch hier bekannt sein, oder es könnte eine Untersuchung von Mücken auf typische genetische Veränderungen erfolgen. Eine Detektion von unbekannten Mutationen ist auch mittels der RPA-Methode nicht möglich.

Im Rahmen von etablierten Monitoringprogrammen nach WRRL könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode für einen Nachweis von einer Mückenart oder Artengruppe vor Ort oder im Labor eingesetzt werden sowie die Programme um eine Identifikation von genetischen Veränderungen in Mücken ergänzen. Wie auch die LAMP-Methode wäre die RPA unter den oben aufgeführten Voraussetzungen sehr gut dafür geeignet. Die RPA ist dabei noch schneller, methodisch aber mehr eingeschränkt. Eine Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode ist ebenfalls noch ausstehend.

Bakterien

In Bakterien wurde die RPA-Methode schon relativ häufig angewendet (Tab. 20, Abb. 15). Sie wird dabei beispielsweise zur Detektion einer bestimmten Art in Gewässern, im Abwasser oder in Fischprodukten eingesetzt. Des Weiteren findet sie Anwendung beim Nachweis von bestimmten (Resistenz-)Genen in Bakterien.

Die Autor*innen Sollweck et al. (2021) wendeten die RPA-Methode zum Monitoring von Oberflächengewässern in Hinblick auf das Vorhandensein von antimikrobiellen Resistenzgenen sowie von Antibiotika-resistenten Bakterien an. Die Methode wurde dabei zuerst an verschiedenen Bakterienkolonien getestet und anschließend auf mehrere Wasserproben angewandt. Das RPA-Verfahren konnte dabei erfolgreich zur Detektion von Bakterienarten und dem Nachweis von Resistenzgenen in den Bakterien eingesetzt werden. Durch eine Ausweitung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode zu einem Chip-Based Colony Fusion RPA Assay konnte sie dabei auch erfolgreich für ein Multiplexing genutzt werden.

In einer anderen Studie wurde die RPA-Methode mit dem Lateral-Flow-Assay kombiniert und zur Detektion von Enterokokken aus Wasserproben eingesetzt. Dafür wurden Abwasser- und Gewässerproben auf das Vorhandensein der fäkalen Indikatorart *Enterococcus faecalis* untersucht. Im Rahmen dieser Studie konnte dabei ein Nachweis der Bakterien aus verschiedenen Gewässern nach ungefähr 30 Minuten erfolgen. Die Methode wurde dabei als sehr schnell, kostengünstig, hochspezifisch und für Vor-Ort-Untersuchungen-geeignet eingestuft. Die Sensitivität der Methode war jedoch 10 - 1.000-fach geringer als bei herkömmlichen Methoden (Batra et al., 2023).

Im Fall der Bakterien wurde die RPA-Methode bereits in einigen Studien für ein Monitoring zum Vorkommen von Bakterien in Wasserkörpern genutzt. In etablierte Monitoringprogramme ist die neuartige molekularbiologische Nachweismethode jedoch bisher nicht implementiert worden.

Die RPA-Methode könnte im Rahmen eines nGVO-Monitorings zum Nachweis von genetischen Veränderungen in Bakterien dienen. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode eignet sich dabei auch im Fall der Bakterien sehr gut für Feldversuche. Analog zu den Mücken muss die Mutation jedoch bekannt sein, oder die Bakterien könnten auf typische genetische Veränderungen untersucht werden, da eine Detektion von unbekannten Mutationen nicht möglich ist.

Etablierte Monitoringprogramme nach WRRL könnten dabei in Hinblick auf den Nachweis von Bakterien vor Ort oder im Labor unterstützt werden. Des Weiteren könnte die RPA-Methode genetische Veränderungen in Bakterien detektieren. Wie auch die LAMP-Methode wäre die RPA unter den oben aufgeführten Voraussetzungen sehr gut dafür geeignet. Die RPA ist dabei noch schneller, methodisch aber mehr eingeschränkt. Eine Standardisierung der Methode ist ebenfalls noch ausstehend.

Mikroalgen

Im Rahmen dieser Recherche konnte eine Reihe von Publikationen gefunden werden, die sich mit der Anwendung der RPA-Methode in Mikroalgen beschäftigen (Tab. 20, Abb. 15). Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode wurde dabei zum Nachweis einer bestimmten Art aus Umweltproben genutzt.

Die Autor*innen Toldrà et al. (2019a) kombinierten die RPA-Methode mit dem Sandwich-Hybridisierungs-Assay für eine Detektion und einer Quantifizierung der taxonomischen

Mikroalgenarten *Ostreopsis cf. ovata* und *Ostreopsis cf. siamensis*. Arten der Gattung *Ostreopsis* lassen sich dabei morphologisch nicht voneinander unterscheiden. Im Rahmen dieser Studie wurden planktonische und benthische Umweltproben aus verschiedenen Standorten der katalanischen Küste und anschließend im Labor untersucht. Zur Validierung der Ergebnisse wurde zusätzlich eine qPCR und eine mikroskopische Untersuchung durchgeführt. Die RPA-SHA-Methode konnte dabei erfolgreich zum qualitativen Nachweis beider Mikroalgenarten eingesetzt werden. Die Ergebnisse zeigten dabei eine signifikante Korrelation mit den Daten der herkömmlichen Methoden.

In der Studie von Toldrà et al. (2019b) wurde die benthische Mikroalgenart *Ostreopsis cf. ovata* mittels RPA-SHA-Ansatz quantitativ nachgewiesen. Die Autor*innen testeten dabei die Sensitivität und Spezifität dieser Methode und setzten eine qPCR sowie einen kolorimetrischen Test zur Validierung ein. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode konnte dabei erfolgreich zum Nachweis der Mikroalge *Ostreopsis cf. ovata* eingesetzt werden.

In Mikroalgen wurde die RPA-Methode bereits zum Nachweis von bestimmten Algen eingesetzt, sie wurde bisher jedoch nicht in etablierte Monitoringprogramme integriert.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei genetische Veränderungen in Mikroalgen detektieren. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode eignet sich analog zu den anderen Organismengruppen sehr gut für Feldversuche. Auch bei den Mikroalgen muss die Mutation jedoch bekannt sein, oder es kann eine Untersuchung von Mikroalgen auf typische genetische Veränderungen erfolgen.

Die RPA-Methode könnte durch den Nachweis von Mikroalgen vor Ort oder im Labor etablierte Monitoringprogramme nach WRRL unterstützen oder diese um ein Monitoring von nGVO ergänzen. Wie auch die LAMP-Methode wäre die RPA unter den oben aufgeführten Voraussetzungen sehr gut dafür geeignet. Die RPA ist dabei noch schneller, methodisch aber mehr eingeschränkt. Eine Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode ist ebenfalls noch ausstehend.

Fische

Die RPA-Methode wurde bisher nur selten innerhalb der Organismengruppe der Fische angewandt (Tab. 20, Abb. 15). Sie wurde dabei vor Allem zur Überprüfung der Authentizität von Fischprodukten eingesetzt.

Wang et al. (2022) kombinierten die RPA-Methode mit einem Lateral-Flow-Assay zur Identifizierung des Atlantischen Lachs (*Salmo salar*). Da dieser sehr aufwendig zu züchten ist wird die nahe verwandte, kosteneffizientere Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) oft als Atlantischer Lachs deklariert und verkauft. Zur taxonomischen Untersuchung solcher Proben wurde ein RPA-LFA-Ansatz entwickelt welcher auf das Myoglobin-Gen abzielt. Die Ergebnisse wurden über ein COI-basiertes Barcoding validiert. Die RPA-LFA-Methode konnte dabei eine schnelle, hochpräzise und sensitive Identifikation des Atlantischen Lachs erreichen.

In einer anderen Studie wurden RPA und LFA kombiniert, um die Makrele in frischen oder konservierten Produkten nachzuweisen. Dafür wurde ein Ansatz entwickelt, der die Identifizierung der Makrelenarten *Scomber scombrus*, *Scomber japonicus* und *Scomber colias* ermöglicht. Neben dem RPA-LFA-Assay wurde in dieser Studie zudem ein DNA-Barcoding durchgeführt (Frigerio et al., 2023).

Die RPA-Methode diente in einigen Studien bereits der Identifikation von Fischen, wurde jedoch bisher nicht im Rahmen von etablierten Monitoringprogrammen eingesetzt.

Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode könnte dabei genetische Veränderungen in Fischen im Rahmen eines nGVO-Monitorings nachweisen. Analog zu den anderen Organismengruppen muss die Mutation jedoch bekannt sein, oder es könnte eine Untersuchung von Fischen auf typische genetische Veränderungen durchgeführt werden.

Die RPA-Methode könnte etablierte Monitoringprogramme nach WRRL zur Bestimmung oder Detektion von Fischen dienen. Des Weiteren könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode ein nGVO-Monitoring von Fischen ermöglichen. Wie auch die LAMP-Methode wäre die RPA unter den oben aufgeführten Voraussetzungen sehr gut dafür geeignet. Die RPA ist dabei noch schneller, methodisch aber mehr eingeschränkt. Eine Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode ist ebenfalls noch ausstehend.

4.2.1.8 MALDI-TOF MS

Das Verfahren der Massenspektrometrie (MS) wird allgemein zur Identifikation von Molekülen verwendet. Der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode liegt dabei zugrunde, dass die zu untersuchenden Moleküle desorbiert, ionisiert, in einem elektrischen Feld beschleunigt und anschließend in Hinblick auf ihr „Masse-zu-Ladung-Verhältnis“ (m/z) analysiert werden (McCullagh und Oldham, 2019).

Die massenspektrometrische Methode, die im aquatischen Biomonitoring die meiste Anwendung findet, ist die Kombination aus Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) und Flugzeitanalyse (time of flight, TOF). Diese ermöglicht unter anderem die taxonomische Identifikation von Organismen aus biologischen Proben oder Umweltproben. Die taxonomische Zuweisung beruht dabei auf der Analyse der proteomischen Zusammensetzung, wobei verschiedene Arten einen unterschiedlichen „proteomischen Fingerabdruck“ aufweisen (Popović et al., 2017).

Die Methode gilt dabei als sehr zeit- und kosteneffizient und weist eine hohe Spezifität auf. Da die Identifikation auf komplexen Musterunterschieden basiert, besitzt dieses jedoch nur eine geringe Sensitivität. Zudem ist die Methode teilweise fehleranfällig, bedingt eine gut etablierte Referenzbibliothek und sollte wenn möglich durch eine Sequenz-basierte Methode ergänzt werden (Popović et al., 2017; Surányi et al., 2023).

Mücken

Die Kombination der Methoden MALDI-TOF MS wurde in den letzten Jahren bereits relativ häufig in Mücken angewandt (Tab. 20, Abb. 15). Sie wurde dabei vor allem zur Identifizierung von Mücken sowie von deren Larven eingesetzt. Des Weiteren diene das Verfahren bisher der Untersuchung von Mücken in Hinblick auf eine Insektizidresistenz.

In der Studie von Nebbak et al. (2018) wurde die MALDI-TOF MS-Methode zur taxonomischen Identifizierung von im Feld gesammelten Mückenlarven genutzt. Dafür wurden 559 Individuen an 13 verschiedenen Standorten in Frankreich gesammelt. Anschließend wurde ein Teil der Proben mittels DNA-Barcoding analysiert, ein anderer Teil der Proben mittels MALDI-TOF MS untersucht und für einen weiteren Teil wurden beide Methoden angewendet. Die Larven konnten dabei erfolgreich den Arten *Culiseta longiareolata*, *Culex pipiens*, *Culex hortensis*, *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus caspius* und *Anopheles maculipennis* zugeordnet werden. Die Rate der erfolgreichen taxonomischen Identifizierung war im Fall der MALDI-TOF MS bei Larven im Frühstadium sowie im Puppenstadium niedriger. Die Autor*innen begründeten dies in einem geringeren Proteinvorkommen im Frühstadium sowie dem Vorgang der Metamorphose im Puppenstadium.

In einer anderen Studie wurde die MALDI-TOF MS-Analyse zur Identifikation von Mücken erstmals anhand ihrer Exuvien durchgeführt. Den Autor*innen gelang dabei die taxonomische Identifizierung von *Aedes albopictus* und *Aedes aegypti* auf der Grundlage von Exuvien des vierten Larven- sowie des Puppenstadiums. Durch die Verwendung der Exuvien für eine MALDI-TOF MS-Analyse kann dabei die Euthanasie der Mücken vermieden werden (Nebbak und Almeras, 2020).

Die MALDI-TOF MS ist bisher in kein etabliertes Monitoringprogramm implementiert. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode wurde aber bereits in einer Reihe von Studien zur Identifizierung von Mücken genutzt.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die MALDI-TOF MS zum Nachweis von genetischen Veränderungen in Mücken eingesetzt werden. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die Proteinzusammensetzung zwischen WT und Mutante sich signifikant unterscheiden. Dabei wäre auch eine Detektion von unbekannten Mutationen möglich, eine genaue Identifikation der genetischen Veränderung jedoch nicht.

Die MALDI-TOF MS könnte die Bestimmung von Mücken im Rahmen von etablierten Monitoringprogrammen unterstützen. Zusätzlich könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode zwischen Wildtyp und nGVO differenzieren, falls die genetische Veränderung eine Variation im Massenspektrum der Mücken bedingt. Die MALDI-TOF MS ist dabei zwar sehr zeit- und kosteneffizient, sie weist aber eine geringe Sensitivität auf und gilt teilweise als fehleranfällig.

Bakterien

Die MALDI-TOF MS wurde bereits einige Male innerhalb der Organismengruppe der Bakterien eingesetzt (Tab. 20, Abb. 15). Sie diente dabei vor allem zur Identifizierung von Bakterien aus aquatischen Umwelt- oder aus Fischproben. Des Weiteren fand die neuartige molekularbiologische Nachweismethode bereits Anwendung zur Untersuchung der bakteriellen Artzusammensetzung oder der Analyse genetischer Diversität.

Suzuki et al. (2018) nutzten die MALDI-TOF MS zur Analyse von Abwasser, Flusswasser und Grundwasser in Hinblick auf das Vorkommen von Kolibakterien. Zur Validierung der MALDI-TOF MS-Analyse wurden die entnommenen Proben zusätzlich mittels Sequenzierung des 16S-Locus identifiziert und die Ergebnisse beider Methoden miteinander verglichen. Beide Methoden führten dabei erfolgreich zur Detektion von Kolibakterien in allen Wasserkörpern, wobei die Arten *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* und *Serratia sp.* vorherrschend waren. Die Rate der Übereinstimmung beider Methoden bei der Identifizierung der Bakterien lag bei 96 % (Abwasser), 74 % (Flusswasser) beziehungsweise 62 % (Grundwasser) auf Gattungsebene.

In einer anderen Studie wurde die MALDI-TOF MS zur Analyse der Diversität der Bakterien in der Nähe von Aquakulturanlagen verwendet. Die Proben wurden dabei aus angrenzenden, oberflächlichen Küstengewässern entnommen. Die MALDI-TOF MS konnte dabei erfolgreich zur Identifikation der Bakterienzusammensetzung genutzt werden. Die Studie empfiehlt dabei die Nutzung der sogenannten Ribopeaks-Datenbank im Falle einer Analyse von Bakterien aus Umweltproben (Freitas et al., 2022).

Die MALDI-TOF MS wurde bereits in einigen Studien zur Identifizierung der Bakterienart eingesetzt. Die Methode wurde jedoch noch nicht in etablierte Monitoringprogramme angewendet.

Die MALDI-TOF MS könnte dabei im Rahmen eines nGVO-Monitorings zur Detektion von genetisch veränderten Bakterien dienen. Die Proteinzusammensetzung muss sich dafür jedoch detektierbar zwischen Wildtyp und Mutante unterscheiden. Dabei wäre aber auch eine Detektion von unbekannten Mutationen möglich. Die genetische Veränderung kann jedoch mittels MALDI-TOF MS nicht an sich identifiziert werden.

Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode könnte etablierte Monitoringprogramme nach WRRL bei der Bestimmung von Bakterien unterstützen. Für den Fall, dass das Massenspektrum von genetisch veränderten Bakterien sich vom Wildtyp unterscheidet, würde die MALDI-TOF MS auch ein Monitoring von nGVO ermöglichen. Die MALDI-TOF MS ist dabei zwar sehr zeit- und kosteneffizient, sie weist aber eine geringe Sensitivität auf und gilt teilweise als fehleranfällig.

Mikroalgen

Innerhalb der Organismengruppe der Mikroalgen wurde die MALDI-TOF MS bisher nur selten angewendet (Tab. 20, Abb. 15). Thematisch beschäftigen sich die vier gefundenen Studien dabei mit der taxonomischen Identifikation einer Algenart sowie der Unterscheidung zwischen nah verwandten Arten.

In der Studie von Mello et al. (2017) wurde die MALDI-TOF MS zur Unterscheidung grüner Mikroalgen aus der Familie Selenastraceae verwendet. Im Rahmen der Studie wurden dabei 18 Algenstämme aus zwölf verschiedenen Arten untersucht. Die MALDI-TOF MS Analyse konnte dabei erfolgreich zur taxonomischen Identifizierung verwendet werden und ermöglichen eine bessere Unterscheidung der Gattungen *Ankistrodesmus* und *Monoraphidium* als andere Nachweismethoden.

Die Autor*innen Baumeister et al. (2020) nutzten die MALDI-TOF MS zur taxonomischen Identifizierung von Mikroalgen aus Phytoplanktonproben. In dieser Studie wurden dabei erstmals einzelne Zellen zur Identifizierung der Mikroalgenart verwendet. Im Rahmen dieser Studie wurden mehrere hundert Algenzellen analysiert. Die MALDI-TOF MS erlaubte dabei eine taxonomische Bestimmung der einzelnen Mikroalge auf Gattungs- und Artenebene mit einer hohen Genauigkeit.

Die MALDI-TOF MS wurde nur ein paar Mal zur taxonomischen Identifizierung von Mikroalgen eingesetzt. Sie ist bisher auch nicht in etablierte Monitoringprogramme integriert worden.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dem Nachweis von genetischen Veränderungen in Mikroalgen dienen. Die Proteinzusammensetzung muss dabei jedoch zwischen Wildtyp und Mutante differenzieren. Während eine Detektion von unbekannten Mutationen mittels MALDI-TOF MS möglich ist, kann die genetische Veränderung anhand der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode nicht genau identifiziert werden.

Etablierte Monitoringprogramme nach WRRL könnten dabei anhand der MALDI-TOF MS in der taxonomischen Bestimmung von Mikroalgen unterstützt werden. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode kann zudem eine Identifizierung von genetisch veränderten Algen ermöglichen, solange deren Massenspektren sich vom Wildtyp unterscheiden. Die MALDI-TOF MS ist dabei zwar sehr zeit- und kosteneffizient, sie weist aber eine geringe Sensitivität auf und gilt teilweise als fehleranfällig.

Fische

Auch im Fall der Fische wurde die MALDI-TOF MS-Analyse bisher nur selten angewandt (Tab. 20, Abb. 15). Sie diene dabei jedoch bereits zur taxonomischen Identifizierung von Fischen aus der Umwelt sowie von Fischeiern oder Fischprodukten.

In der Studie von Rossel et al. (2021) wurde die MALDI-TOF MS zur Identifizierung von Fischeiern auf Artenebene verwendet. Diese ist dabei für die Untersuchung der Reproduktivität von Fischen von Bedeutung und stellt eine schnelle und kostengünstige Alternative zum herkömmlichen COI-Barcoding dar. Im Rahmen dieser Studie wurden dabei Fischeier mittels COI-Barcoding identifiziert und anschließend mittels MALDI-TOF MS untersucht, um eine MALDI-TOF MS-Referenzbibliothek zu erstellen. Diese Bibliothek wurde dann zur taxonomischen Identifikation von unbekannten Fischeiern verwendet. Die MALDI-TOF MS führte dabei mit einer Genauigkeit von 97,5 % zu einer korrekten Bestimmung der Art.

Die Autor*innen Maasz et al. (2020) führten eine MALDI-TOF MS-Analyse zur taxonomischen Identifizierung kryptischer Arten durch. Die Studie sollte dabei der Bestandsaufnahme von verschiedenen *Gobio* spp.-Populationen dienen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Muskelgewebe als auch das Gehirn der Fische als Ausgangsmaterial eigneten. Zudem wurde ein Einfluss der mittelfristigen Lagerung der Proben auf die Ergebnisse festgestellt. Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Ergebnisse der MALDI-TOF MS deuteten dabei darauf hin, dass die Methode sich nur bedingt zur Unterscheidung von kryptischen Arten eignet. Die Autor*innen schlagen dabei eine Ergänzung der MALDI-TOF MS-Methode durch weiterführende Analysen vor.

Wie bei den Mikroalgen wurde die MALDI-TOF MS bei den Fischen bisher nur in ein paar Studien zur taxonomischen Identifizierung eingesetzt. Auch eine Implementierung in etablierte Monitoringprogramme ist bisher nicht erfolgt.

Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode könnte zur Detektion von genetisch veränderten Fischen dienen. Die Proteinzusammensetzung muss sich dafür jedoch zwischen Wildtyp und Mutante unterscheiden lassen. Ein Nachweis von unbekannten Mutationen ist dabei anhand der Methode möglich ist, eine genaue Bestimmung der genetischen Veränderung kann jedoch nicht erfolgen.

Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode könnte dabei unterstützend zur taxonomischen Bestimmung in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL angewandt werden. Bei einer Unterscheidung zwischen Wildtyp und nGVO in Hinblick auf die Massenspektren könnte die MALDI-TOF MS zudem auch eine Untersuchung auf genetische Veränderungen ermöglichen. Die MALDI-TOF MS ist dabei zwar sehr zeit- und kosteneffizient, sie weist aber eine geringe Sensitivität auf und gilt teilweise als fehleranfällig.

4.2.1.9 HRM

Bei der High-Resolution Meltig (HRM) – Analyse handelt es sich um eine Post-PCR-Methode zur Identifizierung von Variationen in Nukleinsäuresequenzen. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode basiert darauf, dass Unterschiede in der Zusammensetzung, der Länge, dem GC-Gehalt oder der Strangkomplementarität der Sequenzen unterschiedliche Schmelzpunkte bedingen.

Der vorhergehenden PCR ist dabei ein mit ds-DNA interkalierender Farbstoff zuzufügen. Anschließend findet die HRM-Analyse statt, bei der die Probe mit einer konstanten Rate erhitzt wird. Die Dissoziation des Amplikons kann dann durch die Freisetzung des Farbstoffs

nachverfolgt und als Schmelzkurve aufgezeichnet werden. Anhand ihrer Schmelzkurve lassen sich selbst kleinste Unterschiede in Nukleinsäuresequenzen detektieren.

Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode wird dabei häufig zur Genotypisierung, zur Detektion von Mutationen oder der Identifikation von bestimmten Sequenzen in einer Probe eingesetzt (Venkatesh, 2022).

Im aquatischen Raum wird die neuartige molekularbiologische Nachweismethode hauptsächlich zur Identifikation einer Art oder deren Larven sowie zur Untersuchung von Mutationen in einem Gen eingesetzt (Information aus Referenzdatenbank gewonnen).

Die HRM-Analyse gilt dabei als einfach anwendbare, flexible und kostengünstige neuartige molekularbiologische Nachweismethode mit hoher Sensibilität und Spezifität. Sie weist jedoch auch einige Einschränkungen auf. So kann im Falle von identischen Sequenzabschnitten bei verschiedenen Arten nicht zwischen diesen unterschieden werden. Des Weiteren bedarf es bisher noch einer Standardisierung und weiteren Optimierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode.

Mücken

Die HRM-Analyse wurde bereits in einer Reihe von Studien angewandt (Tab. 20, Abb. 15). Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dient dabei unter anderem zur taxonomischen Identifikation von adulten Mücken oder deren Larven. Des Weiteren wurde die HRM-Analyse zur Genotypisierung von (CRISPR/Cas-generierten) Mutanten oder zur Detektion von (Fremd-)Genen in Mücken eingesetzt.

Kim, Lee und Sim (2018) nutzten die HRM-Methode zur Identifizierung von drei Biotypen der Art *Culex pipiens*. Bei diesen handelte es sich um die Mücken *Culex pipiens f. molestus*, *Culex pipiens f. pipiens* und *Culex pipiens quinquefasciatus*. Die Autor*innen entwickelten dabei Biotyp-spezifische molekulare Marker, die auf Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) basieren und in der HRM-Analyse eingesetzt wurden. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode konnte dabei erfolgreich zur Identifikation der Biotypen sowie zur Detektion von Hybriden verwendet werden.

In der Studie von Barrera-Illanes et al. (2023) wurde die HRM-Analyse zur Detektion von *kdr*-Mutationen in *Aedes aegypti*-Wildpopulationen aus Argentinien verwendet. Die Analyse zielte dabei auf zwei bekannte knock down-Mutationen (V1016I und F1534C) ab, die eine Resistenz gegen das Insektizid Pyrethroid bewirken und deren Häufigkeit in natürlichen Mückenpopulationen zugenommen hat. Im Rahmen dieser Studie wurden dabei Larven und adulte Mücken von mehreren Regionen Argentiniens entnommen. Mittels einer im Rahmen dieser Studie entwickelten Multiplex-HRM-Analyse konnten das Vorhandensein und die Häufigkeit der beiden *kdr*-Mutationen erfolgreich in den untersuchten Wildpopulationen bestimmt werden.

Die HRM-Analyse wurde in Mücken bereits zur taxonomischen Identifizierung sowie zum Nachweis von genetischen Veränderungen eingesetzt. In etablierte Monitoringprogramme wird die neuartige molekularbiologische Nachweismethode bisher jedoch nicht genutzt.

Die HRM-Analyse könnte auch im Rahmen eines nGVO-Monitorings zur Detektion von genetisch veränderten Mücken eingesetzt werden. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode setzt dabei jedoch voraus, dass sich die Schmelzkurve von Wildtyp und Mutante unterscheiden. Da es sich bei der HRM-Analyse um eine Post-PCR-Methode handelt, muss die Mutation analog zu den PCR-basierten Methoden bekannt sein. Eine genaue Identifikation der genetischen Veränderung ist mittels HRM-Analyse nicht möglich.

Die HRM-Analyse könnte in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL integriert werden und würde eine schnelle und kostengünstige Identifikation von genetisch veränderten Mücken ermöglichen. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode ist dabei jedoch sehr eingeschränkt, da sie an mehrere Voraussetzungen geknüpft ist. Eine weitreichende Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode ist ebenfalls noch ausstehend.

Bakterien

Die HRM-Analyse wurde innerhalb der Organismengruppe der Bakterien schon einige Male eingesetzt (Tab. 20, Abb. 15). Sie wurde dabei vor Allem zur Detektion von bestimmten Bakterienarten aus Wasserproben oder aus Fischen angewandt. Zusätzlich dazu wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf das Bakterienvorkommen untersucht sowie bestimmte (Fremd-)Gene in Bakterien nachgewiesen.

Die Autor*innen Izzo et al. (2019) nutzten die HRM-Methode zur Charakterisierung bestimmter Bakterien aus einem Mündungsgebiet Südamerikas. Dieses Gebiet gilt als wichtiges Fischereigebiet, ist jedoch durch die Ölindustrie und Hafenaktivitäten durch Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) belastet. Ein wichtiger Bestandteil dieses Ökosystems sind daher PAK-abbauende Bakterien. Im Rahmen dieser Studie wurde daher ein HRM-basierter Nachweis für ein Monitoring dieser Bakterienarten entwickelt. Dieser eignete sich dabei zur Identifizierung von acht verschiedenen PAK-abbauenden Bakteriengattungen. Für die Gattungen *Pseudomonas*, *Halomonas* und *Vibrio* ermöglichte die HRM-Analyse zusätzlich eine Differenzierung auf Artebene.

In einer anderen Studie von Bender et al. (2020) wurde ein HRM-Assay zur Detektion und der taxonomischen Identifizierung der Bakterien *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* und *Clostridioides difficile* entwickelt. Die Bakterienarten wiesen dabei alle unterschiedliche Schmelztemperaturen in der HRM-Analyse auf, sodass ein Multiplexing der Methode möglich war. Die Autor*innen konnten so einen gleichzeitigen, spezifischen Nachweis der Arten *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* und *Escherichia coli* erreichen.

Die HRM-Analyse wurde in Bakterien bisher vor allem zur Detektion von Bakterien aus Wasserproben eingesetzt. In etablierte Monitoringprogramme ist die neuartige molekularbiologische Nachweismethode noch nicht integriert worden.

In Hinblick auf ein nGVO-Monitoring könnte die HRM-Analyse dem Nachweis von genetischen Veränderungen von Bakterien dienen. Analog zu den Mücken muss sich die Schmelzkurve von Wildtyp und Mutante dafür jedoch unterscheiden und die Art oder Position der Mutation bekannt sein. Auch im Fall der Mücken ist eine genaue Identifikation der genetischen Veränderung jedoch nicht möglich.

Eine Implementierung der HRM-Analyse in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL würde eine schnelle und kostengünstige Identifikation von genetisch veränderten Bakterien ermöglichen. Analog zu den Mücken ist die neuartige molekularbiologische Nachweismethode jedoch sehr eingeschränkt. Eine weitreichende Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode ist ebenfalls noch ausstehend.

Mikroalgen

In Mikroalgen wurde die HRM-Analyse bisher relativ selten angewendet (Tab. 20, Abb. 15). Die zusammengetragenen Publikationen beschäftigen sich dabei mit der taxonomischen

Identifikation von Mikroalgen sowie der Detektion von Mutationen oder bestimmten Genen in einer Alge.

In der Studie von Pugliese et al. (2017) wurde die HRM-Analyse zur Identifizierung der toxischen Mikroalge *Pseudo-nitzschia sp.* aus dem Mittelmeer verwendet. Die Autor*innen untersuchten dabei die Spezifität des Assays anhand einer Reihe von nah verwandten Arten. Des Weiteren wurde eine Validierung der entwickelten HRM-Methode anhand einer phylogenetischen Analyse durchgeführt. Die Methode erlaubte dabei eine schnelle und spezifische taxonomische Identifizierung von *Pseudo-nitzschia sp.*-Algen aus den entnommenen Mittelmeer-Proben.

Die Autor*innen Rojo et al. (2020) kombinierten die HRM-Analyse mit einer qPCR zur Identifizierung von industriell genutzten Mikroalgen-Arten. Als Grundlage für die Bestimmung wurde dabei ein Abschnitt des ribosomalen 18S-rDNA-Gens als Marker-Sequenz verwendet. Die Studie konnte dabei die Mikroalgen-Arten *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Muriellopsis sp.*, *Porphyridium cruentum*, *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis gaditana*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Haematococcus pluvialis* und *Scenedesmus obliquus* erfolgreich anhand einer HRM-Analyse identifizieren.

Die HRM-Analyse wurde in den Mikroalgen bisher nur selten angewandt. Eine Implementierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode in etablierte Monitoringprogramme wurde ebenfalls noch nicht vorgenommen.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die HRM-Analyse der Identifizierung von genetisch veränderten Mikroalgen dienen. Auch im Fall der Algen muss sich die Schmelzkurve von Wildtyp und Mutante dafür jedoch unterscheiden und die Art oder Position der Mutation bekannt sein. Eine genaue Identifikation der genetischen Veränderung ist hierbei ebenfalls nicht möglich.

Eine Anwendung der HRM-Analyse in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL würde zwar einen schnellen und kostengünstigen Nachweis von genetisch veränderten Mikroalgen ermöglichen, dieser wäre methodisch jedoch sehr eingeschränkt. Eine weitreichende Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode ist ebenfalls noch ausstehend.

Fische

Im Rahmen der Literaturrecherche konnten eine Reihe von Publikationen gefunden werden, in welchen die HRM-Analyse in Fischen angewandt wird (Tab. 20, Abb. 15). Sie wurde dabei zum Beispiel zur Identifikation von Fischlarven, adulten Fischen oder Fischprodukten eingesetzt. Des Weiteren diente sie der Unterscheidung von nah verwandten Arten oder der Bestimmung der Diversität eines Gewässers.

In der Studie von Lee et al. (2020) wurde die Methode zur Identifizierung der Blaukrabbe (*Callinectes sapidus*) und anderer Arten innerhalb der *Callinectes*-Gattung verwendet. Für die taxonomische Bestimmung wurde dabei eine Sequenz des 12S-Locus als DNA-Marker genutzt. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode wurde dabei an fünf verschiedenen Arten innerhalb der Gattung getestet. Die HRM-Methode konnte dabei eine Klassifizierung der Art *Callinectes sapidus* von 97,5 % erzielen. Bei einer Betrachtung aller Arten lag die Genauigkeit der taxonomischen Identifizierung hingegen bei ungefähr 90 %. Die Abweichung ist dabei vor allem auf eine Fehlklassifizierung der Arten *Callinectes similis* und *Callinectes danae* zurückzuführen, bei welchen die Sequenz des verwendeten Amplikons zu 99 % identisch ist.

Eine spezifische taxonomische Bestimmung von Arten ist folglich nur bei einer ausreichend hohen genetischen Variabilität möglich.

In einer anderen Studie wurde die HRM-Analyse zur taxonomischen Bestimmung von Thunfischlarven aus dem Golf von Mexiko verwendet. Diese lassen sich morphologisch nicht gut voneinander unterscheiden. Anfänglich wurde dabei ein HRM-Assay auf der Grundlage von kurzen Amplifikaten (short amplicons, SA) durchgeführt, welcher variable Regionen der Gene ND4, ND5 und ND6 als Marker nutzte. Dieser Ansatz eignete sich jedoch nur bedingt zur Identifikation der Thunfischarten *Thunnus alalunga*, *Thunnus atlanticus*, *Thunnus obesus*, *Thunnus thynnus* und *Thunnus albacares*. Zusätzlich zur SA-HRM-Analyse wurde im Rahmen dieser Studie ein Ansatz entwickelt, der auf unmarkierten Sonden (unlabelled probes, UP) basiert. Dieser umfasste vier SNP-Marker innerhalb einer Sequenz des ND4-Locus. Der UP-HRM-Assay konnte dabei erfolgreich zur kostengünstigen und zuverlässigen Identifikation der Thunfischarten aus dem Golf von Mexiko verwendet werden (Smith et al., 2023).

In Fischen wurde die HRM-Analyse bisher ausschließlich zur taxonomischen Identifizierung eingesetzt. In etablierte Monitoringprogramme wurde die neuartige molekularbiologische Nachweismethode bisher noch gar nicht angewandt.

Die HRM-Analyse könnte dabei im Rahmen eines nGVO-Monitorings zum Nachweis von genetischen Veränderungen in Fischen eingesetzt werden. Analog zu den anderen Organismengruppen muss sich dafür jedoch die Schmelzkurve von Wildtyp und Mutante unterscheiden und die Art oder Position der Mutation bekannt sein. Eine genaue Identifikation der genetischen Veränderung ist dabei auch im Fall der Fische nicht möglich.

In etablierte Monitoringprogramme nach WRRRL könnte die HRM-Analyse eine schnelle und kostengünstige Identifikation von genetisch veränderten Fischen erlauben. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode ist aber auch im Fall der Fische sehr eingeschränkt. Eine weitreichende Standardisierung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode ist ebenfalls noch ausstehend.

4.2.1.10 LFA

Der Lateral Flow Assay ist ein Verfahren zur Detektion eines Target-Moleküls auf einem Teststreifen. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode kombiniert dabei die Dünnschichtchromatographie mit der Immunfärbung. In einem Bereich des Teststreifens ist dabei ein, für das Target-Molekül spezifischer, Antikörper fixiert. Die zu untersuchende Probe wird auf ein Ende des Teststreifens aufgetragen und breitet sich anschließend aufgrund von Kapillarkräften auf dem Teststreifen aus. Im Falle eines Vorhandenseins des jeweiligen Targets bindet dieses an den, sich auf dem Teststreifen befindlichen Antikörper und löst so eine visuell detektierbare Farbreaktion aus. Diese Verfärbung des Teststreifens dient dem Nachweis des Target-Moleküls (Wong und Tse, 2008; Tuteja et al., 2020).

Im aquatischen Monitoring wird die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei neben der Identifikation aus einer Umweltprobe auch zur Detektion von Mutationen oder Fremdgenen in aquatischen Organismen verwendet (Information aus Referenzdatenbank gewonnen).

Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode gilt dabei als einfach in der Anwendung, sehr schnell und kostengünstig. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode weist jedoch auch eine geringe Sensitivität sowie eine eingeschränkte Reproduktivität auf (Wong und Tse, 2008; Tuteja et al., 2020).

Mücken

Für die Organismengruppe der Mücken konnte im Rahmen dieser Recherche nur eine Publikation gefunden werden, welche sich mit der Anwendung des LFA beschäftigt (Tab. 20, Abb. 15).

Die Autor*innen Ahmed et al. (2022) nutzen den LFA dabei in Kombination mit der RPA zum Nachweis von kdr-Mutationen in der Mückenart *Aedes aegypti*. Die entsprechende Studie wurde dabei bereits im Kapitel „4.2.1.7 RPA“ näher beschrieben.

Der LFA wurde in Mücken bisher nur in einer Studie angewandt und ist bisher auch nicht in etablierte Monitoringprogramme integriert worden.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei der Detektion von genetisch veränderten Mücken dienen. Die Mutation muss jedoch für den LFA bekannt sein, eine genaue Identifikation der genetischen Veränderung ist zudem nicht möglich.

Der LFA könnte in etablierte Monitoringprogramme nach WRRL zur schnellen und kostengünstigen Identifikation von genetisch veränderten Mücken eingesetzt werden. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode weist jedoch eine geringe Sensitivität sowie eine eingeschränkte Reproduktivität auf.

Bakterien

Zur Anwendung des LFA in Bakterien konnten im Rahmen dieser Literaturrecherche eine Reihe von Publikationen zusammengestellt werden (Tab. 20, Abb. 15). Diese beziehen sich dabei in der Regel auf die Detektion einer bestimmten Bakterienart. Zusätzlich dazu wurde die neuartige molekularbiologische Nachweismethode bereits auch zum Nachweis eines Gens eingesetzt.

In der Studie von Mabrok et al. (2021) wurde der LFA mit der RPA-Methode kombiniert, um einen Nachweis des Bakteriums *Flavobacterium columnare* zu ermöglichen. Diese Bakterienart ist dabei Auslöser der Columarnis-Infektion in Süßwasserfischen und daher von besonderer Relevanz. Für den Nachweis des Bakteriums wurde dabei zuerst eine RPA durchgeführt, welche auf das cslA-Gen abzielte. Mittels des Lateral Flow Assays konnte anschließend eine schnelle Visualisierung der Ergebnisse erfolgen. Die RPA-LFA-Methode wies dabei eine hohe Spezifität und Genauigkeit beim Nachweis von *Flavobacterium columnare* auf.

In einer anderen Studie wurde die Kombination aus RPA und LFA zum Nachweis des pathogenen Bakteriums *Edwardsiella ictaluri* verwendet. Dieses kann im wirtschaftlich wichtigen Gelben Wels verschiedene Krankheiten auslösen und so zu finanziellen Verlusten führen. Der im Rahmen dieser Studie entwickelte RPA-LFA-Ansatz beruht dabei auf einer Sequenz des serC-Gens aus *Edwardsiella ictaluri*. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode konnte dabei erfolgreich zum Nachweis von *Edwardsiella ictaluri* aus infizierten Proben des Gelben Wels nachgewiesen werden. Die Autor*innen bezeichnen die RPA-LFA dabei als eine schnelle, einfache, sensitive und zuverlässige neuartige molekularbiologische Nachweismethode für einen Nachweis der Bakterienart (Li et al., 2022).

Der LFA wurde bereits in einigen Studien zur Detektion einer Bakterienart eingesetzt. In etablierte Monitoringprogramme ist die neuartige molekularbiologische Nachweismethode jedoch noch nicht implementiert worden.

Der LFA könnte dabei zur Identifikation von genetisch veränderten Bakterien im Rahmen eines nGVO-Monitorings eingesetzt werden. Analog zu den Mücken muss die Mutation dafür jedoch bekannt sein, und eine genaue Identifikation der genetischen Veränderung ist nicht möglich.

In etablierte Monitoringprogramme nach WRRL könnte der LFA einer schnellen und kostengünstigen Detektion von genetisch veränderten Bakterien dienen. Auch für die Bakterien weist die neuartige molekularbiologische Nachweismethode jedoch eine geringe Sensitivität sowie eine eingeschränkte Reproduktivität auf.

Mikroalgen

In den Mikroalgen wurde die LFA-Methode bereits in einer Reihe von Studien zur Detektion einer Art angewandt (Tab. 20, Abb. 15).

Die Autor*innen Ginés et al. (2021) nutzen den LFA dabei zum Nachweis der beiden toxischen Mikroalgenarten *Gambierdiscus australes* und *Gambierdiscus excentricus*. Im Rahmen dieser Studie wurde eine PCR mit artspezifischen Primern und Sonden durchgeführt. Die Amplifikate wurden anschließend in einem LFA untersucht. Der Assay ermöglichte dabei die gleichzeitige Detektion beider Algenarten. In der Studie konnte des Weiteren gezeigt werden, dass für die PCR-LFA auch ganze Zellen anstelle von aufgereinigten DNA-Extrakten als Ausgangsmaterial verwendet werden können. Die Autor*innen stellen dabei eine Kompatibilität der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode für Feldversuche heraus.

Wang et al. (2021) nutzen das RPA-LFA-Verfahren zum Nachweis der schädlichen Mikroalge *Heterosigma akashiwo*. Ein Abschnitt der D1-D2-Region der großen ribosomalen Untereinheit (LSU) wurde dabei als genetischer Marker für die Identifizierung der Alge verwendet. Die Kombination aus RPA und LFA konnte dabei erfolgreich zum Nachweis der Mikroalge verwendet werden und wies dabei eine 100-fach höhere Sensitivität im Vergleich zur herkömmlichen PCR-Methode auf.

In Mikroalgen wurde der LFA bisher zur Detektion von einer bestimmten Mikroalgenart eingesetzt. In etablierte Monitoringprogramme ist die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei bisher nicht implementiert worden.

Der LFA könnte im Rahmen eines nGVO-Monitorings dem Nachweis von genetischen Veränderungen von Mikroalgen dienen. Auch hier muss dafür die Mutation jedoch bekannt sein. Eine genaue Identifikation der genetischen Veränderung ist analog zu den anderen Organismengruppen nicht möglich.

Der LFA könnte eine schnelle und kostengünstige Identifikation von genetisch veränderten Mikroalgen im Rahmen von etablierten Monitoringprogrammen nach WRRL ermöglichen. Die neuartige molekularbiologische Nachweismethode weist dabei jedoch auch im Fall der Algen eine geringe Sensitivität sowie eine eingeschränkte Reproduktivität auf.

Fische

In der Organismengruppe der Fische wurde der LFA bisher nur selten angewendet. Im Rahmen dieser Recherche konnten dabei zwei Publikationen gefunden werden, welche sich mit der Anwendung der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethode in Fischen befassen (Tab. 20, Abb. 15).

In einer der Studien wurde die neuartige molekularbiologische Nachweismethode dabei mit einer RPA kombiniert und zur Identifikation des Atlantischen Lachses verwendet Wang et al. (2022). Diese Studie wurde dabei bereits im Kapitel „4.2.1.7 RPA“ näher ausgeführt.

Frigerio et al. (2023) kombinierten den LFA sowohl mit einem Barcoding-Ansatz, als auch mit einer RPA zur Authentifizierung von frischen und konservierten Makrelen. Auch diese Studie wurde bereits im Kapitel „4.2.1.7 RPA“ ausführlicher beschrieben.

Der LFA wurde in Fischen bisher nur sehr selten angewandt und wurde auch noch nicht in etablierte Monitoringprogramme integriert.

Im Rahmen eines nGVO-Monitorings könnte der LFA einer Identifikation von genetisch veränderten Fischen dienen. Auch im Fall der Fische muss die Mutation jedoch bekannt sein. Eine genaue Identifikation der genetischen Veränderung ist hierbei ebenfalls nicht möglich.

In etablierten Monitoringprogrammen nach WRRL würde der LFA eine schnelle und kostengünstige Identifikation von genetisch veränderten Fischen erlauben, diese würde jedoch eine geringe Sensitivität sowie eine eingeschränkte Reproduktivität aufweisen.

4.2.2 Fernerkundungsmethoden

Luftgestützte Fernerkundungsmethoden gliedern sich in satellitengestützte bildgebende Verfahren sowie Befliegungen mit Flugzeugen und Drohnen (UAV). Zahlreiche Studien haben bereits das Potential von Satelliten für die Erfassung von spektralen Eigenschaften von Unterwasservegetation wie Algenblüten und submersen Makrophyten gezeigt. Die größte Einschränkung stellt hierbei die grobe räumliche Auflösung dar. Im Multispektralbereich liegt sie bei > 1 m und somit bei einer Pixelgröße von 1 m^2 . Dadurch sind selbst auf Pixelbasis nur Objekte ab einer Größe von 1 m^2 erkennbar. Eine Klassifikation auf Sub-Pixel Ebene wurde bislang nur über Wasser getestet. Eine weitere Einschränkung ist die Wolkenbedeckung, die zeitweise Satellitenaufnahmen von Erd- und Wasseroberflächen verhindert.

Flugzeugerfassungen eignen sich ebenfalls für ein Monitoring von Unterwasservegetation und Algenblüten. Visuelle Auswertungen von Luftaufnahmen ermöglichen die Erfassung von Objekten der zehnfachen Pixelgröße. Eine weitere Möglichkeit des Monitorings von Wasserkörpern sind Hyperspektralbilder. Eine automatische Bilderkennung durch maschinelles Lernen ermöglicht eine Erfassung von Objekten im Sub-Pixel Bereich, die 5 % eines Pixels abdecken und damit eine Erfassung von Objekten in der Größenordnung von $2,5 \text{ m}^2$. Flugzeugbefliegungen ermöglichen eine hohe räumliche Auflösung bei einer großen spektralen Abdeckung. Jedoch entstehen durch Flugzeugbefliegungen in der Regel hohe logistische und finanzielle Kosten.

Drohnenbefliegungen ermöglichen die höchste räumliche Auflösung der drei Methoden mit Auflösungen < 1 cm im sichtbaren Lichtbereich und $3,4$ cm für Multispektral-Sensoren. Der Einsatz von Hyperspektral-Sensoren ist zurzeit möglich, jedoch noch sehr kostenintensiv. Die geringen Kosten und die schnelle Durchführbarkeit einer Befliegung machen UAVs vor allem für kleinräumige Erfassungen wie zum Beispiel bei Brutstätten erkundungen von Mückenpopulationen interessant. Die größte Einschränkung sind die Kosten einer großflächigen Anwendung und die schwierige Erfassung von unzugänglichem Gelände. Weitere Einschränkungen sind durch Regen und starken Wind ($> 30 \text{ km/h}$) gegeben.

Abbildung 16 gibt eine Übersicht über die Verteilung der recherchierten Publikationen auf die behandelten Organismengruppen und die Themenfelder „Fernerkundungsmethoden“, „Optische und akustische Systeme“ und „Einbindung von Bürgerwissenschaftler*innen“.

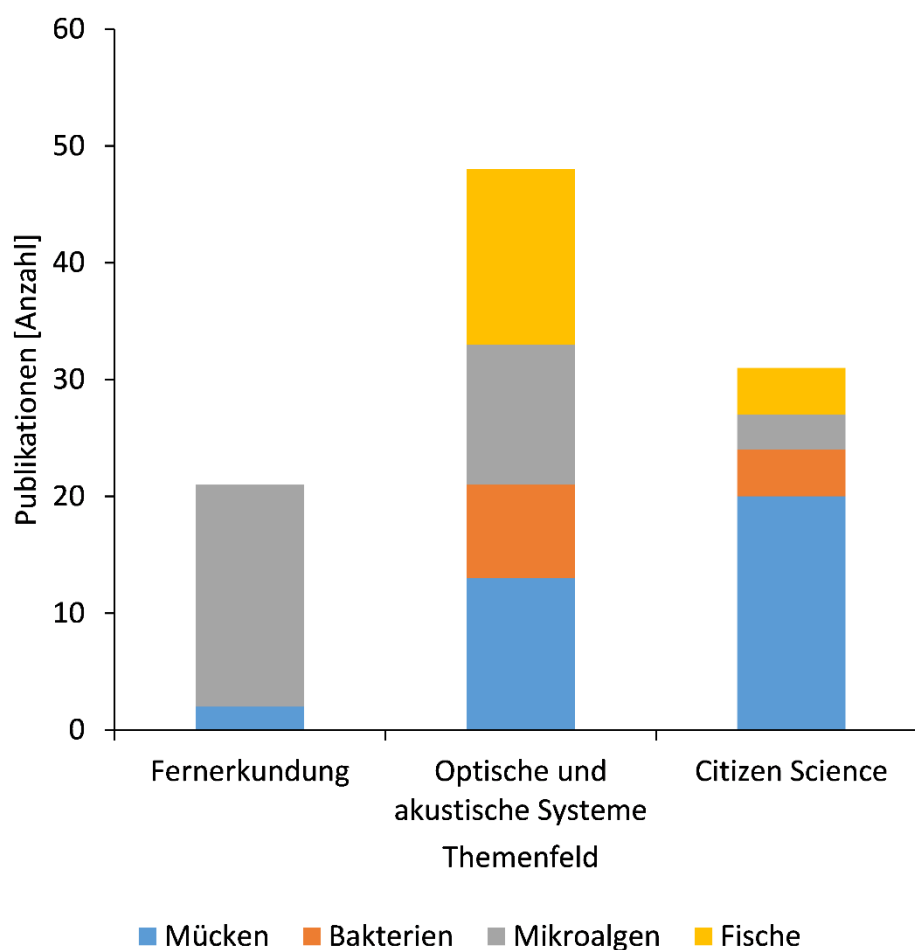


Abb. 16: Übersicht über die Verteilung der recherchierten Publikationen auf die behandelten Organismengruppen und die Themenfelder neben molekularen Methoden.

4.2.2.1 Mücken

In einem Reviewartikel diskutieren Carrasco-Escobar et al. (2022) die Nutzung von Fernerkundungsdaten aus Drohnenbefliegungen zusammen mit prädiktiven Modellen für Risiken, Inzidenz und Erkennung von Übertragungs-Hotspots und Landschaftsprofilen. Diese Autor*innen skizzieren die Chancen und Herausforderungen der Integration von Drohnen in die Vektorüberwachung (z. B. Identifizierung von Brutstätten oder Kartierung der Mikroumwelt) und von Kontrollstrategien (z. B. Aktivitäten zur Erfassung von Larvenhabitaten oder der Einsatz genetisch veränderter Wirkstoffe).

Faraji et al. (2021) diskutieren die Vorteile der Drohnenüberwachung von Mücken in den USA. Zusätzlich zur Lokalisierung von Lebensräumen für Mückenlarven liefern MCP-Echtzeitbilder, erhöhen die Genauigkeit von Insektizidanwendungen aus der Luft und dienen der Erkennung und Probenahme von Mückenlarven. Drohnen werden auch für die Anwendung von Larviziden im Wasser in Lebensräumen mit einer Reichweite von bis zu 300 m eingesetzt. Die Größe der Einsatzgebiete variiert von mehreren Hektar großen Feuchtgebieten bis hin zu kleinen Containern in städtischen Umgebungen. Zu den aktuellen Hindernissen gehört ein Mangel an Geräten, die speziell für Mücken entwickelt wurden.

Zusammenfassend eignen sich Fernerkundungsmethoden zwar für ein Habitatmonitoring, sie ermöglichen jedoch wegen der geringen räumlichen Auflösung keine Erkennung von nGVO-Mücken. Daher sind sie für ein künftiges nGVO-Monitoring von Mücken wenig geeignet.

4.2.2.2 Mikroalgen

Battaglia et al. (2021) stellen die neuesten Methoden der Fernerkundung limnischer Systeme vor, die dazu dienen, dynamische Veränderungen der Feuchtgebietsvegetation, der Ausdehnung des Oberflächenwassers und der Änderung des Wasserspiegels zu dokumentieren. Diese Autor*innen bewerten den Aufwand und die Machbarkeit der Auswertung von Satellitendaten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Integration von Daten mehrerer Sensoren am effektivsten war, Küstenfeuchtgebiete in der Region der Großen Seen zu kartieren.

Binding et al. (2021) stellen in einer Publikation EOLakeWatch, eine Fernerkundungsmethode zum Monitoring von Algenblüten, vor. Algenblütenindizes beschreiben das räumliche Ausmaß der Blüten. Ausmaß, Intensität, Dauer und Schwere der Algenblüten wurden mithilfe von OLCI (Ocean and Land) der Europäischen Weltraumorganisation abgeleitet. Dabei kamen Farb-Sensoren für Beobachtungen seit 2016 und MERIS-Daten von 2002 bis 2011 zum Einsatz. Die Ergebnisse demonstrieren die Notwendigkeit, mehrere Indizes gemeinsam zur Beurteilung der Algenblüten zu verwenden. Die Algenblüten-Indizes wurden vollautomatisch verarbeitet, in Echtzeit über ein Webportal zur Verfügung gestellt und in endbenutzerfreundlichen jährlichen Algenblütenberichten zusammengestellt.

Chebud et al. (2012) entwickelten eine Methodik zur Vorhersage der Wasserqualität in einem großen und logistisch schwierig zu erfassendem Gebiet. Hierbei wurden Landsat-Spektraldaten verwendet, und es wurde zur Quantifizierung von Wasserqualitätsparametern ein neuronales Netzwerkmodell entwickelt. Mit der neuen Methode können Chlorophyll-a, Trübung und Phosphorkonzentrationen bestimmt werden. Die Übereinstimmung zwischen beobachteten und simulierten Wasserqualitätsparametern war sehr hoch.

In einer großräumigen Studie wurden Daten der Europäischen Weltraumorganisation Envisat MEdium Resolution Imaging Spektrometer und von Sentinel-3 Ocean mit dem Land Color Instrument genutzt, um einen Überblick über den Prozentsatz der Seen in den USA zu erhalten, in denen es zu Blüten von Cyanobakterien kam (Coffer et al., 2020). Mit einer wöchentlichen zeitlichen Auflösung wurden 2321 Seen in den Jahren 2008–2011 sowie 2017 und 2018 untersucht.

Fernandez-Figueroa et al. (2022) bewerteten die Leistung von vier Sensoren an Drohnen auf den Plattformen Phantom 4 und Phantom 4 Professional, den MAPIR Survey3W modifizierten Multispektralsensor und den Parrott Sequoia Multispektralsensor zur Abschätzung der Cyanobakterienhäufigkeit in kleinen Seen. Die Leistung jedes Sensors wurde bestimmt anhand von 26 Vegetationsindizes mit Chlorophyll a- und Phycocyanin-Messungen von 54 Teichen unterschiedlicher Größe und Produktivität. Der Parrott Sequoia Multispektralsensor lieferte die besten Chlorophyll a-Werte (Normalized Difference Vegetation Index, $r^2 = 0,79$, $p < 0,0001$) und Phycocyanin-Schätzungen (Green Normalized Difference Vegetation Index, $r^2 = 0,64$, $p < 0,0001$). Die RGB-Sensoren waren mäßig effektiv für die Schätzung von Chlorophyll a, wohingegen der MAPIR Survey3W schlechte Schätzungen beider Pigmente lieferte aufgrund von Unterschieden in den aufgezeichneten Wellenlängen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass kommerzielle Multiband-Multispektralsensoren eine kostengünstige Plug-and-Play-Alternative zur quantitativen Schätzung der Phytoplanktonhäufigkeit in kleinen Binnensystemen sind.

Zur Untersuchung der zeitlichen Entwicklung des Trasimenischen Sees wurden Satelliten-Multisensordaten verwendet (Giardino et al., 2010). MERIS- und MODIS-Sensoren wurden für das regelmäßige breit angelegte Monitoring verwendet. Die ermittelten Chlorophyll-a-Konzentrationen, die Secchi-Tiefe und die Oberflächenwassertemperatur wurden mit einer Zeitreihe von 2005 bis 2008 von in-situ-Daten verglichen. Die mittels Fernerkundung bestimmten Schwebstoffkonzentrationen stimmten gut mit den in-situ-Daten überein. Die von den MERIS-Daten abgeleitete Wasserqualität bestätigte die meso-eutrophen Bedingungen des Trasimenischen Sees. Mit MERIS-Daten geschätzte Chlorophyll-a-Konzentrationen, Schwebstoffkonzentrationen, farbige gelöste organische Stoffe und die z90-Signaltiefe (die Wassertiefe, aus der 90 % des reflektierten Lichts stammen) stimmten im Lago Maggiore mit in situ-Messwerten von 2003 bis 2011 überein (Giardino et al., 2013). Die Fernerkundungsmethode bestätigte den guten Zustand des Lago Maggiore.

Basierend auf optischen Multisensor-Fernerkundungstechniken wurden von Güttler et al. (2013) zur Trübungsmessung im Donaudelta mehr als 80 mittlere und hohe räumliche hochaufgelöste Satellitenbilder verwendet. Während eines Vier-Jahres-Zeitraums (2006 bis 2009) wurden die Trübungsgradienten in den Deltaseen und an der West-Nordwestküste des Schwarzen Meeres analysiert. Die Ergebnisse der Satellitenbilddauswertungen stimmten gut mit den Ergebnissen von in situ-Messungen überein.

Am Beispiel des Genfer Sees wurden 1.234 Satellitenbilder des MERIS-Sensors des Envisat-Satelliten aus den Jahren 2002 bis 2012 verwendet, um die räumlichen und zeitlichen Schwankungen der Chlorophyll a - Konzentrationen zu quantifizieren (Kiefer et al., 2015). Basierend auf Histogrammen von Chlorophyll a - Schätzungen im Frühjahr, Sommer und Herbst wurde die räumliche Repräsentativität von zwei in situ-Messungen analysiert. Der Ansatz ermöglichte die Bestimmung optimaler in situ-Probenahmestandorte und -frequenzen.

Die NASA führt halbwochentliche Flüge durch, um aktuelle Bilder von Algenblüten zu sammeln. Luftgestützte hyperspektrale Bilder werden mit zwei Hyperspektralbildgebern, HSI-2 und HSI-3, erfasst. In einer Studie von Lekki et al. (2019) wurden Luftbilder vom September 2016 verwendet, um die Subpixelvariabilität innerhalb eines Footprints beliebig großer Pixel unter Verwendung mehrerer Analysetechniken zu untersuchen. Die optimale räumliche Auflösung zum Monitoring von Algenblüten in den Großen Seen lag bei höchstens 50 m.

Liu et al. (2021) entwickelten ein UAV-basiertes Hyperspektral-bildgebendes Fernerkundungssystem. Der Prototyp wurde im Labor kalibriert, und es wurde damit ein Monitoring des Hauptstroms des Jangtsekiang und des Poyang-Sees durchgeführt. Das spektrale Prinzip des hyperspektralen Systems basiert auf der neuen High-Performance Acousto-Optic Tunable (AOTF)-Technologie. Zum Testen wurde ein Chlorophyll a - Sensor verwendet. Zur Erstellung eines Vorhersagemodells diente ein Random-Forest-Algorithmus. Das Bestimmtheitsmaß der Validierung dieses Modells betrug 0,84, d. h. die vorhergesagte Chlorophyll a - Verteilung stimmte mit den Ergebnissen der Feldbeobachtung gut überein.

Eine Studie von Ma et al. (2021) schlägt einen auf mehreren Quellen basierenden Fernerkundungsansatz für das Phytoplankton-Monitoring im Chaohu-See, China, vor. Daten von Terra/Aqua MODIS, Landsat 8 OLI und Sentinel-2A/B MSI wurden integriert, um Beobachtungen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung zu ermöglichen. Der NDVI-Algorithmus (Normalized Difference Vegetation Index) wurde für MODIS-Daten verwendet, der kombinierte Schwebalgenindex (FAI) und der NDVI-Algorithmus für Landsat 8 sowie der NDVI- und Chlorophyll-Reflexionspeak-Intensitätsindex-Algorithmus (rchl) für Sentinel-2A/B MSI. Die

Genauigkeiten des NDVI, des FAI und des rchl betrugen 96,1 %, 95,6 % und 93,8 %. Durch die Kombination von NDVI und rchl konnte eine Fehlidentifizierung wirksam vermieden werden.

Papenfus et al. (2020) verglichen verfügbare Chlorophyll a - Daten aus in situ- und Satellitenbildmessungen und führten eine Kostenanalyse beider Ansätze durch. Je nach verwendetem Satellitenprogramm entstehen Kosten von 5,7 bis 316 US-Dollar. Die Analyse unterstreicht die Bedeutung kontinuierlicher Unterstützung durch Bürgerwissenschaften sowohl für die feldbasierte in situ-Überwachung als auch für das Satellitenmonitoring.

Pu et al. (2019) setzten ein Convolutional Neural Network (CNN) mit hierarchischer Struktur ein, um eine Beziehung zwischen Landsat8-Daten und in situ-Wasserqualitätsdaten zu etablieren. Eine Transfer-Learning-Strategie wurde hierbei im CNN-Modell eingeführt, um mit dem Mangel an in situ-Messdaten umzugehen. Das CNN-Modell wurde an den Seen Erhai und Chaohu in China getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass das CNN-Modell weit verbreitete Methoden des maschinellen Lernens übertraf.

Das Potenzial hochauflösender IKONOS- und QuickBird-Satellitenbilder für die Kartierung und Analyse von Land- und Wasserressourcen in Minnesota wurde von Sawaya et al. (2003) bewertet. Die bewerteten Anwendungen umfassten (1) die Klassifizierung von Seen gemäß der Wasserklarheit ($r^2 = 0,89$), (2) die Kartierung der terrestrischen Oberfläche ($r^2 = 0,98$) und (3) die Erhebung der aquatischen Vegetation von emersen und submersen Makrophyten (80 % Genauigkeit).

In einer Literaturstudie zur Fernerkundung planktonischer Algen wurden 1.292 referierte Artikel von Januar 1999 bis Dezember 2019 gesammelt (Sebastiá-Frasquet et al., 2020). Die Zahl der Veröffentlichungen stieg seit 2004 und erreichte einen Maximalwert von 128 im Jahr 2014. Die Veröffentlichungen stammten aus 47 Ländern, auf die Top-10-Länder entfielen 77 % der gesamten Veröffentlichungen. Langfristige Monitoringprogramme für Phytoplankton sind jedoch sehr rar, nur 1 % der analysierten Publikationen behandelten Fernerkundung über mindestens drei Jahrzehnte. Die meisten Studien basieren auf sporadischen Probenahmen und kurzfristigen Forschungsprogrammen.

Seegers et al. (2021) dokumentieren die Verteilung des vollständigen Datensatzes von Medium Resolution Imaging Spectrometer (MERIS) radiometrischer Zeitreihen für über 2.300 Binnengewässer im gesamten Gebiet der Vereinigten Staaten und für mehr als 5.000 Seen in Alaska. Basierend auf dem Cyanobakterien-Index (CI) wurden Phytoplanktonkonzentrationen in von Cyanobakterien dominierten Seen geschätzt. Hierzu wurde ein Bootstrapping-Ansatz verwendet, der mit einem multiplikativen Bias von 11 % und einem mittleren absoluten Fehler von 60 % gute Ergebnisse lieferte.

Ein satellitengestützter Algorithmus zur Kartierung der Unterwasservegetation wurde in einer Studie von Shuchman et al. (2013) entwickelt und erfolgreich getestet. Der neue Algorithmus zur Kartierung der Unterwasservegetation verwendet die Strahlungswerte in tiefem Wasser (undurchsichtig), um Werte in flachem Wasser (transparent) zu korrigieren, so dass tiefeninvariante Reflexionswerte für alle drei sichtbaren Landsat-Bänder des Seebodens klassifiziert werden können. Anschließend werden Kombinationen aus zwei Bändern verwendet, um einen tiefeninvarianten Bodentypindex zu generieren. Mit dem Algorithmus erfolgt weiterhin eine Schätzung der Trockenmasse der Makroalgen. Die Leistung des Algorithmus wurde am Michigansee mit einer Genauigkeit von 85 % anhand von Tauchkartierungsergebnissen erfolgreich evaluiert.

Zhou et al. (2011) präsentieren in ihrer Publikation ein digitales Monitoringtool für die Erfassung der Wasserqualität von Binnenseen (WQMSIL). WQMSIL zielt darauf ab, den Einfluss des Einzugsgebietes auf die Wasserqualität widerzuspiegeln durch Nutzung von Fernerkundungsdaten in Kombination mit bodengestützten Daten. WQMSIL dient darüber hinaus als Entscheidungshilfesystem für geeignete Maßnahmen zur Verbesserung der Gewässergüte.

Zusammenfassend eignen sich Fernerkundungsmethoden zwar für die Erfassung von Phytoplanktonblüten, sie ermöglichen jedoch wegen der geringen räumlichen Auflösung keine Erkennung von nGVO-Algen, es sei denn, dass die nGVO andere spektrale Reflektionsmuster aufweisen als der jeweilige Wildtyp oder andere Algenarten. Daher sind Fernerkundungsmethoden für ein künftiges nGVO-Monitoring von Algen wenig geeignet.

4.2.3 Kamerasysteme, akustische Systeme und automatische Bilderkennung

Bildgebende Verfahren mit Kamerasystemen und Sonar finden in nahezu allen naturwissenschaftlichen Disziplinen Anwendung. Das sichtbare Spektrum kann direkt zur Abbildung bei bildgebenden Verfahren eingesetzt werden. Moderne optische Verfahren sind die digitale Fotografie oder die digitale Lichtmikroskopie. Bei Beleuchtung mit UV-Licht können über Fluoreszenzeffekte auch Materialunterschiede visualisiert werden, die bei normaler Beleuchtung und mit dem bloßen Auge nicht erkennbar sind. Infrarotaufnahmen ermöglichen die Detektion von gegenüber dem Bildhintergrund erwärmten Objekten. Durch den Einsatz von Lasern (Laserscanning) oder durch Streifenprojektionsverfahren ist es möglich, die dreidimensionale Struktur eines Gegenstandes zu vermessen.

Eine Variante mikroskopischer bildgebender Verfahren ist die Durchflusszytometrie. Sie ist ein Messverfahren, das in der Planktonzählung zur Anwendung kommt. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Durch einen Hüllstrom fokussiert tritt die Probe in den Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette aus Glas oder Quarz ein, so dass jede Zelle einzeln nacheinander durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt wird. Das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird von einem Detektor ausgewertet. Das Ergebnis sind qualitative Informationen über jede einzelne analysierte Zelle. Durch die Analyse einer großen Anzahl von Zellen innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls erhält man schnell repräsentative Informationen über Zellabundanz.

Optische bildgebende Verfahren sind häufig gekoppelt mit Algorithmen zur automatischen Bilderkennung. Hierbei spielen Verfahren des maschinellen Lernens eine große Rolle. Insbesondere Convolutional Neural Networks (CNN) und Deep Convolutional Neural Networks (DCNN) kamen in der jüngsten Vergangenheit zur automatischen Bilderkennung bei der Lichtmikroskopie von Phyto- und Bakterioplankton sowie bei der Auswertung digitaler Bilder von optischen Kamerasystemen zum Monitoring von Fischen und Mücken zum Einsatz.

Schallwellen haben in dichten Medien wie Wasser eine deutlich größere Ausbreitungsentfernung als Lichtstrahlung, die stark absorbiert werden. Deshalb sind Schallwellen von großer Bedeutung zur Messung von physikalischen, chemischen und biologischen Größen in aquatischen Systemen z. B. beim Monitoring von Fischpopulationen oder Fischindividuen in Aquakulturen. Die Information kann mit abbildenden Sonaren als Bild dargestellt werden. Eine weitere Anwendung von akustischem Monitoring sind Tonaufnahmen von adulten Mücken zur Artbestimmung und Zählung von Individuen. Auch hierbei kamen in der jüngsten Vergangenheit zur Tonerkennung Methoden künstlicher Intelligenz wie CNN und DCNN zum Einsatz.

4.2.3.1 Mücken

CNN erfordern eine große Anzahl manuell annotierter Daten. Adhane et al. (2021) schlagen vor, die Monte-Carlo-Dropout-Methode zur Schätzung der Unsicherheit zu verwenden. Diese Autoren verwendeten Scores zur Einstufung von klassifizierten Proben, um den Bedarf an menschlicher Überwachung bei der Erkennung von *Aedes albopictus*-Mücken zu verringern. Die geschätzte Unsicherheit wurde in einem aktiven Lernkontext verwendet, wo nur ein Teil der Daten aus großen Trainingssätzen verwendet wurde. Die experimentellen Ergebnisse zeigten, dass die vorgeschlagene Klassifizierungsmethode andere Methoden in der Vorhersagegüte übertrifft.

Dieselben Autoren entwickelten zwei Deep CNN (DCNN), um die Klassifikation von Mücken anhand von digitalen Bildern zu automatisieren (2022). Sie verwendeten das Prinzip des Transferlernens, und erzielten eine Testgenauigkeit von 94 %. Die DCNN ermöglichen darüber hinaus eine Analyse der Klassifikationsfehler.

Asgari et al. (2022) entwickelten ein durchgängiges DCNN zur automatischen Bilderkennung von Mückenarten. Die Genauigkeit der Artenklassifizierung wurde durch Nutzung beider Dropout-Schichten und Transferlernen erheblich gesteigert. Das Modell verwendete artspezifische Merkmale von Beinen und Brustkorb der Individuen zum Kalibrieren und Validieren.

Buckingham et al. (2021) stellen eine Plattform zur automatisierten Phänotypisierung von Wirbellosen (INVAPP) vor, die mit dem Algorithmus „Paragon“ kombiniert wurde. Das System dient der Messung der Larvenmotilität bei *Anopheles gambiae* und *A. coluzzi* sowie *Aedes aegypti*. Die neue Methode kann mit einer Smartphone-Kameraanwendung kombiniert werden und hat daher das Potenzial für eine Weiterentwicklung als einfacher tragbarer Feldtest, um mit Echtzeit-georeferenzierten Informationen Hotspots zu identifizieren.

Chen et al. (2023) berichten vom Einsatz unbemannter Bodenfahrzeugsysteme (UGV), um in städtischen Gräben ein Monitoring von Mückenlarven durchzuführen. Eine Verbesserung der hochauflösenden Digitalkamera und des Sprühsystems der UGVs würde ermöglichen, Mücken effektiv und sofort zu überwachen und Sprühkontrollen durchzuführen.

Hossain et al. (2022) stellen ein automatisiertes System vor, das Ensemble-Lernen nutzt und *Aedes*-Larven effektiv aus einem Bild mit geringer Vergrößerung mit einer Genauigkeit von über 99 % erkennt. Das vorgeschlagene System übertrifft alle bisherigen Methoden hinsichtlich der Genauigkeit.

Eine Videoplattform von Janson et al. (2023) ermöglicht, das Fressverhalten der Mücken zu beobachten und Videodaten für 30–45 Minuten zu sammeln. Ein maximierter Durchsatz von Daten erfolgt durch ein hochpräzises Computer-Vision-Modell (mittlere durchschnittliche Präzision: 92,5 %), das Videos automatisch verarbeitet und die Objektivität der Messung erhöht. Dieses Modell ermöglicht die kontinuierliche Bewertung kritischer Faktoren wie Nahrungsaufnahme und Aktivität von Mücken.

Lee et al. (2023) entwickelten eine automatische Bildanalysemethode zur Identifizierung von Mückenarten mithilfe einer auf Deep Learning basierenden Objekterkennungstechnik. Farbe und Fluoreszenz von lebenden Mücken wurden mit einem Kamerasystem aufgenommen und zur Entwicklung des Modells verwendet. Ein neuartiges DCNN zeigte mit einer Präzision von 91,7 % die beste Leistung.

Ong et al. (2021) nutzten einen Datensatz mit 4.120 Bildern von *Aedes*-Mücken, die älter als zwölf Tage waren und gemeinsame morphologische Merkmale aufwiesen, um ein DCNN zu

trainieren. Das Modell ermöglicht die Erfassung verschiedener Mückengenerationen in Echtzeit. Ein Vergleich der Modellergebnisse mit manuell durchgeführten Bestimmungen ergab eine Genauigkeit des Modells von mehr als 98%.

Moderne Deep-Learning-Modelle kamen in einer Studie von Park et al. (2020) bei der Klassifizierung von Mückenarten mit großer Ähnlichkeit zwischen den Arten und Variationen innerhalb der Arten zum Einsatz. Ein Datensatz von ca. 3.600 Bildern von acht Mückenarten mit unterschiedlichen Körperhaltungen und Deformationszuständen diente dem Training des Modells. Es konnte eine Klassifizierungsgenauigkeit von 97 % erreicht werden, indem diskriminierende Regionen neben allgemeinen Merkmalen zur Klassifizierung herangezogen wurden.

Ein neues akustisches System zur Zählung von Mücken in freier Wildbahn basiert auf einem Internet-of-Things-Ansatz (Vasconcelos et al., 2021). Ein Sensorboard wurde entwickelt, um Audiodaten zu sammeln, und mehrere Modelle wurden zur Erkennung, Klassifizierung und Zählung von Mückenarten trainiert.

Wang et al. (2022) geben einen Überblick darüber, wie Deep-Learning-Algorithmen ökologische Daten von Mücken aus großen Datensätzen extrahieren können. Die Autor*innen benennen künftige Herausforderungen dieser Technologie: Es besteht Bedarf an taxonomischer Verifizierung bei der Identifizierung anhand von Bildern, an ausreichenden Trainingsdaten und an öffentlichen Referenzdatenbanken. Weiterhin müssen neuartige molekularbiologische Nachweismethoden in die Deep-Learning-Technologie integriert werden.

Pataki et al. (2021) trainierten ein Deep-Learning-Modell zur Erkennung von Tigermücken (*Aedes albopictus*) anhand digitaler Fotos von Bürgerwissenschaftler*innen. Die Fotos wiesen eine sehr variable Qualität auf. Es wurde dennoch eine Klassifizierungsgenauigkeit von 96 % erzielt.

Bildgebende Verfahren eignen sich nur dann für ein künftiges nGVO-Monitoring von Mücken, wenn anhand phänotypischer Merkmale zwischen dem nGVO und dem Wildtyp unterschieden werden kann. Das ist jedoch nicht bei jeder neuartigen Genmanipulation der Fall. Gleichwohl können bildgebende Verfahren ergänzend für ein künftiges nGVO-Monitoring von Mücken herangezogen werden, wenn Bestimmungen auf Artniveau vorgenommen werden sollen. Durch automatische Bilderkennung mittels maschinellen Lernens würde die Kosteneffizienz eines künftigen nGVO-Monitorings wesentlich erhöht werden.

4.2.3.2 Bakterien

Bär et al. (2020) untersuchten die Heterogenität von bakteriellen Phänotypen anhand von automatischer Bilderkennung. Diese Autoren entwickelten ColTapp, eine Kolonie-Zeitraffer-Anwendung zur Dokumentation des Wachstums von Bakterienkolonien. Eine intuitive grafische Benutzeroberfläche ermöglicht Benutzer*innen die Analyse von Zeitrafferbildern von Agar-Platten für ein Monitoring von Größe, Farbe und Morphologie der Kolonien. Erste Ergebnisse zeigten, dass teilweise eine Überschätzung der Verzögerungszeit erfolgte. Diese Tendenz konnte korrigiert werden, indem die Fläche berücksichtigt wurde, die jeder Kolonie auf der Platte zur Verfügung stand.

Dönmez et al. (2020) demonstrierten die markierungsfreie Smartphone-Erkennung der bakteriellen Lichtstreuung durch mikrofluidische Dunkelfeld-Bildgebung zur Messung der Bakterien- und Bakteriophagen-Lyse. Eine einzelne LED und eine tragbare 3D-gedruckte Bildgebungsbox ermöglichten die Messung der Bakterienkonzentration und des Bakterienwachstums durch direkte Abbildung der bakteriellen Lichtstreuung. Die Bakteriophagen-Lyse wurde

in einem 10-Kanal-Mikrofluidikgerät aus schmelzextrudiertem Fluorpolymer-Mikrokapillarfilm nachgewiesen. Mit diesem einfachen, kostengünstigen 3D-gedruckten System konnten Bakterienkonzentrationen bis zu einer optischen Dichte von 0,1 gemessen werden, was an die Empfindlichkeit herkömmlicher Spektrophotometer herankommt.

Freitag et al. (2021) stellen eine Aluminium-Akustikfalle in Kombination mit gedämpfter Totalreflexions- Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR) zum Nachweis von *E. coli* in Wasser vor. Die Leitfähigkeit von Aluminium wurde ausgenutzt, um die akustische Falle thermoelektrisch zu erwärmen. Eine systematische Optimierung des Geräts ermöglichte hohe Durchflussraten bei gleichzeitig hoher akustischer Einfangleistung. Das ATR-Element dient nicht nur als Reflektor für die Erzeugung stehender Ultraschallwellen, sondern auch als Sensorschnittstelle. Die durch alkalische Phosphatase-markierte Bakterien induzierte Umwandlung wurde direkt in der akustischen Falle mittels ATR-FTIR-Spektroskopie gemessen. Eine sequentielle Injektionsanalyse ermöglichte die automatisierte Handhabung von Flüssigkeiten, einschließlich berührungsloser Bakterienretention sowie Waschen und Enzym-Substrat-Austausch innerhalb der akustischen Falle. Das System ebnet den Weg zur vollautomatischen Bakterienerkennung.

Die Laser-Speckle-Bildgebung ist eine zuverlässige Technik, mit der eine Echtzeitüberwachung von Bakterien in flüssigen Kulturmedien durchgeführt werden kann. Speckle-Parameter, die Speckle-Korngröße und der räumliche Kontrast der Speckle-Bilder sowie Standardanalyseparameter (optische Dichte, pH-Wert und Koloniebildende Einheiten) wurden während der Kultivierung verschiedener Stämme von *Bacillus thuringiensis* gemessen (Loutfi et al., 2020). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Speckle-Korngröße als auch der räumliche Kontrast mit dem Bakterienwachstum abnehmen. Darüber hinaus reagieren Speckle-Parameter empfindlich auf die Fermentationsbedingungen.

Needs et al. (2021) entwickelten zwei Methoden zum Zählen von Bakterien mit kommerziell erhältlichen Mikrofluidgeräten. Genaue Zählungen von lebensfähigen Zellen wurden mit einfachen „Tauch- und Test“-Arrays aus Mikrokapillaren durchgeführt. Sowohl die kolorimetrische als auch die fluoreszierende Wachstumsdetektion ermöglichten die Zählung lebensfähiger Zellen in Mikrokapillaren in mehreren mikrofluidischen Kompartimenten mithilfe einer Endpunktmessung oder alternativ durch Quantifizierung der Wachstumskinetik. Die Mikrokapillargeräte waren mit herkömmlichen 96-Well-Platten und Mehrkanal-Pipetten kompatibel. Eine Smartphone-Kamera reichte aus, um Endpunktbilder der Wachstumserkennung sowohl kolorimetrisch als auch fluoreszierend aufzuzeichnen.

Eine Studie von Offenbaume et al. (2020) ergab, dass tragbare Fluoreszenzsensoren kombiniert werden können mit fortschrittlichen Modellierungsmethoden wie CNN. Solche Ansätze würden in situ-Messungen von planktonischen Bakterien ermöglichen.

Orenstein et al. (2020) erläuterten das Design der Scripps-Plankton-Kamera (SPC)-Systems, einem in situ-Mikroskop-Bildgebungssystem. Das SPC besteht aus drei Einheiten: (1) einem Unterwasser-Dunkelfeld-Bildmikroskop, (2) einem serverbasierten Datenhaltungssystem zur Datenspeicherung und Analyse, und (3) einer webbasierten Benutzeroberfläche zum Durchsuchen und Kommentieren von Daten in Echtzeit. Eine Kombination mit maschinellem Lernen ermöglicht eine automatische Planktonanalyse.

Eine neue kostengünstige Open-Source-Plattform dient der automatisierten Bilderfassung und Bildanalyse des Bakterienkoloniewachstums auf mehreren Nähragarplatten (Pandey et al., 2021). Das System enthält eine temperaturgesteuerte Wachstumskammer,

hochauflösender Scanner und eine grafische Benutzeroberfläche, um die Wachstumskinetik der Kolonien darzustellen. Experimente unter Verwendung eines Wildtypstamms von *Escherichia coli* K12 testeten die Machbarkeit und Funktionsweise des Setups.

In Analogie zu Mücken eignen sich bildgebende Verfahren nur dann für ein künftiges nGVO-Monitoring von Bakterien, wenn anhand phänotypischer Merkmale zwischen dem nGVO und dem Wildtyp unterschieden werden kann. Das ist jedoch nicht bei jeder neuartigen Genmanipulation der Fall. Gleichwohl können bildgebende Verfahren ergänzend für ein künftiges Monitoring von Bakterien herangezogen werden, wenn Bestimmungen auf Artniveau vorgenommen werden sollen. Durch automatische Bilderkennung mittels maschinellen Lernens würde die Kosteneffizienz eines künftigen Monitorings wesentlich erhöht werden. Jedoch ist eine automatische Bilderkennung von Bakterien auf Artniveau derzeit nur für Kolonien möglich. Zukünftige Entwicklungen können jedoch zu einer höheren Genauigkeit bildgebender Verfahren bei der in situ-Bestimmung von Bakterien führen.

4.2.3.3 Mikroalgen

Barsanti et al. (2021) geben einen Überblick der neuesten Monitoringmethoden in aquatischen Systemen. Hierzu gehören die automatisierte Planktonklassifizierung mittels digitaler Mikroskopie, Computer-Mikroskop-Systeme und neue Bildverarbeitungstechniken zur Erkennung und Klassifizierung von Planktonarten wie Segmentierung, Extraktion von Formmerkmalen, Bestimmung der Pigmentsignatur und neuronale Netzwerke.

Blackburn et al. (2022) entwickelten eine Methode zur automatischen Zählung und Messung der Größe und des Bewegungsverhaltens von Zooplankton und Phytoplankton in Wasserproben. Zwei Videokameras wurden auf separate optische Kammern unterschiedlicher Größe fokussiert. Die Kammern wurden durch synchronisierte Pumpen wiederholt gefüllt und entleert. Es wurde eine computergesteuerte Bewegungsanalyse in Echtzeit durchgeführt. Die Fluoreszenz von Chlorophyll a wurde in Pixeln einzeln abgebildet. Zu den gemessenen Parametern für einzelne Organismen gehören Größe, Schwimmgeschwindigkeit, Motilitätsmuster und die Chlorophyll-Fluoreszenzdichte. Das System wurde im Rahmen eines Mesokosmos-Experiments getestet. Ein Probenahmeintervall von einem Tag ergab detaillierte Dynamiken der Chlorophyllaktivität über einen Zeitraum von einem Monat.

Dunker (2019) entwickelte ein neues Verfahren zur bildgebenden Durchflussszytometrie (IFCM), in dem Mikroskopie und Hochdurchsatzanalyse kombiniert werden. Im Vergleich zu einzelnen Fluoreszenzwerten ermöglicht die Bildinformation nicht nur eine Charakterisierung unterschiedlicher Arten sowie unmittelbare und schnelle Messungen, sondern sie bietet auch eine archivierbare Datenausgabe. Mit Hilfe numerischer Auswertungen erwies sich die taxonomische Auflösung von IFC (ImageStream X Mk II) als vergleichbar mit der von Standard-FCM (FACS Aria II). Im Gegensatz zum Standard-FCM wird jede Zelle nicht nur als Punkt in einem Zytogramm dargestellt.

Eine Studie von Dyomin et al. (2020) zeigt, dass die Verwendung einer tauchfähigen digitalen holographischen Kamera als Teil eines multifunktionalen Hardware- und Softwarekomplexes die Durchführung von in situ-Messungen von Plankton ermöglicht. Das Verfahren beinhaltet eine Automatisierung der Datengewinnung und die Klassifizierung von Planktonarten. Der Klassifizierungsalgorithmus verwendet morphologische Parameter. Die zum Erhalten des Ergebnisses erforderliche Zeit beträgt weniger als 1 s und hängt von der Anzahl der Planktonpartikel und der Rahmengröße ab. Die Klassifizierungsgenauigkeit schwankt zwischen 50 und

60 %. Dieses neue System wurde von Dyomin et al. (2022) im Baikalsee im Sommer erfolgreich getestet.

Kombinierte digitale Bildverarbeitungsalgorithmen ermöglichen die Zählung von Phytoplankton. Eine von Gulfan und Anthonny (2022) entwickelte Software wurde in einem Mikrocontroller untergebracht, dessen Kameramodul am Okular eines Verbundmikroskops befestigt war. Der Prototyp wurde auf Benutzerfreundlichkeit und Akzeptanzrate hin getestet. Ein SUS-Wert (System Usability Scale) von 86,5 zeigte an, dass der Zählerprototyp eine zu 79,2 % nutzbare, erlernbare und akzeptable Technologie darstellt.

Guo et al. (2021) integrierten Deep Learning-Methoden mit digitaler Inline-Holographie zur Erstellung eines schnellen und genauen Planktonklassifizierungsnetzwerks für zehn Algenarten, die häufig vorkommen. Das Netzwerk erreichte eine Genauigkeit von 93,8 %, wenn es auf einen manuell klassifizierten Testdatensatz angewendet wurde. Darüber hinaus wurde das Netzwerk auf 7.500 in situ gesammelte Hologramme zur Charakterisierung der Tiefenverteilung von Diatomeen angewendet. Die Ergebnisse stimmten mit gleichzeitig aufgezeichneten unabhängigen Tiefenprofilen der Chlorophyllkonzentration überein.

Le et al. (2022) verwendeten ein digitales in situ-Kamerasystem, und entwickelten ein CNN, um neun Arten von Phytoplankton zu erkennen. Die CNN analysierten 26 unabhängige natürliche Proben, die an einem Pier gesammelt wurden und erreichten eine durchschnittliche Genauigkeit von 92 %.

MacNeil et al. (2021) nutzten ein leichtes und tragbares digitales holographisches Inline-Mikroskop (The HoloSea) mit maximaler Optikauflösung von 1,5 μm , intensitätsbasierter Objekterkennung und vier verschiedene vorab trainierte CNN zur Klassifizierung von 3.800 Mikro- und Mesoplanktonbildern ($> 20 \mu\text{m}$) in 19 Klassen. Die Genauigkeit der Methode lag bei $> 89 \%$.

Die Dual Scripps Plankton Camera (DSPC) ist ein neuer Ansatz zur automatisierten in situ-Überwachung von Phyto- und Zooplanktongemeinschaften basierend auf einem Dunkelfeldmikroskop mit doppelter Vergrößerung (Merz et al., 2021). Im Labor wurden Messungen der Körpergröße und -häufigkeit durch das DSPC mit mikroskopisch ermittelten Messungen kalibriert. Im Feld wurde ein DSPC fest in drei m Tiefe im Greifensee (Schweiz) installiert, und es lieferte nichtinvasiv Bilder von Plankton-Individuen, -Kolonien und -Aggregaten in stündlichen Intervallen. Das DSPC war in der Lage, die Dynamik von Taxa zu verfolgen, hauptsächlich auf Gattungsebene. Im Größenbereich zwischen $\sim 10 \mu\text{m}$ und $\sim 1 \text{ cm}$ und deckte die neue Methode viele Bestandteile des planktonischen Nahrungsnetzes einschließlich Parasiten und potenziell toxischer Cyanobakterien ab. Ein Vergleich der Daten des vor Ort eingesetzten DSPC mit herkömmlichen Daten ergab eine gute Übereinstimmung bei den Schätzungen der Planktonvielfalt und -häufigkeit.

Pastore et al. (2020) präsentieren Algorithmen zur genauen Erkennung und Klassifizierung von Planktonarten mit minimalem Aufwand. Die Algorithmen wurden an einem Planktondatensatz, der von einem speziell angefertigten linsenlosen digitalen Gerät generiert wurde, getestet. Darüber hinaus wurde ein neuer Algorithmus für Anomalieerkennungen bei nicht klassifizierten Daten entwickelt. Die Algorithmen stellen eine neue zeiteffiziente Möglichkeit dar, aquatische Systeme mit Online-Monitoring zu überwachen.

Xiong et al. (2021) entwickelten eine Methode zur in situ-Erkennung und Identifizierung von Phytoplankton: Ein linsenloser Bilddetektor für morphologische Untersuchungen wurde

kombiniert mit einem Fluoreszenz-Bildgebungsmodus für das Autofluoreszenzsignal von Phytoplankton. Beide Modi wurden in einem Mikrofluidgerät integriert. Partikel im Wasserströmungskanal können mit automatisierten Bildverarbeitungsalgorithmen und maschinellen Lernmodellen unter Verwendung ihrer Morphologie und Fluoreszenzmerkmale erkannt und klassifiziert werden. Die Genauigkeiten der Methode lagen für *Chlamydomonas* und *Euglena* bei 93,6 % bzw. 94,4 %.

In Analogie zu Mücken und Bakterien eignen sich bildgebende Verfahren nur dann für ein künftiges nGVO-Monitoring von Algen, wenn anhand phänotypischer Merkmale zwischen dem nGVO und dem Wildtyp unterschieden werden kann. Das ist jedoch nicht bei jeder neuartigen Genmanipulation der Fall. Gleichwohl können bildgebende Verfahren ergänzend für ein künftiges nGVO-Monitoring von Algen herangezogen werden, wenn Bestimmungen auf Artniveau vorgenommen werden sollen. Durch automatische Bilderkennung mittels maschinellen Lernens würde die Kosteneffizienz eines künftigen Monitorings wesentlich erhöht werden. Die automatische Bilderkennung von Algen auf Artniveau befindet sich derzeit in der Entwicklung.

4.2.3.4 Fische

Aguzzi et al. (2020) schlagen ein Netzwerk kabelgebundener Kameras vor, um eine repräsentative Langzeitüberwachung von kommerziellen Fischarten und ihrer umliegenden Lebensräume zu gewährleisten. Diese Autoren unterstreichen die Bedeutung der Erfassung der räumlichen Dimension beim Monitoring von Fischbeständen und die Notwendigkeit einer automatisierten schnellen und zuverlässigen Verarbeitung biologischer Daten.

Bilodeau et al. (2022) entwickelten ein System kostengünstiger, langfristiger Kamerafallen (Dispersed Environment Aquatic Cameras), welches in großen räumlichen Maßstäben in abgelegenen Gebieten einsetzbar ist. Die Autor*innen nutzten maschinelles Lernen, um die große Zahl der von den Kameras gesammelten Bilder zu klassifizieren. Das System erwies sich als geeignet, in Einsatztiefen bis zu 40 m ohne Wartung oder Kontrolle über einen Zeitraum von mehr als fünf Monaten zu arbeiten. Ein zur automatischen Bilderkennung verwendetes Deep-Learning-Modell erreichte eine Gesamtgenauigkeit von 92,5 %.

Capoccionia et al. (2019) entwickelten eine Methode zum Fischmonitoring mittels einer Hochfrequenz-Akustikkamera, gekoppelt mit einer automatisierten Methode zum Zählen von Fischen, die es ermöglichte, sehr große Datenmengen mit reduziertem Aufwand zu analysieren. Eine akustische Kamera wurde im Gezeitenkanal der Caprolace-Lagune (Mittelitalien) montiert und programmiert. Es fanden nachts kontinuierliche Aufzeichnungen zwischen Oktober 2016 und Februar 2017 über insgesamt 413 Stunden statt. Das akustische Muster erwies sich für verschiedene Schwarmtypen als unterschiedlich.

Cisar et al. (2021) führten eine neue vollautomatische Monitoringmethode für den atlantischen Lachs (*Salmo salar*) ein. Die Methode basiert auf einer individuellen Identifizierung anhand von digitalen Aufnahmen von Punktmustern auf der Haut und wurde an 328 Individuen mit einer Identifizierungsgenauigkeit von 100 % getestet. Langzeituntersuchungen unter Berücksichtigung der Alterung der Fische ergaben ebenfalls eine Identifizierungsgenauigkeit von 100 % für 30 Individuen (Bilder außerhalb des Wassers). Die Methodik kann an alle Fischarten mit Punkthautmuster angepasst werden und stellt eine vielversprechende nichtinvasive Alternative zur invasiven Markierung von Fischen dar.

Connolly et al. (2021) bauen auf bestehenden Deep-Learning-Methoden zur Identifizierung und Zählung von Fischen anhand von automatisierten Kamerasystemen auf. Es wurden Kombinationen von drei weiteren mathematischen Schritten getestet: unterschiedliche Konfidenzschwellen, On/Off-Nutzung der sequentiellen nicht-maximalen Unterdrückung und statistische Korrektur. Die Ergebnisse des Modells waren bei geringen Abundanz des Australischen Schnäppers genauer als bei höheren Abundanz (> 15 Fische pro Aufnahme). Das Verfahren lieferte eine gute Übereinstimmung simulierter Werte mit Ergebnissen manueller Auswertungen mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,88.

Ditria et al. (2020) erstellten drei Deep-Learning-Modelle unter Verwendung eines Objekterkennungs-Frameworks, um *Girella tricuspidata* zu erkennen. Zwei Modelle wurden mit Aufnahmen aus einzelnen Lebensräumen (Seegras oder Riff) trainiert, eines mit Aufnahmen aus beiden Lebensräumen. Alle Modelle wurden Tests aus beiden Lebensraumtypen unterzogen. Bei Testdaten aus denselben Habitattypen schnitten die Modelle gut ab (91,7 bzw. 86,9 % Genauigkeit für Seegras und Riff), bei Testdatensätzen aus einem anderen Habitattyp waren sie jedoch schlecht (73,3 bzw. 58,4 %). Das auf einer Kombination beider Lebensräume trainierte Modell lieferte bei beiden Tests die höchsten Objekterkennungsergebnisse (92,4 bzw. 87,8 %). Die Ergebnisse zeigen, dass Deep-Learning-Modelle ökologisch nützliche Informationen aus Videomaterial präzise und konsistent extrahieren und über Lebensraumtypen hinweg funktionieren können, wenn sie mit Filmmaterial aus mehreren Habitaten trainiert werden.

In einer weiteren Studie von Ditria et al. (2021) wurden die oben beschriebenen Deep-Learning-Modelle erfolgreich auf Videoaufnahmen von zwei häufig vorkommenden Fischarten, *Girella tricuspidata* und *Acanthopagrus australis*, aus Seegrashabitaten in den Flussmündungen zweier Flüsse im Südosten von Queensland, Australien, angewendet.

Zielfangarten und Beifangarten wurden in einer Studie von Khokher et al. (2022) mithilfe von Kameras auf Schiffen untersucht. Ein CNN wurde trainiert, Fischarten anhand von digitalen Videoaufnahmen zu erkennen und zu klassifizieren. Das System erreichte eine durchschnittliche Präzision von 53,42 %. Die automatischen Zählungen lagen innerhalb von zwei Standardabweichungen von den manuellen Zählungen. Im Gegensatz zu anderen Verfahren wurden Wetter- und Lichtverhältnisse größtenteils durch die Montage von Kameras unter Deck kontrolliert.

Es ist schwierig, anguilliforme Fische mithilfe akustischer Kameradaten automatisch zu identifizieren. Ziel einer Studie von Le Quinio et al. (2023) war es, eine Methode zur automatischen Erkennung, Identifizierung und Zählung von anguilliformen Fischen mithilfe von Daten aus mehreren Modellen von akustischen Kameras zu entwickeln. Die resultierende Methode lieferte vielversprechende Ergebnisse für große Aale, da mehr als 75 % der Aale automatisch mithilfe von Datensätzen von ARIS- und BlueView-Kameras erfolgreich identifiziert wurden. Jedoch wurden nur 42 % der Aale, die kürzer als 60 cm waren, erkannt.

Lopez-Marcano et al. (2021) testeten die automatische Erkennung einer häufigen Fischart (Gelbflossenbrassen, *Acanthopagrus australis*) anhand von Unterwasservideos. Die Fischbewegungen wurden mit drei Arten von Tracking-Algorithmen (MOSSE, Seq-NMS und Siam-Mask) aufgenommen, und ihre Genauigkeit bei der Charakterisierung von Bewegungen wurde bewertet. Mindestens 120 der 169 in den Videos vorkommenden einzelnen Brassen wurden korrekt identifiziert. MOSSE und SiamMask erreichten eine Genauigkeit von 78 % und Seq-NMS von 84 %.

In einer Studie von Malik et al. (2023) wurde ein neuartiges Fischerkennungsnetzwerk (FD_Net) zur Erkennung von neun verschiedenen Fischarten entwickelt. Die Klassifizierung digitaler Bilder basierte auf dem verbesserten YOLOv7-Algorithmus. Die mittlere durchschnittliche Präzision war um 14,29 % höher als in der ersten Version von YOLOv7.

Palmer et al. (2022) präsentieren ein automatisches Bildgebungsverfahren eines DCNN (Mask R-CNN) gekoppelt mit einem statistischen Modell, das automatisch die Anzahl und mittlere Gabellänge von Goldmakrelen (*Coryphaena hippurus*) schätzt. Das System arbeitet mit den gesammelten Bildern von Fischkisten. Das statistische Modell korrigiert Verzerrungen des DCNN und schätzt die mittlere Gabellänge der Fische in einer Kiste. Die Systemvorhersagen wurden empirisch validiert und zeigten eine gute Genauigkeit und Präzision.

Silva et al. (2020) stellen ein neues autonomes System vor, das an Monitoringstationen oder an Bord von Fischereifahrzeugen installiert werden kann und das in der Lage ist, alle angelandeten oder gefangenen Fische zu erfassen und automatisch und ohne physische Interaktion zu erkennen. Das System verwendet eine Kamera und einen 3D-Sensor, um eine vollständige Vermessung des Fisches zu erhalten sowie ein CNN, das an Individuen mehrerer Fischarten trainiert wurde. Das System wurde unter realen Bedingungen unter kontinuierlichem Einsatz erfolgreich validiert.

Sokolova (2021) entwickelten ein neuartiges Beobachtungssystem (NepCon), das darauf abzielt, aktuellen Einschränkungen bedingt durch schlechte Lichtverhältnisse mit einer Kombination einer optimierten Bildaufnahmeeinrichtung und maßgeschneiderter Bildanalysesoftware zu begegnen. Das NepCon-System enthält einen kontrastreichen Hintergrund, um die Sichtbarkeit der Zielobjekte zu verbessern, eine kompakte Kamera und eine künstliche Lichtquelle. Die Bildanalysesoftware umfasst einen Machine-Learning-Algorithmus, der bei einer automatischen Erkennung und Zählung von *Nephrops norvegicus* erfolgreich mit einer Genauigkeit von 76 % getestet wurde.

Ein neues Bilderfassungssystem, das nachts aufgenommene Sonar- und Kamerabilder nutzt, wurde für Aquakulturen entwickelt (Terayama et al., 2019). Der Ansatz basiert auf mehreren CNN zur automatischen Bilderkennung. Das System wurde in einer Aquakultur von Sardinen (*Sardinops melanostictus*) getestet. Die Bilder wurden gleichzeitig mit einem hochpräzisen Bildsonar und einer Unterwasserkamera aufgenommen. Experimentelle Ergebnisse zeigen, dass das vorgeschlagene Modell erfolgreich realistische Tagesbilder aus den Sonaraufnahmen und den Nachtkamerabildern erzeugt.

In Analogie zu Mücken, Bakterien und Algen eignen sich bildgebende Verfahren nur dann für ein künftiges nGVO-Monitoring von Fischen, wenn anhand phänotypischer Merkmale zwischen dem nGVO und dem Wildtyp unterschieden werden kann. Das ist jedoch nicht bei jeder neuartigen Genmanipulation der Fall. Derzeit ermöglichen bildgebende Verfahren schon taxonomische Bestimmungen und Zählungen von Fischen auf Artniveau. Kombinationen bildgebender Verfahren mit molekularen Methoden sind durch die hohe Kosteneffizienz der automatischen Bilderkennung eine vielversprechende Monitoringmethode zur Detektion von nGVO-Fischen.

4.2.4 Einbindung von Citizen Science

Mit Citizen Science (auch Bürger*innen-Wissenschaft oder Bürger*innen-Forschung) werden Methoden und Fachgebiete der Wissenschaft bezeichnet, bei denen Forschungsprojekte unter Mithilfe von oder komplett durch interessierte Laien durchgeführt werden. In der Regel

erhalten die Bürgerwissenschaftler*innen eine kurze Schulung, und das von ihnen durchgeführte Monitoring wird von Wissenschaftler*innen zur Qualitätskontrolle begleitet.

In der Vergangenheit kamen im Rahmen des Monitorings aquatischer Systeme häufig einfache wissenschaftliche Tätigkeiten wie Probenahmen und einfache Tests zum Einsatz, die von den Bürgerwissenschaftler*innen vor Ort durchgeführt werden können. Der Einsatz von Smartphones diente oft u.a. digitaler Bild- und Tonaufnahmen, die über eine Webanbindung an eine online-Datenbank übermittelt wurden. So können z. B. Fotos und Tonspuren von Mücken oder Bilder von geangelten Fischen hochgeladen werden, die anschließend von Wissenschaftler*innen ausgewertet werden. Im Rahmen solcher Projekte kam fast immer eine Software für Smartphones oder Tablet-PC zum Einsatz, die speziell für den Zweck eines bestimmten Monitorings entwickelt wurde. In der Regel war die Software lizenzfrei, um eine breite Anwendung zu ermöglichen.

Daten aus Citizen-Science-Projekten können gekoppelt werden mit klassischen Monitoringmethoden, modernen Fernerkundungsverfahren und automatischer Bilderkennung mittels CNN oder DCNN. Dadurch können z. B. Kalibrierungen von Daten aus der Fernerkundung vorgenommen werden.

Die Verwendung von Daten, die durch Bürgerwissenschaftler*innen erhoben werden, wurde in der Vergangenheit kritisch diskutiert. Hierbei stand die Qualität der Daten im Fokus. Durch einen umfassenden Blick auf bisherige Vergleichsstudien zur Wasserqualität zeigen Albus et al. (2019) den Bedarf an zusätzlichen Studien auf, die sich speziell mit der Qualität hochvariabler, groß angelegter Datensätze befassen, die von Bürgerwissenschaftler*innen erhoben wurden.

Der wesentliche Vorteil der Einbeziehung von Citizen Science ist die kosteneffiziente Erhebung großer Datenmengen. Weiterhin werden Bürger*innen für Forschungsfragen und Umweltproblematiken sensibilisiert, und es kann in der Öffentlichkeit ein bewussterer Umgang mit Schadstoffen und natürlichen Ressourcen erreicht werden.

4.2.4.1 Mücken

Abourashed et al. (2021) untersuchten in einem Review-Artikel die Beteiligung von Bürgerwissenschaftler*innen am Monitoring von Infektionskrankheiten. Die Mehrheit der erfassten Projekte konzentrierte sich auf die Artenvielfalt. Während einige Projekte Probleme mit der Datenqualität hatten, konnten Studierende unterschiedlicher Bildungsniveaus und verschiedener Fachrichtungen mehrheitlich verwertbare Daten zusammentragen, die mit Expertendaten vergleichbar waren.

Araujo et al. (2020) beschreiben ein einfaches System zur Erfassung von tag- und nachtaktiven Mückenarten, die FlyBox, welche mit Unterstützung von Bürgerwissenschaften die Aktivität von *Anopheles*-Mücken einfach, bequem, kostengünstig und genau messen kann. Die Ergebnisse unter Hell-Dunkel- sowie konstanten Dunkelheitsbedingungen waren mit Ergebnissen in der Literatur kompatibel.

Bakran-Lebl et al. (2022) stellen das Projekt „Mosquito Alert“ vor. Dieses Projekt bietet Bürger*innen die Möglichkeit, sich über die App Mosquito-Alert am Mückenmonitoring zu beteiligen und Fotos von Mücken hochzuladen. Die Fotos wurden taxonomisch untersucht und die Art identifiziert. Anschließend werden die Ergebnisse in einer öffentlichen Datenbank gespeichert, die als Karte der Mückenverteilungen visualisiert werden kann. Auf diese Weise können

nicht nur bisher unbekannte Mückenpopulationen entdeckt werden, sondern es können auch die Einführung und Ausbreitung neuer Arten frühzeitig erkannt werden.

ZanzaMapp wurde als erste mobile „Mückenanwendung“ für Smartphones von Caputo et al. (2020) entwickelt, um die Wahrnehmung von italienischen Bürger*innen hinsichtlich der Mückenvielfalt zu bewerten. Anders als andere Anwendungen, die auf Mücken abzielen, setzt ZanzaMapp Prioritäten hinsichtlich der wissenschaftlichen Authentifizierung: Benutzer*innen werden aufgefordert, auf vier einfache Fragen zur wahrgenommenen Anwesenheit, Häufigkeit, Belästigung von Mücken und zur Geolokalisierung der Aufzeichnungen Antworten zu geben. Die Autor*innen diskutieren die Ergebnisse hinsichtlich der Nutzung und Wertschätzung der App durch die Benutzer*innen sowie der Konsistenz der Ergebnisse als positiv.

Carney et al. (2022) standardisierten und kombinierten Daten aus mehreren internationalen Citizen-Science-Apps – Mosquito Alert, iNaturalist, GLOBE Observer's Mosquito Habitat Mapper und Land Cover – zur Unterstützung von Forscher*innen und politischen Entscheidungsträger*innen bei der Bekämpfung von Krankheiten, die durch Mücken übertragen werden. Die Autor*innen starteten darüber hinaus koordinierte Medienkampagnen und nutzten Fotos von Bürgerwissenschaftler*innen zur automatischen Identifizierung von Mückenarten anhand von bestimmten anatomischen Regionen.

Craig et al. (2021) rekrutierten, schulten und rüsteten freiwillige Helfende auf den Solomonen aus, um Mücken in ihren Häusern zu fangen und zu sortieren. Die Übermittlung von Zählenden an eine zentrale Behörde erfolgte per Kurznachrichtendienst. Weitere Daten wurden erhoben, um die Häufigkeit und Stabilität der Berichterstattung sowie die Erfahrungen der Freiwilligen zu messen. Die Übereinstimmung der Mückenidentifikation der Bürgerwissenschaftler*innen und des begutachtenden Entomologen lag bei 94 %. Die Möglichkeit, einen Beitrag zur Mückenbekämpfung zu leisten, der soziale Nutzen des Projekts, die Möglichkeit, neue Fähigkeiten zu erlernen, und die Häufigkeit der Zusammenarbeit mit Projektmitarbeitern waren Hauptmotivatoren für die Teilnahme. Instabile Stromversorgung (erforderlich für den Betrieb des Ventilators der Falle), unzureichende Personalausstattung und mangelnde finanzielle Unterstützung zum Kauf von Strom und Telefonguthaben wurden als Hindernisse einer erfolgreichen Umsetzung der Initiative identifiziert.

Eritja et al. (2019) berichten über den ersten Nachweis von *Aedes japonicus* in Spanien, an seinem südlichsten Standort in Europa. Der Befund wurde durch die Citizen-Science-Plattform Mosquito Alert ausgelöst. Im Juni 2018 schickte ein Bürger eine Meldung über die Mückenwarn-App der Gemeinde Siero in der Region Asturien (Nordwestspanien) mit Bildern eines Weibchens. Anhand dieser und weiterer Bilder konnte der Fund von Wissenschaftler*innen bestätigt werden.

Die Zusammenarbeit zwischen Mosquito Alert, dem spanischen Gesundheitsministerium, lokalen Behörden und akademischen Forscher*innen führte zu einem Monitoring von Mücken, das aktive Feldprobenentnahme mit breiten zeitlichen und räumlichen Datenquellen kombinierte (Eritja et al., 2021). Das führte wiederum zu einer flexibleren und effizienteren Monitoringstrategie. Zwischen 2018 und 2020 führten die gemeinsamen Anstrengungen von Verwaltungsbehörden, akademischen Teams und Bürgerwissenschaftler*innen zur Entdeckung neuer Mückenvorkommen in nördlichen Regionen Spaniens wie Kantabrien und dem Baskenland.

Neben der aktiven Überwachung an Häfen und Landtransportstandorten betreibt die britische Gesundheitssicherheitsbehörde ein passives Mückenmonitoring (Johnston et al., 2023), das

Mosquito Recording Scheme (MRS). Das MRS ist ein bürgerwissenschaftliches Programm und identifiziert Mücken, die von Bürgerwissenschaftler*innen gemeldet werden, z. B. als Reaktion auf lästige Stechvorfälle. Die Ziele des Systems bestehen darin, ungewöhnliche oder invasive Arten zu erkennen und ein Protokoll über meldepflichtige Vorfälle zu erstellen. Zwischen 2005 und 2021 wurden beim MRS 286 Mücken gemeldet, bei denen es sich ausschließlich um einheimische Arten handelte.

Der Mosquito Alert-Datensatz enthält Aufzeichnungen über das Vorkommen adulter Mücken, die weltweit in den Jahren 2014–2020 gesammelt wurden (Južnič-Zonta et al., 2022). Mosquito Alert ist ein bürgerwissenschaftliches System zur Untersuchung krankheitsübertragender Mücken. Die Aufzeichnungen sind mit eingereichten Fotos verknüpft und werden von Entomolog*innen validiert, um das Vorkommen von fünf europäischen Mückenarten zu bestimmen: *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. japonicus*, *Ae. koreicus* und *Culex pipiens*. Unter anderem dient das System als Frühwarnsystem für das Risiko von durch Mücken übertragenen Krankheiten. Es kann auch für die Modellierung von Vektoren verwendet werden, um Expositionsrisiken zu erkennen oder Erkennungs- und Klassifizierungsroutinen für maschinelles Lernen zu trainieren.

Die GLOBE Observer-Anwendung des GLOBE-Programms ist eine kostenlose mobile Datenerfassung für Bürgerwissenschaftler*innen (Low et al., 2021). Das Erfassungs- und Visualisierungstool ist mit den Betriebssystemen iOS und Android kompatibel. Es können mit einem Habitat-Mapping-Tool Mückenlarven-Lebensräume gemeldet werden. Eine benutzerfreundliche Bildoberfläche ermöglicht Benutzer*innen die Georeferenzierung und Beschreibung der angetroffenen Eiablagestellen, die Zählung und Identifizierung der Mückenlarven und gegebenenfalls die Beseitigung der Larvenlebensräume. Während der ersten vier Nutzungsjahre von Mosquito Habitat Mapper wurden weltweit über 32.000 Datenbeobachtungen gemeldet (Low et al., 2022).

Es wurden Hinweise zum verbreiteten Vorkommen von *Aedes cretinus* auf Zypern durch Bürgerwissenschaftler*innen gesammelt, was auf das Fehlen invasiver *Aedes*-Arten schließen ließ (Martinou et al., 2021). Citizen Science-Aufzeichnungen zeigten, dass *Ae. cretinus* höchstwahrscheinlich eine inselweite räumliche Verbreitung aufweist und seine saisonale Aktivität auf die Frühlings- und Sommermonate beschränkt ist. Von Bürgerwissenschaftler*innen gesammelte Daten der Initiative „The Three Mosquiteers“ lieferten mehr Aufzeichnungen als alle Bemühungen der Behörden auf Zypern in den letzten 73 Jahren.

In fünf Dörfern in Ruanda wurde ein einjähriges bürgerwissenschaftliches Programm zur Überwachung von Malaria-Mücken durchgeführt (Murindahabi et al., 2021). 112 ehrenamtliche Bürger*innen meldeten monatlich Daten über Mücken, die in ihrer häuslichen Umgebung mit handgefertigten, mit Kohlendioxid bestückten Fallen gesammelt wurden (Murindahabi et al., 2022). Darüber hinaus berichteten sie über aufgetretene Mückenbelästigungen und dokumentierten die Anzahl der bestätigten Malariafälle in ihrem Haushalt. Insgesamt wurden 3.793 weibliche Mücken gesammelt, davon 10,8 % *Anopheles*-Mücken. Über den gesamten Zeitraum gaben 16 % der Freiwilligen an, mindestens einen bestätigten Malariafall pro Monat zu haben. Im Untersuchungsjahr meldeten 66 % der Haushalte mindestens einen Malariafall. Die Ergebnisse zeigten signifikante positive Korrelationen zwischen gemeldeten und bestätigten Malariafällen und zwischen der Gesamtzahl von Culicidae und bestätigten Malariafällen, nicht jedoch zwischen der Zahl von *Anopheles gambiae* und Malariafällen.

Durch ein bundesweites Überwachungsprogramm in Deutschland werden Mücken seit 2011 überwacht – aktiv durch systematisch betriebene Fallen und passiv durch den „Mückenatlas“, einem Citizen Science-Projekt, das 2012 gestartet wurde (Pernat et al., 2021a). Es wurde ein Vergleich der beiden Datensätze hinsichtlich der Habitatabdeckung, der Artenzusammensetzung und der Fähigkeit, invasive Mücken zu erkennen, vorgenommen. Signifikante Unterschiede wurden in der Artenzusammensetzung festgestellt, die durch Landnutzungstypen und die Aufzeichnungsaktivität der Teilnehmer*innen verursacht werden. Die aktive Überwachung schnitt besser ab bei der Kartierung der Mückenvielfalt, wohingegen passives Monitoring invasive Arten besser erkennt. Aktives und passives Monitoring ergänzen sich daher.

Mithilfe des „Mückenatlas“ wurden die Zusammensetzung, Häufigkeit und Vielfalt der Arten für unterschiedliche Urbanisierungsgrade zur Ermittlung von Präferenzen von Mücken für weniger oder stärker urbanisierte Gebiete untersucht. Pernat et al. (2021b) fanden, dass der Artenreichtum und die Artenvielfalt mit zunehmender Urbanisierung abnehmen.

Ergebnisse einer weiteren Studie derselben Autor*innen zeigen, dass die zeitliche Variation der Meldungen im Rahmen des „Mückenatlas“ durch die schwankende Aktualität von durch Mücken übertragenen Krankheiten in den Medien (Pernat et al., 2022) und im großen Maßstab durch sich ändernde Klimabedingungen vorangetrieben werden (Pernat et al., 2021c). Statistische Modelle deuten auf eine positive Assoziation der Meldungszahlen mit menschlicher Bevölkerungsdichte, einem Fangort in der ehemaligen DDR und dem Vorhandensein von Wasser hin. Hingegen sind Niederschlag und Windgeschwindigkeit negative Prädiktoren. Der „Mückenatlas“ wurde kürzlich institutionalisiert und wird langfristig fortgeführt werden (Werner et al., 2020).

Basierend auf den Daten des „Mückenatlas“ wurde von Wieland et al. (2021) ein Lebensraummodell für heimische Mückenarten in Deutschland, die als Überträger des West-Nil-Fiebers gelten, entwickelt. Daten von Mücken aus dem „Mückenatlas“ wurden ergänzt durch Daten aus der systematischen Fallenüberwachung in Deutschland, Daten des Deutschen Wetterdienstes und OpenStreetMap. Die Eignung von Lebensräumen für Mücken lässt sich mit einem Klimamodell kombinieren. Die Modelle basierten auf einem maschinellen Lernansatz. Ergebnisse der kombinierten Klima- und Regionalmodelle sind Karten, die die überlagerte Eignung von Lebensräumen zeigen.

Im Sommer 2017 wurde in Österreich ein Projekt zum Monitoring der Eiablage neu eingeführter *Aedes*-Mücken mithilfe von Ovitrapps initiiert. Das Projekt wurde von Bürgerwissenschaftler*innen und Forscher*innen durchgeführt (Schoener et al., 2019). Eier von *Ae. albopictus* wurden in Tirol in den Monaten August und September nachgewiesen, *Ae. japonicus* wurde in Niederösterreich, in der Steiermark und im Burgenland gefunden.

Sousa et al. (2022) geben einen Überblick über Citizen-Science-Projekte zum Monitoring von Mücken. Insgesamt 29 Studien in 16 Ländern wurden ausgewertet, außerdem drei Programme mit breiter geografischer Abdeckung. Die Programme beinhalteten unterschiedliche Strategien und Methoden entsprechend ihren lokalen und nationalen Kontextanforderungen. Die Mehrheit der Programme war kostenlos oder kostengünstig und für die Teilnehmer*innen leicht zugänglich. Gesundheitsaspekte, Nachhaltigkeit und Skalierbarkeit der Programme müssen jedoch weiterentwickelt werden.

Die Einbindung von Bürgerwissenschaftler*innen in das Monitoring von Mücken ist weit verbreitet. Dadurch können finanzielle und logistische Kosten erheblich reduziert werden, und Daten in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung erhoben werden. Eine Kombination mit

der taxonomischen Bestimmung durch Expert*innen ist für ein künftiges nGVO-Monitoring geeignet, wenn die durch neue Gentechnik hervorgerufenen genetischen Änderungen phänotypische Veränderungen der nGVO-Mücken zur Folge haben. Mit dem „Mückenatlas“ liegt in Deutschland bereits ein etabliertes Monitoringprogramm vor, das die Beteiligung von Bürgerwissenschaftler*innen langfristig seit 2012 nutzt. Die Qualität der hierbei erhobenen Daten erwies sich als hinreichend, um Aussagen über die Artenvielfalt und das Auftreten invasiver Arten zu treffen. Dabei ergänzen sich passives Sammeln und aktives Sammeln mit Mückenfallen. Ein künftiges nGVO-Monitoring könnte auf die vorhandenen Daten und künftig gemeldete Funde zurückgreifen, da nicht nur bildgebende Verfahren zum Einsatz kommen, sondern Mückenindividuen gesammelt und von Expert*innen bestimmt werden. Für die Identifikation von nGVO ist jedoch die Ergänzung dieser Methode mit neuartigen molekularbiologischen Verfahren notwendig, insbesondere wenn Mutationen keine phänotypischen Veränderungen bewirken wie zum Beispiel bei einer Mutation, die sterile Männchen erzeugt.

4.2.4.2 Bakterien

Baalbaki et al. (2019) führten mit Bürgerwissenschaftler*innen Labor-, Winter- und Sommer-Probenahmekampagnen zur Überwachung der Grundwasserqualität im Libanon durch. Zwölf physikalische, chemische und biologische Wasserqualitätsparameter wurden getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die von den Bürgerwissenschaftler*innen generierten Daten vergleichbar waren mit Daten, die größtenteils von Universitätsforscher*innen generiert wurden. Jedoch zeigten die bakteriologischen Testergebnisse einen deutlichen Unterschied. Das konnte auf die Komplexität des Tests zurückgeführt werden.

Moshi et al. (2022) untersuchten den Einsatz von Citizen Science zur Überwachung der Dynamik von *E. coli*-Konzentrationen im Tanganjikasee als ergänzende Methode zu behördlichen und projektbezogenen Messungen. Bürgerwissenschaftler*innen aus fünf Gemeinden wurden eingangs geschult. Sie überwachten *E. coli*-Bakterien und die Trübung monatlich für ein Jahr parallel zu Wissenschaftler*innen. Eine standardisierte und kalibrierte Secchi-Scheibe wurde zusammen mit einem Röhrchen zur Probenahme verwendet. Die von Bürgerwissenschaftler*innen ermittelten *E. coli*-Konzentrationen stimmten gut mit denen durch die Wissenschaftler*innen erhobenen überein.

Im stadtnahen Gebiet von Shanghai wurden im Laufe von vier Jahren Wasserproben von Bürgerwissenschaftler*innen gesammelt (Pérez-Belmont et al., 2019). Das Ziel des Projektes war festzustellen, wie sich die Wasserqualität in Gebieten mit unterschiedlicher Bewirtschaftung und zwischen Trocken- und Regenzeit unterscheidet. Es gab signifikante saisonale Unterschiede bei pH-Wert, Temperatur, gelöstem Sauerstoff, *Escherichia coli* und Leitfähigkeit.

Zur Quantifizierung der Variabilität von fäkalen Bakterien wurden Citizen-Science-Daten und Random-Effects-Modelle von Weller et al. (2022) verwendet. Unabhängig davon wurden Bayes'sche Modelle entwickelt, welche das Verhältnis der räumlichen zur nicht-räumlichen Varianz der Bakterien quantifizieren und Zusammenhänge zwischen ihnen und Umweltfaktoren identifizieren. Diese Studie betont die Bedeutung der räumlichen Skalierung beim Entwerfen von Monitoringprogrammen für aquatische fäkale Bakterien.

Die Einbindung von Bürgerwissenschaftler*innen für das Monitoring von Bakterien erfolgte in der Vergangenheit sowohl bei der Entnahme von Proben als auch im Rahmen einfacher Tests im Gelände. Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse vergleichbar waren mit denen von geschultem wissenschaftlichem Personal. Zur Identifizierung von nGV-Bakterienstämmen sind

jedoch ergänzend neuartige molekularbiologische Nachweismethoden notwendig, welche nur von Expert*innen angewendet werden können.

4.2.4.3 Mikroalgen

Diviacco et al. (2021) stellen MaDCrow, ein Forschungs- und Entwicklungsprojekt vor, das Bürger*innen als Datensammler*innen einbezieht und gleichzeitig eine Steigerung des öffentlichen Umweltbewusstseins anstrebt. Sein Ziel war die Schaffung einer innovativen technologischen Infrastruktur für die Echtzeiterfassung und den Zugriff auf Daten über die Wasserqualität im Golf von Triest. Die Datenerfassung erfolgte autonom mit einem Gerät, das im Rahmen des Projekts entwickelt wurde und auf jedem kleinen Segelschiff eingesetzt werden kann. Das Gerät verfügte über kostengünstige Sensoren zur Messung von pH-Wert, Temperatur, gelöstem Sauerstoff und Salzgehalt sowie die notwendige Hardware und Software. Das Erfassen, Georeferenzieren und Übertragen der Umweltdaten erfolgte ohne Beeinträchtigung der Aktivitäten der Boote. Der neue Ansatz ermöglichte zu sehr geringen Kosten ein Monitoring der Wasserqualität und die Hervorhebung lokaler Anomalien mit einer Auflösung und räumlichen und zeitlichen Abdeckung, die mit bisherigen Verfahren noch nicht erreichbar war.

George et al. (2021) beschreiben ein Citizen-Science-Netzwerk, das zur Bewertung der Gewässergüte von Seen entwickelt wurde. Das Netzwerk von Bürgerwissenschaftler*innen wurde mit der Unterstützung von Student*innen aus 16 Hochschulen und drei Universitäten gegründet. Mini-Secchi-Scheiben und Forel-Ule-Farbskalenaufkleber wurden verwendet, um die Farbe und Klarheit des Gewässers zu messen. Zur einfachen Übertragung wurde eine mobile Anwendung namens „TurbAqua“ entwickelt. Zur Überprüfung der Qualität der Daten wurden in-situ-Daten von Wissenschaftler*innen herangezogen.

SIMILE (Informationssystem für die integrierte Überwachung der Insubrischen Seen und ihrer Ökosysteme) ist ein grenzüberschreitendes italienisch-schweizerisches Projekt mit dem Ziel, die Bewirtschaftung der Insubrischen Seen und ihrer angrenzenden Ökosysteme mit verschiedenen Technologien sowie der Beteiligung von Bürger*innen und Interessengruppen zu verbessern (Vavassori et al., 2021). In diesem Projekt wurden Wassermonitoring und -management mithilfe verschiedener Methoden durchgeführt: In-situ-Sensoren, Satellitenbilder und Daten aus der Bürgerwissenschaft. Hierfür kamen u. a. eine mobile plattformübergreifende Anwendung für Smartphones und eine Webanwendung für Administrator*innen zum Einsatz.

Die Einbindung von Bürgerwissenschaftler*innen für das Monitoring von Algen beschränkt sich zurzeit auf die Entnahme von Proben, die im Labor von Expert*innen untersucht werden. In einem künftigen nGVO-Monitoring würden die finanziellen und logistischen Kosten durch Citizen Science reduziert werden. Jedoch sind in jedem Fall wie bei Bakterien ergänzend neuartige molekularbiologische Nachweismethoden für ein künftiges nGVO-Monitoring notwendig, welche nur von Expert*innen angewendet werden können.

4.2.4.4 Fische

Die Anglers' Riverfly Monitoring Initiative (ARMI) ist ein britisches bürgerwissenschaftliches Projekt zur Erfassung der Gewässergüte von Fließgewässern (Brooks et al., 2019). Derzeit gibt es mehr als 2.000 ARMI-Freiwillige, die mehr als 1.600 Standorte überwachen. ARMI erwies sich als wirksam bei der Früherkennung von Wasserverschmutzungen als Ergänzung zur routinemäßigen Überwachung durch die gesetzlichen Umweltbehörden des Vereinigten Königreichs. ARMI-Freiwillige wurden für das Monitoring ausgebildet. Es werden standardisierte Proben von wirbellosen Süßwassertieren genommen. Es wurde weiterhin ein ARMI-Score

entwickelt, der auf der Häufigkeit der wichtigsten verschmutzungsempfindlichen Taxa basiert. ARMI-Scores und die Metrics des Standardmonitorings sind aneinandergekoppelt. Jede Probenahmestelle verfügt über einen von der nationalen Regulierungsbehörde festgelegten „Trigger-Level“. Wenn der ARMI-Score unter diesen Auslösewert fällt, wird die Aufsichtsbehörde benachrichtigt und die zuständige Behörde untersucht die Ursache für den niedrigen Score.

In einer Studie von DiBattista et al. (2021) wurde untersucht, ob Daten, die aus einem Online-Citizen-Science-Projekt stammen (iNaturalist: Australasian Fishes) beim Fischmonitoring hilfreich sein können. Hierbei wurde der Fokus auf geschützte Fischarten in Australien und Neuseeland gelegt. Es wurden neben der Erfassung der Fische durch Bürgerwissenschaftler*innen Daten aus Werbespots untersucht. Trotz räumlicher Lücken in der Abdeckung zwischen den großen Städten erwiesen sich die Citizen Science-Daten für endemische Fischarten als qualitativ vergleichbar mit den verfügbaren geografischen Verteilungen aus wissenschaftlichen Untersuchungen.

Gundelund et al. (2020) untersuchten die Eigenschaften von Daten der Benutzer*innen einer dänischen Citizen-Science-Smartphone-Anwendung und -Website, die Angler*innen ermöglichen, Daten von Angeltouren zu melden. Die Autor*innen stellten fest, dass die Nutzer*innen der Citizen-Science-Plattform jünger waren und höhere Fangraten hatten als Nichtnutzer*innen. Auf der Citizen-Science-Plattform waren 21 % der Nutzer*innen aktiv, d. h. mindestens einmal innerhalb von drei Monaten nach der Erstellung eines Kontos wurden Daten beige-steuert. Weitere 22 % nutzten die Plattform als Informationsquelle (z. B. Fangstatistiken oder Vorschriften) für mindestens drei Monate. Diese Dauernutzer*innen waren älter und maßen dem Angeln als Hobby eine höhere Bedeutung zu als Nichtnutzer*innen.

Eine Fallstudie von Parretti et al. (2023) konzentrierte sich auf die invasive Fischart Goldbrasse (*Sparus aurata*), die aus Offshore-Farmen auf der Insel Madeira entkommen war. Ein Citizen-Science-Ansatz diente zur Risikobewertung und zur georeferenzierten Ausbreitungsdatenerfassung. Die Arteninvasivität wurde unter Verwendung des Aquatic Species Invasiveness Screening Kit (AS-ISK) überprüft und ergab ein hohes Invasionsrisiko. Das Vorkommen von *S. aurata* wurde unter Einbeziehung der Bürger*innen im Rahmen von Freizeitangelwettbewerben in partizipativen GIS-Kartierungen bewertet. Eine Wahrscheinlichkeitskarte zeigte, dass *S. aurata* weit verbreitet in den Gewässern der Insel Madeira vorkommt.

Teilweise sind Bürgerwissenschaftler*innen in staatliche Monitoringprogramme wie ARMI in Großbritannien schon integriert. Der Nutzen durch eine hohe zeitliche Frequenz, eine hohe räumliche Abdeckung und eine hohe Kosteneffizienz macht Citizen Science für ein künftiges nGVO-Monitoring von Fischen attraktiv. Die Artbestimmung kann auch durch Bürgerwissenschaftler*innen erfolgen, jedoch sind für die Unterscheidung von Wildtyp und nGVO wahrscheinlich noch Expert*innen notwendig, welche die Klassifizierung auf der Basis phänotypischer Merkmale oder neuartiger molekularbiologischer Erfassungsmethoden vornehmen.

5 Schlussfolgerungen und Empfehlungen für die Konzeption eines GVO-Monitorings in Binnengewässern

Die Modellergebnisse zeigen, dass die Ausbringung der nGVO ins Freiland teilweise gravierende Folgen für den jeweiligen Wildtyp und die konkurrierenden Arten und somit für das gesamte aquatische Ökosystem haben. Die Populationen der Prädatoren und der Beutearten werden in den Referenzszenarien im Vergleich hierzu weniger beeinflusst. Gleichwohl sind die Auswirkungen auf die betroffenen Ökosysteme erheblich und deren Stabilität gefährdet. Aus den Ergebnissen der Szenarienanalysen wird weiterhin deutlich, dass bei Ausbringung eines nGVO das gesamte Nahrungsnetz von Beute-, Konkurrenz- und Prädatorarten von den Auswirkungen betroffen ist. Bei Mücken, Mikroalgen und Bakterien stehen Prädatoren jedoch nicht im Fokus. Für eine Erfassung des ökologischen Zustandes der betroffenen Gewässer aus Sicht der WRRL ist es daher wichtig, dass ein künftiges Monitoring nicht nur die Abundanzen der nGVO-Populationen erfasst, sondern darüber hinaus auch Aussagen über weitere Arten der aquatischen Lebensräume treffen kann. So wäre eine ökologische Gesamtbewertung der Effekte der Ausbringung eines nGVO möglich. Dabei ist besonders eine Erfassung von nGVO, Wildtyp und Konkurrenzarten wichtig, da das Verhältnis schnell kippen kann und konkurrierende Arten von der Ausbringung von nGVO in den Modellen erheblich beeinflusst werden. Die hohen lokalen Sensitivitäten der Modelle bezüglich der ökologischen Kapazität weisen darauf hin, dass neben den aquatischen Organismen wie im etablierten Monitoring auch physikochemische Begleitparameter wie Nährstoffkonzentrationen und Lichtverhältnisse (Algen) erfasst werden sollten. Für ein nGVO-Monitoring sind molekularbiologische Methoden unabdingbar, wenn keine phänotypischen Veränderungen vorliegen. Da die Fitness des nGVO in allen Modellen eine entscheidende Rolle spielte, sollte ein künftiges Monitoring jedoch auch morphologische Abweichungen und physiologische Verhaltensänderungen des nGVO dokumentieren, welche die Fitness des nGVO fördern oder beeinträchtigen. Die zeitlichen Dynamiken der Populationen sind sehr schnell. Ein künftiges Monitoring sollte daher zeitlich hochauflösend sein. Hierfür sind neuartige molekularbiologische Nachweismethoden geeignet. Da Fließgleichgewichte in den Modellergebnissen teilweise nur langsam erreicht werden, ist ein langfristig angelegtes Monitoring erforderlich. Das betrifft insbesondere die Regenbogenforelle (*O. mykiss*), da diese Art eine lange Generationszeit hat. Modelle ermöglichen es zudem, Ausbreitungstendenzen vorherzusagen, was dann auf Landschaften hochgerechnet werden kann.

Das Monitoring der Oberflächengewässerqualität nach WRRL wäre in Verbindung mit neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden, welche eine Unterscheidung anhand morphologischer, genetischer oder molekularer Merkmale ermöglichen, für ein Monitoring von nGVO in Binnengewässern geeignet. Die Monitoringprogramme zur Bewertung der Oberflächengewässerqualität nach WRRL decken jedoch nur größere Gewässer ab. Ein ergänzendes Monitoringprogramm wäre das nationale Projekt Kleingewässermonitoring (KgM), welches einen Ansatz für ein deutschlandweit einheitliches Monitoring von Kleingewässern darstellt. Für eine Einbindung der Kleingewässer in ein nGVO-Monitoring müssten die Möglichkeiten eines Kleingewässermonitorings ausgeweitet und weiter etabliert werden. Alternativ könnten die Messnetzte der WRRL-Monitoringprogramme mit Messstationen in Kleingewässern ergänzt werden.

Ein Monitoring des Grundwassers eignet sich potentiell zur Untersuchung von Bakterien und anderen im Grundwasser lebenden Artengruppen, wenn Biota wie Nematoden und Bakterien

erfasst werden. Für den Nachweis von Mücken, Mikroalgen oder Fischen eignet sich eine Analyse des Grundwassers jedoch nicht. Dabei ist auch im Fall der Bakterien eine Ausweitung und Etablierung eines regelmäßigen flächendeckenden biologischen Grundwassermonitorings erforderlich. Da der Aufwand für die Einrichtung eines solchen Monitorings sehr hoch ist und dieses unter den ausgewählten Organismengruppen letztendlich nur für die Bakterien nutzbar wäre, wird die Überwachung von Grundwasser für das angedachte nGVO-Monitoring nicht empfohlen.

Fernerkundungsmethoden eignen sich zwar für ein Habitatmonitoring, sie ermöglichen jedoch wegen der geringen räumlichen Auflösung keine Erkennung von nGVO. Daher sind sie für ein künftiges nGVO-Monitoring von nGVO wenig geeignet.

Bildgebende Verfahren eignen sich nur dann für ein künftiges nGVO-Monitoring, wenn anhand phänotypischer Merkmale zwischen dem nGVO und dem Wildtyp unterschieden werden kann. Das ist jedoch nicht bei jeder neuartigen Genmanipulation der Fall. Gleichwohl können bildgebende Verfahren ergänzend für ein künftiges nGVO-Monitoring herangezogen werden, wenn Bestimmungen auf Artniveau vorgenommen werden sollen. Durch automatische Bilderkennung mittels maschinellen Lernens würde die Kosteneffizienz eines künftigen nGVO-Monitorings wesentlich erhöht werden.

Die Einbindung von Bürgerwissenschaftler*innen in das Monitoring von Mücken ist weit verbreitet. Mit dem „Mückenatlas“ liegt in Deutschland bereits ein etabliertes Monitoringprogramm vor, dass die Beteiligung von Bürgerwissenschaftler*innen langfristig nutzt. Ein künftiges nGVO-Monitoring könnte auf die vorhandenen Daten und Funde zurückgreifen, da nicht nur bildgebende Verfahren zum Einsatz kommen, sondern Mückenindividuen gesammelt und von Expert*innen bestimmt werden. Für die Identifikation von nGVO ist jedoch die Ergänzung dieser Methode mit neuartigen molekularbiologischen Verfahren notwendig, insbesondere wenn Mutationen keine phänotypischen Veränderungen bewirken. Zur Identifizierung von nGV-Bakterienstämmen und nGV-Mikroalgen durch Bürgerwissenschaftler*innen sind ergänzend neuartige molekularbiologische Nachweismethoden notwendig, welche nur von Expert*innen angewendet werden können. Der Nutzen durch eine hohe zeitliche Frequenz, eine hohe räumliche Abdeckung und eine hohe Kosteneffizienz macht Citizen Science für ein künftiges nGVO-Monitoring von Fischen attraktiv. Für die Unterscheidung von Wildtyp und nGVO sind jedoch Expert*innen notwendig, welche die Klassifizierung auf der Basis phänotypischer Merkmale oder neuartiger molekularbiologischer Erfassungsmethoden vornehmen.

Bei der Prüfung der Eignung der einzelnen neuen Monitoringverfahren stellte sich heraus, dass qPCR (Bakterien, Mikroalgen und Fische) und Barcoding (Mücken) aktuell am häufigsten verwendet werden (vgl. Tab. 23 im Anhang). Nichtmolekularbiologische Methoden wie Fernerkundung, bildgebende Verfahren und der Einsatz von Citizen Science schnitten in der Regel schlechter ab als neuartige molekularbiologische Nachweismethoden, da erstere nGVO nicht vom Wildtyp unterscheiden können, wenn keine morphologischen Veränderungen des nGVO vorliegen. Eine Ausnahme bildet die Beteiligung von Bürgerwissenschaftler*innen beim in Deutschland etablierten Monitoring von Mücken („Mückenatlas“), das zusammen mit Expert*innen durchgeführt wird. Hierbei ist jedoch eine Ergänzung durch neuartige molekularbiologische Nachweismethoden notwendig, wenn sich der nGVO phänotypisch nicht vom Wildtyp oder von Hybriden unterscheidet. Eine Anbindung neuartiger molekularbiologischer Verfahren an dieses Monitoringprogramm ist daher denkbar und empfehlenswert. Der „Mückenatlas“ könnte allerdings nur ergänzend im Rahmen eines nGVO-Monitorings genutzt werden, da die Einsendungen nicht systematisch erfolgen. Er könnte als Supplement zu

regelmäßigen Erfassungen von Mücken mit regionalen Schwerpunkten je nach Ausbringung der nGVO in Kombination mit neuen molekularbiologischen Methoden dienen. Die neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden werden immer weiterentwickelt, so dass in naher Zukunft mit noch höheren Genauigkeiten und höherer Kosteneffizienz zu rechnen ist. Auch eine Verschiebung in Hinblick auf die Relevanz der Methoden durch zukünftige Entwicklungen kann nicht ausgeschlossen werden. Dabei ist es zum Beispiel denkbar, dass isotherme Amplifikationsmethoden (wie LAMP oder RPA) in Zukunft an Bedeutung gewinnen und gerade im Bereich der Feldversuche bevorzugt werden. Zudem liegen die qPCR, das Barcoding, das Metabarcoding und die dPCR in den Punktzahlen für alle Organismengruppen sehr nah beieinander, so dass eine Verschiebung in der Anwendungshäufigkeit, ein Voranschreiten der Standardisierung oder eine Weiterentwicklung der Methode die Bewertung der Methoden verändern könnte. Die qPCR könnte zum Beispiel auch im Fall der Mücken verwendet werden, da die Methode sich nur um 0,5 Punkte zu dem für die Mücken am höchsten bewerteten Barcoding unterscheidet. Eine allgemeine Empfehlung ist nur eingeschränkt möglich, da die verschiedenen neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden unterschiedliche Schwerpunkte aufweisen. Anhand der Ergebnisse der Bewertung können jedoch die qPCR, das Barcoding, das Metabarcoding und die dPCR als die zurzeit relevantesten neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden herausgestellt werden. Dabei gilt es zu beachten, dass keine der neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden eine Untersuchung des gesamten Genoms auf unbekannte Mutationen erlaubt. Eine solche Analyse wäre zurzeit nur durch eine Genomsequenzierung möglich, wie sie zum Beispiel von Russo et al. (2018) genutzt wurde (vgl. Abschnitt 2.2.3 Gentechnisch veränderte Mikroalgen). Die Genomsequenzierung ist jedoch relativ aufwendig und teuer und im Rahmen eines breit angelegten Monitorings von nGVO daher schwer umsetzbar. Eine Anbindung der o.g. neuartigen molekularbiologischen Nachweismethoden an etablierte Monitoringprogramme nach WRRRL ist möglich und wünschenswert, um den zusätzlichen logistischen und finanziellen Aufwand zu minimieren und die Vorteile der etablierten Monitoringprogramme nach WRRRL wie hohe Repräsentativität und Umweltrelevanz nutzen zu können.

Literaturverzeichnis

- Abourashed, A., Doornekamp, L., Escartin, S., Koenraad, C.J.M., Schrama, M., Wagener, M., Bartumeus, F., Van Gorp, E.C.M., 2021. The Potential Role of School Citizen Science Programs in Infectious Disease Surveillance: A Critical Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 7019. <https://doi.org/10.3390/ijerph18137019>
- Adams, G. (2020) 'A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR', *The Biochemist*, 42(3), pp. 48–53. Available at: <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>.
- Adetunji, C. O., Anani, O. A., Olaniyan, O. T., Bodunrinde, R. E., Osemwegie, O. O., Ubi, B. E. (2022): Sustainability of biofertilizers and other allied products from genetically modified microorganisms, in: *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Elsevier, pp. 363–393. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89855-3.00003-0>
- Adhane, G., Dehshibi, M.M., Masip, D., 2022. On the Use of Uncertainty in Classifying *Aedes Albopictus* Mosquitoes. *IEEE J. Sel. Top. Signal Process.* 16, 224–233. <https://doi.org/10.1109/JSTSP.2021.3122886>
- Adhane, G., Dehshibi, M.M., Masip, D., 2021. A Deep Convolutional Neural Network for Classification of *Aedes Albopictus* Mosquitoes. *IEEE Access* 9, 72681–72690. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2021.3079700>
- Adolfi, A., Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Lee, H.-F., Hwang, K., Terradas, G., Bulger, E. A., Ramaiah, A., Bennett, J. B., Emerson, J. J., Marshall, J. M., Bier, E., James, A. A. (2020): Efficient population modification gene-drive rescue system in the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature Communications* 11, 5553.
- Adolfi, A., Pondeville, E., Lynd, A., Bourgouin, C., Lycett, G. J. (2018): Multi-tissue GAL4-mediated gene expression in all *Anopheles gambiae* life stages using an endogenous polyubiquitin promoter. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 96, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.005>
- Afify, A., Betz, J. F., Riabinina, O., Lahondère, C., Potter, C. J. (2019): Commonly Used Insect Repellents Hide Human Odors from *Anopheles* Mosquitoes. *Curr. Biol.* 29, 3669–3680.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.007>
- Aguzzi, J., Chatzievangelou, D., Company, J.B., Thomsen, L., Marini, S., Bonofiglio, F., Juanes, F., Rountree, R., Berry, A., Chumbinho, R., Lordan, C., Doyle, J., Del Rio, J., Navarro, J., De Leo, F.C., Bahamon, N., García, J.A., Danovaro, P.R., Francescangeli, M., Lopez-Vazquez, V., Gaughan, P., 2020. The potential of video imagery from worldwide cabled observatory networks to provide information supporting fish-stock and biodiversity assessment. *ICES J. Mar. Sci.* 77, 2396–2410. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsaa169>
- Ahmed, M. et al. (2022) 'Rapid detection of kdr mutation F1534C in *Aedes aegypti* using recombinase polymerase amplification and lateral flow dipsticks', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 187, p. 105209. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105209>.
- Ahmed, M., Pollak, N. M., Devine, G. J., Macdonald, J. (2022): Detection of a single nucleotide polymorphism for insecticide resistance using recombinase polymerase amplification and lateral flow dipstick detection. *Sens. Actuators B Chem.* 367, 132085. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132085>
- Ajjawi, I., Verruto, J., Aqui, M., Soriaga, L. B., Coppersmith, J., Kwok, K., Peach, L., et al. (2017): Lipid Production in *Nannochloropsis Gaditana* Is Doubled by Decreasing Expression of a Single Transcriptional Regulator. *Nature Biotechnology* 35 (7), 647–52. <https://doi.org/10.1038/nbt.3865>.

- Akella, S., Ma, X., Bacova, R., Harmer, Z. P., Kolackova, M., Wen, X., Wright, D. A., Spalding, M. H., P Weeks, D. P., Cerutti, H. (2021): Co-Targeting Strategy for Precise, Scarless Gene Editing with CRISPR/Cas9 and Donor SsODNs in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology* 187 (4), 2637–55. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab418>.
- Albus, K., Thompson, R., Mitchell, F., 2019. Usability of Existing Volunteer Water Monitoring Data: What Can the Literature Tell Us? *Citiz. Sci. Theory Pract.* 4, 28. <https://doi.org/10.5334/cstp.222>
- Alfaro, T., Elmore, J. R., Stromberg, Z. R., Hutchison, J. R., Hess, B. M. (2022): Engineering *Citrobacter freundii* using CRISPR/Cas9 system. *J. Microbiol. Methods* 200, 106533. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106533>
- Almeida, F.L., Skaftnesmo K. O, Andersson E, Kleppe L, Edvardsen R. B, Norberg B, Fjellidal P. G, Hansen T. J, Schulz R. W, and Wargelius A. (2022), “The Piwi1 N domain is required for germ cell survival in Atlantic salmon”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 10, doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.977779>.
- Alshari, N.F.M.A.H. et al. (2021) ‘Metabarcoding of Fish Larvae in the Merbok River Reveals Species Diversity and Distribution Along its Mangrove Environment’, *Zoological Studies*, 60, p. e76. Available at: <https://doi.org/10.6620/ZS.2021.60-76>.
- Alves, I. R., Vêncio, R. Z., Galhardo, R. S. (2022): Whole genome analysis of UV-induced mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 825, 111787. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2022.111787>
- Angstenberger, M., de Signori, F., Vecchi, V., Dall’Osto, L., Bassi, R. (2020): Cell Synchronization Enhances Nuclear Transformation and Genome Editing via Cas9 Enabling Homologous Recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synthetic Biology* 9 (10), 2840–50. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00390>.
- Aparicio, T., Nyerges, A., Martínez-García, E., de Lorenzo, V. (2020): High-Efficiency Multi-site Genomic Editing of *Pseudomonas putida* through Thermoinducible ssDNA Recombineering. *iScience* 23, 100946. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100946>
- Araujo, M.D.S., Guo, F., Rosbash, M., 2020. Video Recording Can Conveniently Assay Mosquito Locomotor Activity. *Sci. Rep.* 10, 4994. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61733-5>
- Araújo, S., Sousa, M., Tacão, M., Baraúna, R.A., Silva, A., Ramos, R., Alves, A., Manaia, C. M., Henriques, I. (2021): Carbapenem-resistant bacteria over a wastewater treatment process: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in untreated wastewater and intrinsically-resistant bacteria in final effluent. *Sci. Total Environ.* 782, 146892. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146892>
- Arbeitskreis KLIWA (2023) Monitoring | KLIWA. Available at: <https://www.kliwa.de/gewaesseroekologie-monitoring.htm> (Accessed: 19 April 2023).
- Arnemann, J. (2019) ‘Multiplex-PCR’, in A.M. Gressner and T. Arndt (eds) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer Reference Medizin), pp. 1698–1698. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3537.
- Arnoldi, I., Mancini, G., Fumagalli, M., Gastaldi, D., D’Andrea, L., Bandi, C., Di Venere, M., Iadarola, P., Forneris, F., Gabrieli, P. (2022): A salivary factor binds a cuticular protein and modulates biting by inducing morphological changes in the mosquito labrum. *Curr. Biol.* 32, 3493-3504.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.06.049>
- Aryan, A., Myles, K. M., Adelman, Z. N. (2014): Targeted genome editing in *Aedes aegypti* using TALENs. *Methods* 69, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.008>

- Asadian, M., Saadati, M., Bagheri Bajestani, F., Beardall, J., Abdollahadi, F., Mahdinezhad, N. (2022): Knockout of Cia5 Gene Using CRISPR/Cas9 Technique in *Chlamydomonas reinhardtii* and Evaluating CO₂ Sequestration in Control and Mutant Isolates. *Journal of Genetics* 101 (1), 6. <https://doi.org/10.1007/s12041-021-01350-x>.
- Asgari, M., Sadeghzadeh, A., Islam, M.B., Rada, L., Bozeman, J., 2022. Deep Learning-based Vector Mosquitoes Classification for Preventing Infectious Diseases Transmission. *Image Anal. Stereol.* <https://doi.org/10.5566/ias.2804>
- Atkinson, S. et al. (2018) 'A quantitative PCR-based environmental DNA assay for detecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)', *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(5), pp. 1238–1243. Available at: <https://doi.org/10.1002/aqc.2931>.
- Au, S. (2020), Investigation of RNA Interference (RNAi)-Mediated Gene Silencing in Rainbow Trout, 1 January.
- Au, S.K.W., Portelli, I.V. and DeWitte-Orr, S.J. (2022), "Using long, sequence-specific dsRNA to knock-down inducible protein expression and virus production via an RNAi-like mechanism", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 131, pp. 945–957, doi: 10.1016/j.fsi.2022.10.061.
- Baalbaki, R., Ahmad, S.H., Kays, W., Talhouk, S.N., Saliba, N.A., Al-Hindi, M., 2019. Citizen science in Lebanon—a case study for groundwater quality monitoring. *R. Soc. Open Sci.* 6, 181871. <https://doi.org/10.1098/rsos.181871>
- Baek, K., Yu, J., Jeong, J., Jun Sim, S., Bae, S., Jin, E. (2018): Photoautotrophic Production of Macular Pigment in a *Chlamydomonas reinhardtii* Strain Generated by Using DNA-Free CRISPR-Cas9 RNP-Mediated Mutagenesis. *Biotechnology and Bioengineering* 115 (3): 719–28. <https://doi.org/10.1002/bit.26499>.
- Bakran-Lebl, K., Pree, S., Brenner, T., Daroglou, E., Eigner, B., Griesbacher, A., Gunczy, J., Hufnagl, P., Jäger, S., Jerrentrup, H., Klocker, L., Paill, W., Petermann, J.S., Barogh, B.S., Schwerte, T., Suchentrunk, C., Wieser, C., Wortha, L.N., Zechmeister, T., Zezula, D., Zimmermann, K., Zित्रa, C., Allerberger, F., Fuehrer, H.-P., 2022. First Nationwide Monitoring Program for the Detection of Potentially Invasive Mosquito Species in Austria. *Insects* 13, 276. <https://doi.org/10.3390/insects13030276>
- Ballesteros, I. et al. (2021) 'DNA barcoding approach to characterize microalgae isolated from freshwater systems in Ecuador', *Neotropical Biodiversity*, 7(1), pp. 170–183. Available at: <https://doi.org/10.1080/23766808.2021.1920296>.
- Baloch, A.R., Franěk, R., Tichopád, T., Fučíková, M., Rodina, M. and Pšenička, M. (2019), "Dnd1 Knock-out in Sturgeons By CRISPR/Cas9 Generates Germ Cell Free Host for Surrogate Production", *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, Vol. 9 No. 4, p. 174, doi: 10.3390/ani9040174.
- Bang, W.J., Won, M.H., et al. (2021) 'A multiplex PCR assay for six Aedini species, including *Aedes albopictus*', *Parasites & Vectors*, 14(1), p. 380. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04871-7>.
- Bang, W.J., Kim, H.C., et al. (2021) 'Multiplex PCR assay for the identification of eight Anopheles species belonging to the Hyrcanus, Barbirostris and Lindesayi groups', *Malaria Journal*, 20(1), p. 287. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03808-w>.
- Bär, J., Boumasmoud, M., Kouyos, R.D., Zinkernagel, A.S., Vulin, C., 2020. Efficient microbial colony growth dynamics quantification with ColTapp, an automated image analysis application. *Sci. Rep.* 10, 16084. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72979-4>
- Barrera-Illanes, A.N. et al. (2023) 'First report on knockdown resistance mutations in wild populations of *Aedes aegypti* from Argentina determined by a novel multiplex high-resolution melting polymerase chain reaction method', *Parasites & Vectors*, 16(1), p. 222. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05840-y>.

- Barsanti, L., Birindelli, L., Gualtieri, P., 2021. Water monitoring by means of digital microscopy identification and classification of microalgae. *Environ. Sci. Process. Impacts* 23, 1443–1457. <https://doi.org/10.1039/D1EM00258A>
- Basu, S., Rabara, R. C. Negi, S., Shukla, P. (2018): Engineering PGPMOs through Gene Editing and Systems Biology: A Solution for Phytoremediation? *Trends in Biotechnology* 36, 5. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.01.011>.
- Batra, A.R. et al. (2023) 'Development of A Rapid, Low-Cost Portable Detection Assay for Enterococci in Wastewater and Environmental Waters', *Microorganisms*, 11(2), p. 381. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020381>.
- Battaglia, M.J., Banks, S., Behnamian, A., Bourgeau-Chavez, L., Brisco, B., Corcoran, J., Chen, Z., Huberty, B., Klassen, J., Knight, J., Morin, P., Murnaghan, K., Pelletier, K., White, L., 2021. Multi-Source EO for Dynamic Wetland Mapping and Monitoring in the Great Lakes Basin. *Remote Sens.* 13, 599. <https://doi.org/10.3390/rs13040599>
- Baumeister, T.U.H. et al. (2020) 'Identification to species level of live single microalgal cells from plankton samples with matrix-free laser/desorption ionization mass spectrometry', *Metabolomics*, 16(3), p. 28. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11306-020-1646-7>.
- Bayerische Staatskanzlei (2022) Alarmpläne Gewässerökologie Bayern - Bürgerservice. Available at: https://www.gesetze-bayern.de/Content/Document/BayVV_7537_U_10497>true (Accessed: 19 April 2023).
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2021) DNA-Barcoding - LfU Bayern. Available at: https://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/innovative_analysen/dna_verfahren/dna_barcoding/index.htm (Accessed: 28 August 2023).
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2023a) 25 Jahre Versauerungsmonitoring - LfU Bayern. Available at: https://www.lfu.bayern.de/wasser/25_jahre_versauerungsmonitoring/index.htm (Accessed: 19 April 2023).
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2023b) DanubeSediment - LfU Bayern. Available at: https://www.lfu.bayern.de/wasser/projekte/danube_sediment/index.htm (Accessed: 19 April 2023).
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2023c) Eco-AlpsWater - LfU Bayern. Available at: https://www.lfu.bayern.de/wasser/projekte/eco_alpswater/index.htm (Accessed: 19 April 2023).
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2023d) Gewässerqualität der bayerischen Flüsse - warum wir untersuchen - LfU Bayern. Available at: https://www.lfu.bayern.de/wasser/gewaesserqualitaet_fluesse/index.htm (Accessed: 19 April 2023).
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2023e) Gewässerqualität Seen - LfU Bayern. Available at: https://www.lfu.bayern.de/wasser/gewaesserqualitaet_seen/index.htm (Accessed: 19 April 2023).
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2023f) Grundwasserqualität - LfU Bayern. Available at: https://www.lfu.bayern.de/wasser/gw_qualitaet/index.htm (Accessed: 19 April 2023).
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2023g) Überwachung von Abwasseranlagen und ihren Einleitungen in Gewässer - der bayerische Weg - LfU Bayern. Available at: https://www.lfu.bayern.de/wasser/ue_abwasser_bayweg/index.htm (Accessed: 19 April 2023).
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2023h) UN-ECE - Monitoringprogramm versauerte Gewässer - LfU Bayern. Available at: <https://www.lfu.bayern.de/wasser/unece/index.htm> (Accessed: 19 April 2023).

- Bayerisches Landesamt für Umwelt (2023i) Vergleich klassisches Bestimmungsverfahren vs. genetische Verfahren für die Bewertung von Makrozoobenthos - LfU Bayern. Available at: https://www.lfu.bayern.de/wasser/projekte/vergleich_klassisches_bestimmungsverfahren_genetische_verfahren/index.htm (Accessed: 19 April 2023).
- Beaghton, P. J., Burt, A. (2022): Gene drives and population persistence vs elimination: The impact of spatial structure and inbreeding at low density. *Theor. Popul. Biol.* 145, 109–125. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2022.02.002>
- Becherer, L. et al. (2020) 'Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection', *Analytical Methods*, 12(6), pp. 717–746. Available at: <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>.
- Behrens-Chapuis, S., Herder, F. and Geiger, M.F. (2021) 'Adding DNA barcoding to stream monitoring protocols – What's the additional value and congruence between morphological and molecular identification approaches?', *PLOS ONE*, 16(1), p. e0244598. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244598>.
- Bender, A.C. et al. (2020) 'High Resolution Melt Assays to Detect and Identify *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, and *Clostridioides difficile* Bacteria', *Microorganisms*, 8(4), p. 561. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040561>.
- Bilodeau, S.M., Schwartz, A.W.H., Xu, B., Paúl Pauca, V., Silman, M.R., 2022. A low-cost, long-term underwater camera trap network coupled with deep residual learning image analysis. *PLOS ONE* 17, e0263377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263377>
- Binding, C.E., Pizzolato, L., Zeng, C., 2021. EOLakeWatch; delivering a comprehensive suite of remote sensing algal bloom indices for enhanced monitoring of Canadian eutrophic lakes. *Ecol. Indic.* 121, 106999. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106999>
- biome-id, Dr.A.B. und Dr.T.K.G. (2023) DNA-Barcoding Service, biome-id. Available at: <https://www.biome-id.com/deutsch/molekulare-serviceleistungen/dna-barcoding/> (Accessed: 28 August 2023).
- Bisht, D., Dasauni, K., Nailwal, T. K. (2021): Neoteric strategies for vector control and identification of zoonotic reservoirs, in: *Pathogenesis, Treatment and Prevention of Leishmaniasis*. Elsevier, pp. 27–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822800-5.00007-X>
- Blackburn, N., Haecky, P., Jurgensone, I., Griniene, E., Brugel, S., Andersson, A., Carstensen, J., 2022. The use of an automated organism tracking microscope in mesocosm experiments. *Limnol. Oceanogr. Methods* 20, 768–780. <https://doi.org/10.1002/lom3.10521>
- Bliman, P.-A., Dumont, Y. (2022): Robust control strategy by the Sterile Insect Technique for reducing epidemiological risk in presence of vector migration. *Math. Biosci.* 350, 108856. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2022.108856>
- Bloch, S. E., Clark, R., Gottlieb, S. S., Wood, L. K., Shah, N., Mak, S.-M., Lorigan, J. G., Johnson, J., Davis-Richardson, A. G., Williams, L., McKellar, M., Soriano, D., Petersen, M., Horton, A., Smith, O., Wu, L., Tung, E., Broglie, R., Tamsir, A., Temme, K. (2020): Biological nitrogen fixation in maize: optimizing nitrogenase expression in a root-associated diazotroph. *Journal of Experimental Botany*, 71, 4591–4603. doi:10.1093/jxb/eraa176.
- Bölscher, Jens et al. (2017) 'Dynamik, Schadstoffbelastung und Ökotoxizität der Sedimente in der Rummelsburger Bucht – Berliner Spree: Endbericht des Forschungsprojektes RuBuS', p. 229 Seiten. Available at: https://doi.org/10.17169/FUDOCs_DOCUMENT_000000028375.
- Bottino-Rojas, V., Ferreira-Almeida, I., Nunes, R. D., Feng, X., Pham, T.B., Kelsey, A., Carballar-Lejarazú, R., Gantz, V., Oliveira, P. L., James, A. A. (2022): Beyond the eye: Kynurenine pathway impairment causes midgut homeostasis dysfunction and survival and reproductive costs in blood-feeding mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 142, 103720. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103720>

- Braddick, D., Ramarohetra, R. F. (2020): Emergent challenges for CRISPR: biosafety, biosecurity, patenting, and regulatory issues, in: *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System*. Elsevier, pp. 281–307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818140-9.00021-0>
- Bromham, L. (2016) *An Introduction to Molecular Evolution and Phylogenetics*. 2. Edition. Oxford University Press. Available at: <https://global.oup.com/academic/product/an-introduction-to-molecular-evolution-and-phylogenetics-9780198736363?cc=de&lang=en&#>.
- Brooks, S.J., Fitch, B., Davy-Bowker, J., Codesal, S.A., 2019. Anglers' Riverfly Monitoring Initiative (ARMI): A UK-wide citizen science project for water quality assessment. *Freshw. Sci.* 38, 270–280. <https://doi.org/10.1086/703397>
- Brozak, S. J., Mohammed-Awel, J., Gumel, A. B. (2022): Mathematics of a single-locus model for assessing the impacts of pyrethroid resistance and temperature on population abundance of malaria mosquitoes. *Infect. Dis. Model.* 7, 277–316. <https://doi.org/10.1016/j.idm.2022.05.007>
- Buckingham, S.D., Partridge, F.A., Poulton, B.C., Miller, B.S., McKendry, R.A., Lycett, G.J., Sattelle, D.B., 2021. Automated phenotyping of mosquito larvae enables high-throughput screening for novel larvicides and offers potential for smartphone-based detection of larval insecticide resistance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, e0008639. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008639>
- Bundesamt für Justiz (2024) Anlage 1 AbwV - Analyse- und Messverfahren. Available at: https://www.gesetze-im-internet.de/abwv/anlage_1.html (Accessed: 13 March 2024).
- Bundesamt für Naturschutz (2023) BfN Schriften 666 - DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung? | BfN. Available at: <https://www.bfn.de/publikationen/bfn-schriften/bfn-schriften-666-dna-basierte-biodiversitaetsanalysen-im-natur-und> (Accessed: 30 August 2023).
- Bundesamt für Umwelt (2020) Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen. Available at: <https://www.bafu.admin.ch/bafu/de/home/themen/thema-wasser/wasser--publikationen/publikationen-wasser/anwendung-von-edna-methoden.html> (Accessed: 28 August 2023).
- Bundesanstalt für Gewässerkunde (2018) Satellitendaten für das behördliche Gewässermonitoring von Chlorophyll und Trübung.
- Bundesanstalt für Gewässerkunde (2022) Messprogramm Extremereignisse. Available at: https://undine.bafg.de/elbe/extremereignisse/elbe_mp_extremereignisse.html (Accessed: 18 April 2023).
- Bundesministerium für Digitales und Verkehr (BMDV) and Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV) (2022) Blaues Band Deutschland - Das Bundesprogramm. Available at: https://www.blaues-band.bund.de/Projektseiten/Blaues_Band/DE/neu_01_Bundesprogramm/bundesprogramm_node.html (Accessed: 13 June 2023).
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (2014) Richtlinie 2014/80/EU zur Änderung von Anhang II der Richtlinie 2006/118/EG zum Schutz des Grundwassers vor Verschmutzung und Verschlechterung - BMUV-Gesetze und Verordnungen, bmuv.de. Available at: <https://www.bmuv.de/GE91> (Accessed: 19 April 2023).
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (2016) EU-Badegewässerrichtlinie, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz. Available at: <https://www.bmuv.de/themen/wasser-ressourcen-abfall/binngewaesser/badegewaesser/eu-badegewaesserrichtlinie> (Accessed: 19 April 2023).
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (2022) Flussgebietskommissionen, Grenzgewässerkommissionen und Flussgebietsgemeinschaften, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz. Available at: <https://www.bmuv.de/WS1329> (Accessed: 13 June 2023).

- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (2022) Natura 2000, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz. Available at: <https://www.bmu.de/themen/naturschutz-artenvielfalt/naturschutz-biologische-vielfalt/gebietsschutz-und-vernetzung/natura-2000> (Accessed: 19 April 2023).
- Bund-/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) (2023) Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser - LAWA. Available at: <https://www.lawa.de/Startseite-358.html> (Accessed: 13 June 2023).
- Bustin, S.A. et al. (2009) 'The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments', *Clinical Chemistry*, 55(4), pp. 611–622. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Cai, M.-Z., Chen, P.-T. (2021): Novel combined Cre-Cas system for improved chromosome editing in *Bacillus subtilis*. *J. Biosci. Bioeng.* 132, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.04.005>
- Calatrava, V., Tejada-Jimenez, M., Sanz-Luque, E., Fernandez, E., Galvan, A., Llamas, A., 2023. *Chlamydomonas reinhardtii*, a Reference Organism to Study Algal-Microbial Interactions. Why Can't They Be Friends (preprint). LIFE SCIENCES. <https://doi.org/10.20944/preprints202301.0223.v1>
- Capoccioni, F., Leone, C., Pulcini, D., Cecchetti, M., Rossi, A., Ciccotti, E., 2019. Fish movements and schooling behavior across the tidal channel in a Mediterranean coastal lagoon: An automated approach using acoustic imaging. *Fish. Res.* 219, 105318. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2019.105318>
- Caputo, B., Manica, M., Filipponi, F., Blangiardo, M., Cobre, P., Delucchi, L., De Marco, C.M., Iesu, L., Morano, P., Petrella, V., Salvemini, M., Bianchi, C., Della Torre, A., 2020. ZanzaMapp: A Scalable Citizen Science Tool to Monitor Perception of Mosquito Abundance and Nuisance in Italy and Beyond. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 17, 7872. <https://doi.org/10.3390/ijerph17217872>
- Caputo, B., Tondossoma, N., Virgillito, C., Pichler, V., Serini, P., Calzetta, M., Manica, M., Coulibaly, Z.I., Dia, I., Akre, M., Offianan, A., della Torre, A. (2022): Is Côte D'Ivoire a new high hybridization zone for the two major malaria vectors, *Anopheles coluzzii* and *An. gambiae* (Diptera, Culicidae)? *Infect. Genet. Evol.* 98, 105215. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105215>
- Caragata, E. P., Dutra, H. L. C., Sucupira, P. H. F., Ferreira, A. G. A., Moreira, L. A. (2021): *Wolbachia* as translational science: controlling mosquito-borne pathogens. *Trends Parasitol.* 37, 1050–1067. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.06.007>
- Carballar-Lejarazú, R. et al. (2020) 'Digital droplet PCR and IDAA for the detection of CRISPR indel edits in the malaria species *Anopheles stephensi*', *BioTechniques*, 68(4), pp. 172–179. Available at: <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0103>.
- Carballar-Lejarazú, R. et al. (2021) 'Digital-Droplet PCR to Detect Indels Mutations in Genetically Modified Anopheline Mosquito Populations', *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (172), p. e62607. Available at: <https://doi.org/10.3791/62607>.
- Carney, R., Mapes, C., Low, R., Long, A., Bowser, A., Durieux, D., Rivera, K., Dekramanjan, B., Bartumeus, F., Guerrero, D., Seltzer, C., Azam, F., Chellappan, S., Palmer, J., 2022. Integrating Global Citizen Science Platforms to Enable Next-Generation Surveillance of Invasive and Vector Mosquitoes. *Insects* 13, 675. <https://doi.org/10.3390/insects13080675>
- Carrasco-Escobar, G., Moreno, M., Fornace, K., Herrera-Varela, M., Manrique, E., Conn, J.E., 2022. The use of drones for mosquito surveillance and control. *Parasit. Vectors* 15, 473. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05580-5>
- Cazzaniga, S., Kim, M., Bellamoli, F., Jeong, J., k Lee, S., Perozeni, F., Pompa, A., Jin, E., Ballottari, M. (2020): Photosystem II Antenna Complexes CP26 and CP29 Are Essential for Nonphotochemical Quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant, Cell & Environment* 43 (2), 496–509. <https://doi.org/10.1111/pce.13680>.

- Chae, K., Valentin, C., Dawson, C., Jakes, E., Myles, K. M., Adelman, Z. N. (2021): A knockout screen of genes expressed specifically in *Ae. aegypti* pupae reveals a critical role for stretchin in mosquito flight. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 132, 103565. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103565>
- Champer, S.E., Kim, I.K., Clark, A.G., Messer, P.W., Champer, J., 2022. Anopheles homing suppression drive candidates exhibit unexpected performance differences in simulations with spatial structure. *eLife* 11, e79121. <https://doi.org/10.7554/eLife.7912>
- Chang, K., Han, K., Qiu, W., Hu, Z., Chen, X., Chen, X., Xie, X., et al. (2021), “Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) interferon regulatory factor 8 down-regulates interferon1 expression via interaction with interferon regulatory factor 2 in vitro”, *Molecular Immunology*, Vol. 137, pp. 202–211, doi: 10.1016/j.molimm.2021.04.020.
- Chang, K. S., Kim, J., Park, H., Hong, S.-J., Lee, C.-G., Jin E. (2020): Enhanced Lipid Productivity in AGP Knockout Marine Microalga *Tetraselmis Sp.* Using a DNA-Free CRISPR-Cas9 RNP Method. *Biore-source Technology* 303, 122932. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122932>.
- Charoonnart, P., Purton, S., Saksmerprom, V. (2018): Applications of Microalgal Biotechnology for Disease Control in Aquaculture. *Biology* 7 (2), 24. <https://doi.org/10.3390/biology7020024>.
- Chebud, Y., Naja, G.M., Rivero, R.G., Melesse, A.M., 2012. Water Quality Monitoring Using Remote Sensing and an Artificial Neural Network. *Water. Air. Soil Pollut.* 223, 4875–4887. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1243-0>
- Chen, Y.-X., Pan, C.-Y., Chen, B.-Y., Jeng, S.-W., Chen, C.-H., Huang, J.-J., Chen, C.-D., Liu, W.-L., 2023. Use of unmanned ground vehicle systems in urbanized zones: A study of vector Mosquito surveillance in Kaohsiung. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 17, e0011346. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011346>
- Chen, J., Wang, W., Tian, Z., Dong, Y., Dong, T., Zhu, H., Zhu, Z., et al. (2018a), “Efficient Gene Transfer and Gene Editing in Sterlet (*Acipenser ruthenus*)”, *Frontiers in Genetics*, Vol. 9, doi: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00117>.
- Chen, P., Karna, S. L. R., Leung, K. P. (2018b): Creation of deletion and insertion clonal complex 8 *Staphylococcus aureus* mutants using a common cloning vector. *J. Microbiol. Methods* 149, 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.05.008>
- Chen, T.-H., Wu, Y.-J., Hou, J.-N., Chiang, Y.-H., Cheng, C.-C., Sifiyatun, E., Chiu, C.-H., Wang, L.-C., Chen, W.-J. (2018c): A novel p53 paralogue mediates antioxidant defense of mosquito cells to survive dengue virus replication. *Virology* 519, 156–169. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.04.011>
- Chen, W., Zhang, Y., Zhang, Y., Pi, Y., Gu, T., Song, L., Wang, Y., Ji, Q. (2018d): CRISPR/Cas9-based Genome Editing in *Pseudomonas aeruginosa* and Cytidine Deaminase-Mediated Base Editing in *Pseudomonas* Species. *iScience* 6, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.024>
- Chen, X., Han, K., Zhang, T., Qi, G., Jiang, Z. and Hu, C. (2020), “Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) NRF2 alleviates the oxidative stress and enhances cell viability through upregulating the expression of HO-1”, *Fish Physiology and Biochemistry*, Vol. 46 No. 1, pp. 417–428, doi: 10.1007/s10695-019-00729-z.
- Chen, Z., Sun, J., Guan, Y., Li, M., Lou, C., Wu, B. (2021): Engineered DNase-inactive Cpf1 variants to improve targeting scope for base editing in *E. coli*. *Synth. Syst. Biotechnol.* 6, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.09.002>
- Chen, Z., Zhang, J., Lyu, Q., Wang, H., Ji, X., Yan, Z., Chen, F., Dahlgren, R.A., Zhang, M. (2022): Modular configurations of living biomaterials incorporating nano-based artificial mediators and synthetic biology to improve bioelectrocatalytic performance: A review. *Sci. Total Environ.* 824, 153857. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153857>

- Chong, J. W. R., Khoo, K. S., Yew, G. Y., Leong, W. H., Lim, J. W., Lam, M. K., Ho, Y.-C., Ng, H. S., Munawaroh, H. S. H., Show, P. L. (2021): Advances in production of bioplastics by microalgae using food waste hydrolysate and wastewater: A review. *Bioresour. Technol.* 342, 125947. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125947>
- Chonova, T. et al. (2019) 'Benthic Diatom Communities in an Alpine River Impacted by Waste Water Treatment Effluents as Revealed Using DNA Metabarcoding', *Frontiers in Microbiology*, 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00653> (Accessed: 18 July 2023).
- Chu, P., He, L., Li, Y., Huang, R., Liao, L., Li, Y., Zhu, Z., et al. (2018), "Molecular cloning and functional characterisation of NLRX1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 81, pp. 276–283, doi: 10.1016/j.fsi.2018.07.031.
- Chu, P., He, L., Zhu, D., Chen, L., Huang, R., Liao, L., Li, Y., et al. (2019), "Identification, characterisation and preliminary functional analysis of IRAK-M in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 84, pp. 312–321, doi: 10.1016/j.fsi.2018.09.080.
- Cisar, P., Bekkozhayeva, D., Movchan, O., Saberioon, M., Schraml, R., 2021. Computer vision based individual fish identification using skin dot pattern. *Sci. Rep.* 11, 16904. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96476-4>
- Cleveland, B.M., Habara, S., Oikawa, J., Radler, L.M. and Shimizu, M. (2020), "Compensatory Response of the Somatotrophic Axis from IGFBP-2b Gene Editing in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Genes*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 11 No. 12, p. 1488, doi: 10.3390/genes11121488.
- Cleveland, B.M., Yamaguchi, G., Radler, L.M. and Shimizu, M. (2018), "Editing the duplicated insulin-like growth factor binding protein-2b gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Scientific Reports*, Vol. 8, p. 16054, doi: 10.1038/s41598-018-34326-6.
- Coffer, M.M., Schaeffer, B.A., Darling, J.A., Urquhart, E.A., Salls, W.B., 2020. Quantifying national and regional cyanobacterial occurrence in US lakes using satellite remote sensing. *Ecol. Indic.* 111, 105976. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105976>
- Connolly, R.M., Fairclough, D.V., Jinks, E.L., Ditria, E.M., Jackson, G., Lopez-Marcano, S., Olds, A.D., Jinks, K.I., 2021. Improved Accuracy for Automated Counting of a Fish in Baited Underwater Videos for Stock Assessment. *Front. Mar. Sci.* 8, 658135. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.658135>
- Connolly, J.B., Mumford, J.D., Fuchs, S., Turner, G., Beech, C., North, A.R., Burt, A., 2021. Systematic identification of plausible pathways to potential harm via problem formulation for investigational releases of a population suppression gene drive to control the human malaria vector *Anopheles gambiae* in West Africa. *Malar. J.* 20, 170. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03674-6>
- Craig, A.T., Kama, N., Fafale, G., Bugoro, H., 2021. Citizen science as a tool for arboviral vector surveillance in a resourced-constrained setting: results of a pilot study in Honiara, Solomon Islands, 2019. *BMC Public Health* 21, 509. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10493-6>
- Crain, C. et al. (2021) 'Application of ddPCR for detection of *Enterococcus* spp. in coastal water quality monitoring', *Journal of Microbiological Methods*, 184, p. 106206. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106206>.
- Daneshvar, E., Ok, Y. S., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S. M., Hong, H., Luo, Y., Rinklebe, J., Song, H., Bhatnagar, A. (2021): Insights into Upstream Processing of Microalgae: A Review. *Bioresource Technology* 329 (June), 124870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>.
- Dang, Y., Meng, X., Wang, S., Li, L., Zhang, M., Hu, M., Xu, X., et al. (2018a), "Mannose-binding lectin and its roles in immune responses in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) against *Aeromonas hydrophila*", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 72, pp. 367–376, doi: 10.1016/j.fsi.2017.11.013.

- Dang, Y., Shen, Y., Xu, X., Wang, S., Meng, X., Zhang, M., Lv, L., et al. (2018b), "Complement component Bf/C2b gene mediates immune responses against *Aeromonas hydrophila* in grass carp *Ctenopharyngodon idella*", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 74, pp. 509–516, doi: 10.1016/j.fsi.2018.01.030.
- Dang, Y.-F., Shen, Y.-B., Xu, X.-Y., Wang, S.-T., Meng, X.-Z., Li, L.-S., Zhang, M., et al. (2017), "Mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) mediates immune responses against *Aeromonas hydrophila* in vitro and in vivo in grass carp", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 66, pp. 93–102, doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.020.
- Danza, F. et al. (2018) 'Bacterial diversity in the water column of meromictic Lake Cadagno and evidence for seasonal dynamics', *PLOS ONE*, 13(12), p. e0209743. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209743>.
- Daszczuk, A., Dessalegne, Y., Drenth, I., Hendriks, E., Jo, E., van Lente, T., Oldebesten, A., Parrish, J., Poljakova, W., Purwanto, A. A., van Raaphorst, R., Boonstra, M., van Heel, A., Herber, M., van der Meulen, S., Siebring, J., Sorg, R. A., Heinemann, M., Kuipers, O. P., Veening, J.-W. (2014): *Bacillus subtilis* Biosensor Engineered To Assess Meat Spoilage. *ACS Synth. Biol.* 3, 999–1002. <https://doi.org/10.1021/sb5000252>
- Datsomor, A.K., Gillard, G., Jin, Y., Olsen, R.E. and Sandve, S.R. (2022), "Molecular Regulation of Biosynthesis of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Atlantic Salmon", *Marine Biotechnology*, Vol. 24 No. 4, pp. 661–670, doi: 10.1007/s10126-022-10144-w.
- Datsomor, A.K., Olsen, R.E., Zic, N., Madaro, A., Bones, A.M., Edvardsen, R.B., Wargelius, A., et al. (2019a), "CRISPR/Cas9-mediated editing of $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases impairs $\Delta 8$ -desaturation and docosahexaenoic acid synthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)", *Scientific Reports*, Vol. 9 No. 1, p. 16888, doi: 10.1038/s41598-019-53316-w.
- Datsomor, A.K., Zic, N., Li, K., Olsen, R.E., Jin, Y., Vik, J.O., Edvardsen, R.B., et al. (2019b), "CRISPR/Cas9-mediated ablation of *elovl2* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) inhibits elongation of polyunsaturated fatty acids and induces *Srebp-1* and target genes", *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, Vol. 9 No. 1, p. 7533, doi: 10.1038/s41598-019-43862-8.
- de Deckere, E. et al. (2011) 'Development of sediment quality guidelines for freshwater ecosystems', *Journal of Soils and Sediments*, 11(3), pp. 504–517. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0328-x>.
- Deliveyne, N. et al. (2023) 'Shining a LAMP on the applications of isothermal amplification for monitoring environmental biosecurity', *NeoBiota*, 82, pp. 119–144. Available at: <https://doi.org/10.3897/neobiota.82.97998>.
- Deng, C., Lv, X., Li, J., Liu, Y., Du, G., Liu, L. (2020): Development of a DNA double-strand break-free base editing tool in *Corynebacterium glutamicum* for genome editing and metabolic engineering. *Metab. Eng. Commun.* 11, e00135. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00135>
- Deng, H., Cummins, R., Schares, G., Trevisan, C., Enemark, H., Waap, H., Sribljanovic, J., Djurkovic-Djakovic, O., Pires, S. M., van der Giessen, J. W. B., Opsteegh, M. (2021): Mathematical modelling of *Toxoplasma gondii* transmission: A systematic review. *Food Waterborne Parasitol.* 22, e00102. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00102>
- Dhokane, D., Bhadra, B., Dasgupta, S. (2020): CRISPR Based Targeted Genome Editing of *Chlamydomonas reinhardtii* Using Programmed Cas9-GRNA Ribonukleoprotein. *Molecular Biology Reports* 47 (11), 8747–55. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05922-5>.
- DiBattista, J.D., West, K.M., Hay, A.C., Hughes, J.M., Fowler, A.M., McGrouther, M.A., 2021. Community-based citizen science projects can support the distributional monitoring of fishes. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 31, 3580–3593. <https://doi.org/10.1002/aqc.3726>

- Die Senatorin für Klimaschutz, Umwelt, Mobilität, Stadtentwicklung und Wohnungsbau (2022a) Baden in Bremen - Die Senatorin für Klimaschutz, Umwelt, Mobilität, Stadtentwicklung und Wohnungsbau. Available at: <https://www.bauumwelt.bremen.de/umwelt/wasser/baden-in-bremen-23513> (Accessed: 17 April 2023).
- Die Senatorin für Klimaschutz, Umwelt, Mobilität, Stadtentwicklung und Wohnungsbau (2022b) Grundwasser, Trinkwasserversorgung, Wasserschutzgebiete - Die Senatorin für Klimaschutz, Umwelt, Mobilität, Stadtentwicklung und Wohnungsbau. Available at: <https://www.bauumwelt.bremen.de/umwelt/wasser/grundwasser-trinkwasserversorgung-wasserschutzgebiete-31312> (Accessed: 17 April 2023).
- Dindhoria, K., Kumar, S., Baliyan, N., Raphel, S., Halami, P. M., Kumar, R. (2022): *Bacillus licheniformis* MCC 2514 genome sequencing and functional annotation for providing genetic evidence for probiotic gut adhesion properties and its applicability as a bio-preservative agent. *Gene* 840, 146744. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146744>
- Ditria, E., Sievers, M., Lopez-Marcano, S., Jinks, E.L., Connolly, R.M., 2020. Deep learning for automated analysis of fish abundance: the benefits of training across multiple habitats (preprint). *Ecology*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.105056>
- Ditria, E.M., Connolly, R.M., Jinks, E.L., Lopez-Marcano, S., 2021. Annotated Video Footage for Automated Identification and Counting of Fish in Unconstrained Seagrass Habitats. *Front. Mar. Sci.* 8, 629485. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.629485>
- Diviacco, P., Nadali, A., Iurcev, M., Carbajales, R., Busato, A., Pavan, A., Burca, M., Grieco, L., Nolic, M., Molinaro, A., Malfatti, F., 2021. MaDCrow, a Citizen Science Infrastructure to Monitor Water Quality in the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Front. Mar. Sci.* 8, 619898. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.619898>
- Dolezel, M., Lang, A., Greiter, A., Miklau, M., Eckerstorfer, M., Heissenberger, A., Willée, E., Züghart, W., 2024. Challenges for the Post-Market Environmental Monitoring in the European Union Imposed by Novel Applications of Genetically Modified and Genome-Edited Organisms. *BioTech* 13, 14. <https://doi.org/10.3390/biotech13020014>
- Dönmez, S.İ., Needs, S.H., Osborn, H.M.I., Edwards, A.D., 2020. Label-free smartphone quantitation of bacteria by darkfield imaging of light scattering in fluoropolymer micro capillary film allows portable detection of bacteriophage lysis. *Sens. Actuators B Chem.* 323, 128645. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128645>
- Dörge, D.D. et al. (2020) 'An investigation of hibernating members from the *Culex pipiens* complex (Diptera, Culicidae) in subterranean habitats of central Germany', *Scientific Reports*, 10(1), p. 10276. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67422-7>.
- Dunker, S., 2019. Hidden Secrets Behind Dots: Improved Phytoplankton Taxonomic Resolution Using High-Throughput Imaging Flow Cytometry. *Cytometry A* 95, 854–868. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23870>
- Durant, A. C., Grieco Guardian, E., Kolosov, D., Donini, A. (2021): The transcriptome of anal papillae of *Aedes aegypti* reveals their importance in xenobiotic detoxification and adds significant knowledge on ion, water and ammonia transport mechanisms. *J. Insect Physiol.* 132, 104269. <https://doi.org/10.1016/j.jinphys.2021.104269>
- Dutcher, S. (2022), *The Chlamydomonas Sourcebook - 3rd Edition*, 3rd ed., Vols. 1-3, Academic Press.
- Duvall, L. B., Ramos-Espiritu, L., Barsoum, K.E., Glickman, J. F., Voss, L. B. (2019): Small-Molecule Agonists of *Ae. aegypti* Neuropeptide Y Receptor Block Mosquito Biting. *Cell* 176, 687-701.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.004>

- Dyomin, V., Davydova, A., Kirillov, N., Morgalev, S., Naumova, E., Olshukov, A., Polovtsev, I., 2022. In Situ Measurements of Plankton Biorhythms Using Submersible Holographic Camera. *Sensors* 22, 6674. <https://doi.org/10.3390/s22176674>
- Dyomin, V., Davydova, A., Morgalev, S., Kirillov, N., Olshukov, A., Polovtsev, I., Davydov, S., 2020. Monitoring of Plankton Spatial and Temporal Characteristics With the Use of a Submersible Digital Holographic Camera. *Front. Mar. Sci.* 7, 653. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00653>
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R., 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 16, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
- Ecologic Institut gemeinnützige GmbH (2022) Mikroplastik in Binnengewässern Süd- und Westdeutschlands | Plastik in der Umwelt. Available at: <https://bmbf-plastik.de/de/publikation/mikroplastik-binnengewassern-sued-und-westdeutschlands> (Accessed: 17 April 2023).
- Edgington, M. P., Alphey, L. S. (2019): Modeling the mutation and reversal of engineered underdominance gene drives. *J. Theor. Biol.* 479, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.06.024>
- Elías-Gutiérrez, M. et al. (2021) ‘Aquatic Organisms Research with DNA Barcodes’, *Diversity*, 13(7), p. 306. Available at: <https://doi.org/10.3390/d13070306>.
- Ellis, D.A., Avraam, G., Hoermann, A., Wyer, C.A.S., Ong, Y.X., Christophides, G.K., Windbichler, N., 2022. Testing non-autonomous antimalarial gene drive effectors using self-eliminating drivers in the African mosquito vector *Anopheles gambiae*. *PLOS Genet.* 18, e1010244. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010244>
- Elston, K. M., Leonard, S. P., Geng, P., Bialik, S. B., Robinson, E., Barrick, J. E. (2022): Engineering insects from the endosymbiont out. *Trends Microbiol.* 30, 79–96. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.004>
- Engels, A. et al. (2020) ‘Masterplan Ems 2050 Technischer Test im Sommer 2020 Ergebnisse des Monitorings’.
- Eritja, R., Delacour-Estrella, S., Ruiz-Arrondo, I., González, M.A., Barceló, C., García-Pérez, A.L., Lucientes, J., Miranda, M.Á., Bartumeus, F., 2021. At the tip of an iceberg: citizen science and active surveillance collaborating to broaden the known distribution of *Aedes japonicus* in Spain. *Parasit. Vectors* 14, 375. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04874-4>
- Eritja, R., Ruiz-Arrondo, I., Delacour-Estrella, S., Schaffner, F., Álvarez-Chachero, J., Bengoa, M., Puig, M.Á., Melero-Alcíbar, R., Oltra, A., Bartumeus, F., 2019. First detection of *Aedes japonicus* in Spain: an unexpected finding triggered by citizen science. *Parasit. Vectors* 12, 53. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3317-y>
- Europäische Union (2022) Neue EU-Vorschriften für die Behandlung von kommunalem Abwasser, European Commission - European Commission. Available at: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/de/qanda_22_6281 (Accessed: 19 April 2023).
- European Union (2000) Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik, OJ L. Available at: <http://data.europa.eu/eli/dir/2000/60/oj/deu> (Accessed: 19 April 2023).
- Fajardo, C., De Donato, M., Carrasco, R., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M., Fernández-Acero, F. J. (2020): Advances and Challenges in Genetic Engineering of Microalgae. *Reviews in Aquaculture* 12 (1), 365–81. <https://doi.org/10.1111/raq.12322>.
- Fan, C., Su, H., Liao, Z., Su, J., Yang, C., Zhang, Y. and Su, J. (2021), “Teleost-Specific MxG, a Traitor in the Mx Family, Negatively Regulates Antiviral Responses by Targeting IPS-1 for Proteasomal Degradation and STING for Lysosomal Degradation”, *The Journal of Immunology*, Vol. 207 No. 1, pp. 281–295, doi: 10.4049/jimmunol.2000555.

- Fan, X., Zhang, Y., Zhao, F., Liu, Y., Zhao, Y., Wang, S., Liu, R., Yang, C. (2020): Genome reduction enhances production of polyhydroxyalkanoate and alginate oligosaccharide in *Pseudomonas mendocina*. *Int. J. Biol. Macromol.* 163, 2023–2031. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.067>
- Fang, Y., Xu, X., Shen, Y. and Li, J. (2018), “Molecular cloning and functional analysis of Growth arrest and DNA damage-inducible 45 aa and ab (Gadd45aa and Gadd45 ab) in *Ctenopharyngodon idella*”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 77, pp. 187–193, doi: 10.1016/j.fsi.2018.03.051.
- Fang, Y., Xu, X.-Y., Zhang, M., Bai, Y., Zhang, X., Shen, Y. and Li, J. (2019), “Cloning, functional analysis, and microRNA-induced negative regulation of growth arrest and DNA damage-inducible 45 γ (Gadd45g) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)”, *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 99, p. 103400, doi: 10.1016/j.dci.2019.103400.
- Faraji, A., Haas-Stapleton, E., Sorensen, B., Scholl, M., Goodman, G., Buettner, J., Schon, S., Lefkow, N., Lewis, C., Fritz, B., Hoffman, C., Williams, G., 2021. Toys or Tools? Utilization of Unmanned Aerial Systems in Mosquito and Vector Control Programs. *J. Econ. Entomol.* 114, 1896–1909. <https://doi.org/10.1093/jee/toab107>
- Fawley, M.W. and Fawley, K.P. (2020) ‘Identification of eukaryotic microalgal strains’, *Journal of Applied Phycology*, 32(5), pp. 2699–2709. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02190-5>.
- Fei, X., Zhang, Y., Ding, L., Xiao, S., Xie, X., Li, Y., Deng, X. (2021): Development of an RNAi-Based Microalgal Larvicide for the Control of *Aedes Aegypti*. *Parasites & Vectors* 14 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04885-1>.
- Fernandez-Figueroa, E.G., Wilson, A.E., Rogers, S.R., 2022. Commercially available unoccupied aerial systems for monitoring harmful algal blooms: A comparative study. *Limnol. Oceanogr. Methods* 20, 146–158. <https://doi.org/10.1002/lom3.10477>
- Ferenczi, A., Chew, Y. P., Kroll, E., von Koppenfels, C., Hudson, A., Molnar, A. (2021): Mechanistic and Genetic Basis of Single-Strand Templated Repair at Cas12a-Induced DNA Breaks in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Communications* 12 (1), 6751. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27004-1>.
- Ferenczi, A., Pyott, D. E., Xipnitou, A., Molnar, A. (2017): Efficient Targeted DNA Editing and Replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* Using Cpf1 Ribonukleoproteins and Single-Stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (51), 13567–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710597114>.
- Flamarique, I.N., Fujihara, R., Yazawa, R., Bolstad, K., Gowen, B. and Yoshizaki, G. (2021), “Disrupted eye and head development in rainbow trout with reduced ultraviolet (sws1) opsin expression”, *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 529 No. 11, pp. 3013–3031, doi: 10.1002/cne.25144.
- Forschungsinstitut für Wasserwirtschaft und Klimazukunft an der RWTH Aachen e. V. (2019) RiverView - Gewässerzustandsbezogenes Monitoring und Management. Available at: <https://www.fiw.rwth-aachen.de/referenzen/riverviewr> (Accessed: 19 April 2023).
- Fraija-Fernández, N. et al. (2020) ‘Marine water environmental DNA metabarcoding provides a comprehensive fish diversity assessment and reveals spatial patterns in a large oceanic area’, *Ecology and Evolution*, 10(14), pp. 7560–7584. Available at: <https://doi.org/10.1002/ece3.6482>.
- Freitag, S., Baumgartner, B., Radel, S., Schwaighofer, A., Varriale, A., Pennacchio, A., D’Auria, S., Lendl, B., 2021. A thermoelectrically stabilized aluminium acoustic trap combined with attenuated total reflection infrared spectroscopy for detection of *Escherichia coli* in water. *Lab. Chip* 21, 1811–1819. <https://doi.org/10.1039/D0LC01264E>
- Freitas, J. et al. (2022) ‘Bacterial diversity analysis of coastal superficial seawaters near aquaculture facilities, using MALDI-TOF approach and Ribopeaks database’, *Aquaculture*, 556, p. 738263. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738263>.

- French, K. E., Zhou, Z., Terry, N. (2020): Horizontal 'gene drives' harness indigenous bacteria for bioremediation. *Scientific Reports* 10, 15091. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72138-9>.
- Freudenberg, R. A., Wittemeier, L., Einhaus, A., Baier, T., Kruse, O. (2022): The Spermidine Synthase Gene SPD1: A Novel Auxotrophic Marker for *Chlamydomonas reinhardtii* Designed by Enhanced CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Cells* 11 (5), 837. <https://doi.org/10.3390/cells11050837>.
- Frigerio, J. et al. (2023) 'A Fast and Simple DNA Mini-barcoding and RPA Assay Coupled with Lateral Flow Assay for Fresh and Canned Mackerel Authentication', *Food Analytical Methods*, 16(2), pp. 426–435. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02429-6>.
- Fritts, A.K. et al. (2019) 'Development of a quantitative PCR method for screening ichthyoplankton samples for bigheaded carps', *Biological Invasions*, 21(4), pp. 1143–1153. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1887-9>.
- Fu, W., Nelson, D. R., Mystikou, A., Daakour, S., Salehi-Ashtiani, K. (2019): Advances in Microalgal Research and Engineering Development. *Current Opinion in Biotechnology, Tissue, Cell and Pathway Engineering*, 59 (October), 157–64. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.05.013>.
- Fujihara, R., Katayama, N., Sadaie, S., Miwa, M., Sanchez Matias, G.A., Ichida, K., Fujii, W., et al. (2022), "Production of Germ Cell-Less Rainbow Trout by dead end Gene Knockout and their Use as Recipients for Germ Cell Transplantation", *Marine Biotechnology*, Vol. 24 No. 2, pp. 417–429, doi: 10.1007/s10126-022-10128-w.
- Fujiyoshi, S. et al. (2021) 'Suitcase Lab: new, portable, and deployable equipment for rapid detection of specific harmful algae in Chilean coastal waters', *Environmental Science and Pollution Research*, 28(11), pp. 14144–14155. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11567-5>.
- Gan, R.-H., Wang, Y., Li, Z., Yu, Z.-X., Li, X.-Y., Tong, J.-F., Wang, Z.-W., et al. (2021), "Functional Divergence of Multiple Duplicated Foxl2 Homeologs and Alleles in a Recurrent Polyploid Fish", *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 38 No. 5, pp. 1995–2013, doi: 10.1093/molbev/msab002.
- Gantz, V. M., Akbari, O. S. (2018): Gene editing technologies and applications for insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* 28, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.05.006>
- Gayathiri, E., Prakash, P., Karmegam, N., Varjani, S., Awasthi, M.K., Ravindran, B., 2022. Biosurfactants: Potential and Eco-Friendly Material for Sustainable Agriculture and Environmental Safety—A Review. *Agronomy* 12, 662. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030662>
- Gee, C. W., Niyogi, K. K. (2017): The Carbonic Anhydrase CAH1 Is an Essential Component of the Carbon-Concentrating Mechanism in *Nannochloropsis Oceanica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (17), 4537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700139114>.
- George, G., Menon, N.N., Abdulaziz, A., Brewin, R.J.W., Pranav, P., Gopalakrishnan, A., Mini, K.G., Kuriakose, S., Sathyendranath, S., Platt, T., 2021. Citizen Scientists Contribute to Real-Time Monitoring of Lake Water Quality Using 3D Printed Mini Secchi Disks. *Front. Water* 3, 662142. <https://doi.org/10.3389/frwa.2021.662142>
- Giardino, C., Bresciani, M., Stroppiana, D., Oggioni, A., Morabito, G., 2013. Optical remote sensing of lakes: an overview on Lake Maggiore. *J. Limnol.* 73. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.817>
- Giardino, C., Bresciani, M., Villa, P., Martinelli, A., 2010. Application of Remote Sensing in Water Resource Management: The Case Study of Lake Trasimeno, Italy. *Water Resour. Manag.* 24, 3885–3899. <https://doi.org/10.1007/s11269-010-9639-3>
- Gillies, M. T., De Meillon, B. (1968): The Anophelinae of Africa, south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Publications of the South African Institute for Medical Research* 54, 1–343.
- Ginés, I. et al. (2021) 'Nucleic acid lateral flow dipstick assay for the duplex detection of *Gambierdiscus australes* and *Gambierdiscus excentricus*', *Harmful Algae*, 110, p. 102135. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102135>.

- Gong, S. et al. (2018) 'Advances in DNA Barcoding of Toxic Marine Organisms', International Journal of Molecular Sciences, 19(10), p. 2931. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19102931>.
- Goutte, A. et al. (2020) 'Monitoring freshwater fish communities in large rivers using environmental DNA metabarcoding and a long-term electrofishing survey', Journal of Fish Biology, 97(2), pp. 444–452. Available at: <https://doi.org/10.1111/jfb.14383>.
- Gratacap, R.L., Jin, Y.H., Mantsopoulou, M. and Houston, R.D. (2020), "Efficient Genome Editing in Multiple Salmonid Cell Lines Using Ribonucleoprotein Complexes", Marine Biotechnology, Vol. 22 No. 5, pp. 717–724, doi: 10.1007/s10126-020-09995-y.
- Greiner, A., Kelterborn, S., Evers, H., Kreimer, G., Sizova, I., Hegemann, P. (2017): Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. The Plant Cell 29 (10), 2498–2518. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00659>.
- Gudmunds, E., Wheat, C. W., Khila, A., Husby, A. (2022): Functional genomic tools for emerging model species. Trends Ecol. Evol. S0169534722001689. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.07.004>
- Gundelund, C., Arlinghaus, R., Baktoft, H., Hyder, K., Venturelli, P., Skov, C., 2020. Insights into the users of a citizen science platform for collecting recreational fisheries data. Fish. Res. 229, 105597. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2020.105597>
- Guo, B., Nyman, L., Nayak, A.R., Milmore, D., McFarland, M., Twardowski, M.S., Sullivan, J.M., Yu, J., Hong, J., 2021. Automated plankton classification from holographic imagery with deep convolutional neural networks. Limnol. Oceanogr. Methods 19, 21–36. <https://doi.org/10.1002/lom3.10402>
- Güralp, H., Skaftnesmo, K.O., Kjærner-Semb, E., Straume, A.H., Kleppe, L., Schulz, R.W., Edvardsen, R.B., et al. (2020), "Rescue of germ cells in dnd crispr embryos opens the possibility to produce inherited sterility in Atlantic salmon", Scientific Reports, Nature Publishing Group, Vol. 10 No. 1, p. 18042, doi: 10.1038/s41598-020-74876-2.
- Gutiérrez-López, R. et al. (2023) 'Monitoring mosquito richness in an understudied area: can environmental DNA metabarcoding be a complementary approach to adult trapping?', Bulletin of Entomological Research, pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0007485323000147>.
- Güttler, F.N., Niculescu, S., Gohin, F., 2013. Turbidity retrieval and monitoring of Danube Delta waters using multi-sensor optical remote sensing data: An integrated view from the delta plain lakes to the western–northwestern Black Sea coastal zone. Remote Sens. Environ. 132, 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2013.01.009>
- Guzmán-Zapata, D., Sandoval-Vargas, J. M., Macedo-Osorio, K. S., Salgado-Manjarrez, E., Castrejón-Flores, J. L., del Carmen Oliver-Salvador, M., Durán-Figueroa, N. V., Nogué, F., Badillo-Corona, J. A. (2019): Efficient Editing of the Nuclear APT Reporter Gene in *Chlamydomonas reinhardtii* via Expression of a CRISPR-Cas9 Module. International Journal of Molecular Sciences 20 (5), 1247. <https://doi.org/10.3390/ijms20051247>.
- Haddadi Moghaddam, K., Soltani, M., Kamali, A., Abdolhay, H.A., 2018. The impact assessment of cage culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) on benthic communities using biological indicators in the South Caspian Sea, Iran. Iran. J. Fish. Sci. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2018.117032>
- Hahn, S., Blümlein, K. and Klein, M. (2019) 'Expositionsanalyse Rummelsburger See'.
- Hallmann, A. (2019): Advances in Genetic Engineering of Microalgae. In Grand Challenges in Algae Biotechnology, edited by Armin Hallmann and Pabulo H. Rampelotto, 159–221. Grand Challenges in Biology and Biotechnology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25233-5_5.

- Hammond, A., Pollegioni, P., Persampieri, T., North, A., Minuz, R., Trusso, A., Bucci, A., Kyrou, K., Morianou, I., Simoni, A., Nolan, T., Müller, R., Crisanti, A. (2021): Gene-drive suppression of mosquito populations in large cages as a bridge between lab and field. *Nature Communications* 12, 4589. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24790-6>
- Han, M., Liu, Y., Jin, C., Wang, X., Song, W., Zhang, Q. (2022): Genome-wide identification, characterization and expression profiling of TRAF family genes in *Sebastes schlegelii*. *Fish Shellfish Immunol.* 127, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.021>
- Hao, X., Chen, W., Amato, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Moog, D., Hu, H. et al. (2022): Multiplexed CRISPR/Cas9 Editing of the Long-Chain Acyl-CoA Synthetase Family in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* Reveals That Mitochondrial PtACSL3 Is Involved in the Synthesis of Storage Lipids. *New Phytologist* 233 (4), 1797–1812. <https://doi.org/10.1111/nph.17911>.
- Hao, X., Luo, L., Jouhet, J., Rébeillé, F., Maréchal, E., Hu, H., Pan, Y. et al. (2018): Enhanced Triacylglycerol Production in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* by Inactivation of a Hotdog-Fold Thioesterase Gene Using TALEN-Based Targeted Mutagenesis. *Biotechnology for Biofuels* 11 (1), 312. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1309-3>.
- Hapairai, L. K., Mysore, K., Sun, L., Li, P., Wang, C.-W., Scheel, N. D., Lesnik, A., Scheel, M. P., Igiede, J., Wei, N., Severson, D. W., Duman-Scheel, M. (2020): Characterization of an adulticidal and larvicidal interfering RNA pesticide that targets a conserved sequence in mosquito G protein-coupled dopamine 1 receptor genes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 120, 103359. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103359>
- Hartley, S., Ledingham, K., Owen, R., Leonelli, S., Diarra, S., Diop, S. (2021): Experimenting with co-development: A qualitative study of gene drive research for malaria control in Mali. *Soc. Sci. Med.* 276, 113850. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2021.113850>
- Hartz, P., Gehl, M., König, L., Bernhardt, R., Hannemann, F. (2021): Development and application of a highly efficient CRISPR-Cas9 system for genome engineering in *Bacillus megaterium*. *J. Biotechnol.* 329, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.02.006>
- Hatfield, R.G. et al. (2019) ‘Development of a TaqMan qPCR assay for detection of *Alexandrium* spp and application to harmful algal bloom monitoring’, *Toxicon*: X, 2, p. 100011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2019.100011>.
- Hayes, K.R., Hosack, G.R., Dana, G.V., Foster, S.D., Ford, J.H., Thresher, R., Ickowicz, A., Peel, D., Tizard, M., De Barro, P., Strive, T., Dambacher, J.M., 2018. Identifying and detecting potentially adverse ecological outcomes associated with the release of gene-drive modified organisms. *J. Responsible Innov.* 5, S139–S158. <https://doi.org/10.1080/23299460.2017.1415585>
- Hebert, P.D.N. et al. (2003) ‘Biological identifications through DNA barcodes’, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), pp. 313–321. Available at: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- Helfman, G.S. and Helfman, G.S. (Eds.). (2009), *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*, 2nd ed., Blackwell, Chichester, UK ; Hoboken, NJ.
- Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH (2020) MOSES Generalprobe ‘Elbe 2020’ vom Binnenland bis ins Meer. Available at: https://www.ufz.de/index.php?de=36336&webc_pm=40/2020 (Accessed: 19 April 2023).
- Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH (2023) BIGFE - Erfassung der Wasserqualität und Wasserflächenausdehnung von Binnengewässern durch Fernerkundung. Available at: <https://www.ufz.de/bigfe/index.php?de=48596> (Accessed: 19 April 2023).
- Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ (2023b) Übersicht - Kleingewässermonitoring. Available at: <https://www.ufz.de/kgm/index.php?de=44480> (Accessed: 13 March 2024).

- Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie (2022a) Fließgewässer. Available at: <https://www.hlnug.de/themen/wasser/fliesssgewaesser/fliesssgewaesser-chemie/messdaten-und-berichte> (Accessed: 17 April 2023).
- Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie (2022b) Grundwasser. Available at: <https://www.hlnug.de/themen/wasser/berichte/grundwasser> (Accessed: 17 April 2023).
- Hillary, V. E., Ceasar, S. A. (2021): Genome engineering in insects for the control of vector borne diseases, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 197–223. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.12.017>
- Höller, C. (2022) Gesundheit: Badewasserqualität in Bayern. Available at: <https://www.lgl.bayern.de/gesundheit/hygiene/wasserhygiene/badeseen/index.htm> (Accessed: 19 April 2023).
- Hoermann, A., Habtewold, T., Selvaraj, P., Del Corsano, G., Capriotti, P., Inghilterra, M. G., Kebede, T. M., Christophides, G. K., Windbichler, N. (2022): Gene drive mosquitoes can aid malaria elimination by retarding Plasmodium sporogonic development. *Sci. Adv.* 8, 1733
- Hohmeister, N., Werner, D. and Kampen, H. (2021) ‘The invasive Korean bush mosquito *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) in Germany as of 2020’, *Parasites & Vectors*, 14(1), p. 575. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05077-7>.
- Hossain, Md Shakhawat, Raihan, M.E., Hossain, Md Sakir, Syeed, M.M.M., Rashid, H., Reza, M.S., 2022. Aedes Larva Detection Using Ensemble Learning to Prevent Dengue Endemic. *BioMedInformatics* 2, 405–423. <https://doi.org/10.3390/biomedinformatics2030026>
- Hou, G. et al. (2022) ‘Molecular Identification of Species Diversity Using Pelagic Fish Eggs in Spring and Late Autumn-Winter in the Eastern Beibu Gulf, China’, *Frontiers in Marine Science*, 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.806208> (Accessed: 17 July 2023).
- Hoy, M. A. (2019a): Genetic Modification of Pest and Beneficial Insects for Pest Management Programs, in: *Insect Molecular Genetics*. Elsevier, pp. 563–620. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815230-0.00014-5>
- Hoy, M. A. (2019b): Transposable-Element Vectors and Other Methods to Genetically Modify *Drosophila* and Other Insects, in: *Insect Molecular Genetics*. Elsevier, pp. 315–344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815230-0.00008-X>
- Hu, G.-R., Fan, Y., Zheng, Y.-L., Xu, F., Zhang, L., Li, F. L. (2020a): Photoprotection Capacity of Microalgae Improved by Regulating the Antenna Size of Light-Harvesting Complexes. *Journal of Applied Phycology* 32 (2), 1027–39. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01969-5>.
- Hu, J., Xu, X., Wang, S. and Ge, G. (2020b), “Ctenopharyngodon idellus DDX41 initiates IFN I and ISG15 expression in response to GCRV infection”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 106, pp. 149–160, doi: 10.1016/j.fsi.2020.08.005.
- Hu, X., Wang, B., Feng, H., Zhou, M., Lin, Y. and Cao, H. (2021), “Protein Phosphatase PP1 Negatively Regulates IRF3 in Response to GCRV Infection in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*)”, *Frontiers in Immunology*, Vol. 11, doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609890>.
- Hu, Z., Du, H., Lin, G., Han, K., Cheng, X., Feng, Z., Mao, H., et al. (2020c), “Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) PACT induces cell apoptosis and activates NF-κB via PKR”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 103, pp. 377–384, doi: 10.1016/j.fsi.2020.05.036.
- Huang, B., Yang, Q., Hoffmann, A.A., Ritchie, S.A., van den Hurk, A.F., Warrilow, D. (2020): *Wolbachia* Genome Stability and mtDNA Variants in *Aedes aegypti* Field Populations Eight Years after Release. *iScience* 23, 101572. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101572>
- Huang, P.-W., Wang, L.-R., Geng, S.-S., Ye, C., Sun, X.-M. and Huang, H. (2021), “Strategies for enhancing terpenoids accumulation in microalgae”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 105 No. 12, pp. 4919–4930, doi: 10.1007/s00253-021-11368-x.

- Huang, Q., Xie, D., Mao, H., Wang, H., Wu, Z., Huang, K., Wan, Y., et al. (2017), "Ctenopharyngodon idella p53 mediates between NF- κ B and PKR at the transcriptional level", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 69, pp. 258–264, doi: 10.1016/j.fsi.2017.08.012.
- Hübner, A., Keil, G. M., Kabuuka, T., Mettenleiter, T. C., Fuchs, W. (2018): Efficient transgene insertion in a pseudorabies virus vector by CRISPR/Cas9 and marker rescue-enforced recombination. *J. Virol. Methods* 262, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.09.009>
- Hulley, E.N. et al. (2019) 'Development and validation of probe-based multiplex real-time PCR assays for the rapid and accurate detection of freshwater fish species', *PLOS ONE*, 14(1), p. e0210165. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210165>.
- Imamura, A., Hayami, K., Sakata, M., Minamoto, T., 2020. Environmental DNA revealed the fish community of Hokkaido Island, Japan, after invasion by rainbow trout. *Biodivers. Data J.* 8, e56876. <https://doi.org/10.3897/BDJ.8.e56876>
- Institut für Hygiene und Umwelt (2023a) Gewässerbiologie, hamburg.de. Available at: <https://www.hamburg.de/hu/gewaesserbiologie/> (Accessed: 17 April 2023).
- Institut für Hygiene und Umwelt (2023b) Gewässerchemie, hamburg.de. Available at: <https://www.hamburg.de/hu/gewaesserchemie/> (Accessed: 17 April 2023).
- Institut für Hygiene und Umwelt (2023c) Gewässergüte, hamburg.de. Available at: <https://www.hamburg.de/hu/wasseruntersuchungen/> (Accessed: 17 April 2023).
- Institut für Hygiene und Umwelt (2023d) Gewässerqualität in Hamburg - Aquatische Biotestverfahren, hamburg.de. Available at: <https://www.hamburg.de/hu/biotestverfahren/> (Accessed: 17 April 2023).
- Institut für Hygiene und Umwelt (2023e) Hafenmessfahrten - Wasseruntersuchungen, hamburg.de. Available at: <https://www.hamburg.de/hu/hafenmessfahrten/> (Accessed: 17 April 2023).
- Institut für Hygiene und Umwelt (2023f) Wassergütemessnetz Hamburg, hamburg.de. Available at: <https://www.hamburg.de/hu/wasserguetemessnetz/> (Accessed: 17 April 2023).
- Izzo, S.A. et al. (2019) 'First Characterization of PAH-degrading bacteria from Río de la Plata and high-resolution melting: an encouraging step toward bioremediation', *Environmental Technology*, 40(10), pp. 1250–1261. Available at: <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1420104>.
- Jang, J.H., Kim, H. and Cho, J.H. (2019), "Molecular cloning and functional characterization of TRAF6 and TAK1 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 84, pp. 927–936, doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.002.
- Janson, K.D., Carter, B.H., Jameson, S.B., De Verges, J.E., Dalliance, E.S., Royse, M.K., Kim, P., Wesson, D.M., Veisheh, O., 2023. Development of an automated biomaterial platform to study mosquito feeding behavior. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11, 1103748. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1103748>
- Javed, M. R., Noman, M., Shahid, M., Ahmed, T., Khurshid, M., Rashid, M. H., Ismail, M., Sadaf, M., Khan, F. (2019): Current situation of biofuel production and its enhancement by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of microbial cells. *Microbiol. Res.* 219, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.010>
- Ji, J., Liao, Z., Rao, Y., Li, W., Yang, C., Yuan, G., Feng, H., et al. (2020), "Thoroughly Remold the Localization and Signaling Pathway of TLR22", *Frontiers in Immunology*, Vol. 10, doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03003>.
- Ji, J., Rao, Y., Wan, Q., Liao, Z. and Su, J. (2018), "Teleost-Specific TLR19 Localizes to Endosome, Recognizes dsRNA, Recruits TRIF, Triggers both IFN and NF- κ B Pathways, and Protects Cells from Grass Carp Reovirus Infection", *The Journal of Immunology*, Vol. 200 No. 2, pp. 573–585, doi: 10.4049/jimmunol.1701149.

- Jiang, W. Z., Weeks, D. P. (2017): A Gene-within-a-Gene Cas9/SgRNA Hybrid Construct Enables Gene Editing and Gene Replacement Strategies in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research* 26 (September), 474–80. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.001>.
- Jiang, Z., Weng, P., Xu, X., Li, M., Li, Y., Lv, Y., Chang, K., et al. (2020), “IRF9 promotes apoptosis and innate immunity by inhibiting SIRT1-p53 axis in fish”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 103, pp. 220–228, doi: 10.1016/j.fsi.2020.05.038.
- Jin, Y., Datsomor, A.K., Olsen, R.E., Vik, J.O., Torgersen, J.S., Edvardsen, R.B., Wargelius, A., et al. (2020), “Targeted mutagenesis of $\Delta 5$ and $\Delta 6$ fatty acyl desaturases induce dysregulation of lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*)”, *BMC Genomics*, Vol. 21 No. 1, p. 805, doi: 10.1186/s12864-020-07218-1.
- Johnson, M.A., Friesen, T.A., VanDoornik, D.M., Teel, D.J., Myers, J.M., 2021. Genetic interactions among native and introduced stocks of *Oncorhynchus mykiss* in the upper Willamette River, Oregon. *Conserv. Genet.* 22, 111–124. <https://doi.org/10.1007/s10592-020-01322-1>
- Johnson, R. M., Rasgon, J. L. (2018): Densonucleosis viruses (‘densovirus’) for mosquito and pathogen control. *Curr. Opin. Insect Sci.* 28, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.05.009>
- Johnston, C.J., Vaux, A.G.C., Cull, B., Medlock, J.M., 2023. Passive surveillance records including nuisance or suspected invasive/non-native mosquitoes in the United Kingdom, 2005-2021. *J. Eur. Mosq. Control Assoc.* 41, 35–45. <https://doi.org/10.52004/JEMCA2022.0006>
- Južnič-Zonta, Ž., Sanpera-Calbet, I., Eritja, R., Palmer, J.R.B., Escobar, A., Garriga, J., Oltra, A., Richter-Boix, A., Schaffner, F., Della Torre, A., Miranda, M.Á., Koopmans, M., Barzon, L., Bartumeus Ferre, F., Mosquito Alert Digital Entomology Network, Mosquito Alert Community, 2022. Mosquito alert: leveraging citizen science to create a GBIF mosquito occurrence dataset. *Gigabyte* 2022, 1–11. <https://doi.org/10.46471/gigabyte.54>
- Kang, S., Jeon, S., Kim, S., Chang, Y. K., Kim, Y. C. (2020): Development of a PVEC Peptide-Based Ribonukleoprotein (RNP) Delivery System for Genome Editing Using CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports* 10 (1), 22158. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78968-x>.
- Kannry, S.H., O’Rourke, S.M., Kelson, S.J., Miller, M.R., 2020. On the ecology and distribution of steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) in California’s Eel River (preprint). *Ecology*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.996934>
- Kao, P.-H., Ng I. S. (2017): CRISPRi Mediated Phosphoenolpyruvate Carboxylase Regulation to Enhance the Production of Lipid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, SI on Advances in Industrial Bioprocesses and Products- Genetic and Metabolic Engineering Interventions, 245 (December), 1527–37. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.111>.
- Karlsruher Institut für Technologie (2022) KIT - Das KIT - Medien - Presseinformationen - Archiv Presseinformationen - Bundesweites Pilotprojekt zum Corona-Nachweis im Abwasser. Karlsruher Institut fuer Technologie. Available at: https://www.kit.edu/kit/pi_2022_015_bundesweites-pilotprojekt-zum-corona-nachweis-im-abwasser.php (Accessed: 13 June 2023).
- Ke, J., Robinson, D., Wu, Z.-Y., Kuftin, A., Louie, K., Kosina, S., Northen, T., Cheng, J.-F., Yoshikuni, Y. (2022): CRAGE-CRISPR facilitates rapid activation of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in bacteria. *Cell Chem. Biol.* 29, 696-710.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.08.009>
- Kefi, M., Balabanidou, V., Douris, V., Lycett, G., Feyereisen, R., Vontas, J. (2019): Two functionally distinct CYP4G genes of *Anopheles gambiae* contribute to cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 110, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.018>
- Khamis, D., El Mouden, C., Kura, K., Bonsall, M. B. (2018): Ecological effects on underdominance threshold drives for vector control. *J. Theor. Biol.* 456, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.07.024>

- Kheiri, R. et al. (2017) 'Multiplex PCR for detection of water-borne bacteria', *Water Supply*, 17(1), pp. 169–175. Available at: <https://doi.org/10.2166/ws.2016.126>.
- Khokher, M.R., Little, L.R., Tuck, G.N., Smith, D.V., Qiao, M., Devine, C., O'Neill, H., Pogonoski, J.J., Arangio, R., Wang, D., 2022. Early lessons in deploying cameras and artificial intelligence technology for fisheries catch monitoring: where machine learning meets commercial fishing. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 79, 257–266. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2020-0446>
- Kiefer, I., Odermatt, D., Anneville, O., Wüest, A., Bouffard, D., 2015. Application of remote sensing for the optimization of in-situ sampling for monitoring of phytoplankton abundance in a large lake. *Sci. Total Environ.* 527–528, 493–506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.011>
- Kim, J., Chang, K. S., Lee, S., Jin, E. (2021): Establishment of a Genome Editing Tool Using CRISPR-Cas9 in *Chlorella Vulgaris* UTEX395. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2), 480. <https://doi.org/10.3390/ijms22020480>.
- Kim, J., Lee, S., Baek, K., Jin, E. (2020): Site-Specific Gene Knock-Out and On-Site Heterologous Gene Overexpression in *Chlamydomonas reinhardtii* via a CRISPR-Cas9-Mediated Knock-in Method. *Frontiers in Plant Science* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00306>.
- Kim, S., Lee, R. and Sim, C. (2018) 'New SNP Markers to Identify Culex Complex Species (Diptera: Culicidae) by High-Resolution DNA Melting Analysis', *Journal of Medical Entomology*, 55(6), pp. 1446–1452. Available at: <https://doi.org/10.1093/jme/tjy120>.
- Kim, Y., Terng, E. L., Riekhof, W. R., Cahoon, E. B., Cerutti, H. (2018): Endoplasmic Reticulum Acyltransferase with Prokaryotic Substrate Preference Contributes to Triacylglycerol Assembly in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (7), 1652–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715922115>.
- King, J. G. (2020): Developmental and comparative perspectives on mosquito immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 103, 103458. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103458>
- Kistler, K. E., Vossall, L. B., Matthews, B. J. (2015): Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep.* 11, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.009>
- Kleppe, L., Fjellidal, P.G., Andersson, E., Hansen, T., Sanden, M., Bruvik, A., Skaftnesmo, K.O., et al. (2022), "Full production cycle performance of gene-edited, sterile Atlantic salmon - growth, smoltification, welfare indicators and fillet composition", *Aquaculture*, Vol. 560, p. 738456, doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738456.
- Klinkhardt, M. (2022), *Regenbogenforelle: Die kleine Schwester des Lachses*, 1st ed., SN-Vlg Michael Steinert.
- Knoth, B.A., Hargrove, J.S., Dobos, M., Copeland, T., Bowersox, B.J., 2022. Rapid Colonization of Upstream Habitats by *Oncorhynchus mykiss* Following Culvert Modification. *North Am. J. Fish. Manag.* 42, 1173–1184. <https://doi.org/10.1002/nafm.10809>
- Ko, Y. J., Kim, M., You, S. K., Shin, S. K., Chang, J., Choi, H. J., Jeong, W.-Y., Lee, M.-E., Hwang, D.-H., Han, S. O. (2021): Animal-free heme production for artificial meat in *Corynebacterium glutamicum* via systems metabolic and membrane engineering. *Metab. Eng.* 66, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.04.013>
- Kobayashi, K., Ikemoto, Y., 2019. Biofilm-associated toxin and extracellular protease cooperatively suppress competitors in *Bacillus subtilis* biofilms. *PLOS Genet.* 15, e1008232. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008232>
- Kojin, B. B., Compton, A., Adelman, Z. N., Tu, Z. (2022): Selective targeting of biting females to control mosquito-borne infectious diseases. *Trends Parasitol.* 38, 791–804. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.05.01>

- Kolosov, D. and Kelly, S.P. (2018), "Tricellular tight junction-associated angulins in the gill epithelium of rainbow trout", *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, American Physiological Society, Vol. 315 No. 2, pp. R312–R322, doi: 10.1152/ajpregu.00431.2017.
- Kompetenzzentrum Wasser Berlin (2022) Hygienisch relevante Mikroorganismen und Krankheitserreger in multifunktionalen Gewässern und Wasserkreisläufen (FLUSSHYGIENE), Kompetenzzentrum Wasser Berlin. Available at: <https://kompetenzwasser.de/de/forschung/projekte/flusshygiene> (Accessed: 19 April 2023).
- Kong, L., Song, X., Xia, Y., Ai, L., Xiong, Z. (2022): Construction of a CRISPR/nCas9-assisted genome editing system for exopolysaccharide biosynthesis in *Streptococcus thermophilus*. *Food Res. Int.* 158, 111550. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111550>
- Krespach, M.K.C., García-Altares, M., Flak, M., Hanno Schoeler, Scherlach, K., Netzker, T., Schmalzl, A., Mattern, D.J., Schroeckh, V., Komor, A., Mittag, M., Hertweck, C., Brakhage, A.A., 2020. Lichen-like association of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans* protects algal cells from bacteria. *ISME J.* 14, 2794–2805. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0731-2>
- Krishnan, A., Cano, M., Burch, T. A., Weissman, J. C., Posewitz, M. C. (2020): Genome Editing Using Cas9-RNA Ribonukleoprotein Complexes in the High-Productivity Marine Alga *Picochlorum Celeri*. *Algal Research* 49 (August), 101944. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101944>.
- Kugler, A., Zorin, B., Didi-Cohen, S., Sibiryak, M., Gorelova, O., Ismagulova, T., Kokabi, K. et al. (2019): Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in the Green Microalga *Lobosphaera Incisa* Contribute to Tolerance to Abiotic Stresses. *Plant and Cell Physiology* 60 (6), 1205–23. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz013>.
- Kumar, G., Shekh, A., Jakhu, S., Sharma, Y., Kapoor, R., Sharma, T. R. (2020): Bioengineering of Microalgae: Recent Advances, Perspectives, and Regulatory Challenges for Industrial Application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00914>.
- Kumari, A., Chaudhary, D. R. (2020): Engineered microbes and evolving plastic bioremediation technology, in: *Bioremediation of Pollutants*. Elsevier, pp. 417–443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819025-8.00021-1>
- Kurita, T., Iwai, M., Moroi, K., Okazaki, K., Nomura, S., Saito, F., Maeda, S. et al. (2022): Genome Editing with Removable TALEN Vectors Harboring a Yeast Centromere and Autonomous Replication Sequence in Oleaginous Microalga. *Scientific Reports* 12 (1), 2480. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06495-y>.
- Kurita, T., Moroi, K., Iwai, M., Okazaki, K., Shimizu, S., Nomura, S., Saito, F. et al. (2020): Efficient and Multiplexable Genome Editing Using Platinum TALENs in Oleaginous Microalga, *Nannochloropsis Oceanica* NIES-2145. *Genes to Cells* 25 (10), 695–702. <https://doi.org/10.1111/gtc.12805>.
- Kyrou, K., Hammond, A.M., Galizi, R., Kranjc, N., Burt, A., Beaghton, A.K., Nolan, T., Crisanti, A., 2018. A CRISPR–Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat. Biotechnol.* 36, 1062–1066. <https://doi.org/10.1038/nbt.4245>
- Landesamt für Gesundheit und Soziales (2022) Wasserhygiene - LAGuS. Available at: https://www.lagus.mv-regierung.de/Gesundheit/Umwelthygiene_Umweltmedizin/Wasserhygiene/ (Accessed: 17 April 2023).
- Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (2023a) Laborschiff MAX PRÜSS - Gewässerüberwachung zwischen Rhein und Weser. Available at: <https://www.lanuv.nrw.de/umwelt/wasser/gewaesserueberwachung/max-pruess-laborschiff> (Accessed: 17 April 2023).

- Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (2023b) PCB in Oberflächengewässern. Available at: <https://www.lanuv.nrw.de/umwelt/wasser/gewaesserueberwachung/pcb-in-oberflaechen-gewaessern> (Accessed: 17 April 2023).
- Landesamt für Umwelt Brandenburg (2022) Monitoring Flussgebiet Schwarze Elster | Startseite | LfU. Available at: <https://lfu.brandenburg.de/lfu/de/aufgaben/wasser/fliessgewaesser-und-seen/gewaesserueberwachung/monitoring-flussgebiet-schwarze-elster/> (Accessed: 13 June 2023).
- Landesamt für Umwelt Brandenburg (2022a) Gewässerüberwachung | Startseite | LfU. Available at: <https://lfu.brandenburg.de/lfu/de/aufgaben/wasser/fliessgewaesser-und-seen/gewaesserueberwachung/> (Accessed: 14 March 2024).
- Landesamt für Umwelt Brandenburg (2022b) Hydrologisches Landesmessnetz | Startseite | LfU. Available at: <https://lfu.brandenburg.de/lfu/de/aufgaben/wasser/fliessgewaesser-und-seen/quantitative-gewaesserkunde/hydrologisches-landesmessnetz/> (Accessed: 14 March 2024).
- Landesamt für Umwelt Brandenburg (2023) Badegewässer | Ministerium für Soziales, Gesundheit, Integration und Verbraucherschutz. Available at: <https://msgiv.brandenburg.de/msgiv/de/themen/verbraucherschutz/wasserhygiene/badegewaesser/#> (Accessed: 14 March 2024).
- Landesamt für Umwelt Brandenburg (2024) Gewässerzustandsbewertung | Startseite | LfU. Available at: <https://lfu.brandenburg.de/lfu/de/aufgaben/wasser/fliessgewaesser-und-seen/gewaesserzustandsbewertung/> (Accessed: 14 March 2024).
- Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern (2022) Gewässerüberwachung in Mecklenburg-Vorpommern - LUNG M-V. Available at: <https://www.lung.mv-regierung.de/insite/cms/umwelt/wasser/gewaesserueberwachung.htm> (Accessed: 17 April 2023).
- Landesamt für Umwelt Rheinland-Pfalz (2023) Messnetz Grundwasser, Ifu.rlp.de. Available at: <https://lfu.rlp.de/de/wasserwirtschaft/hydrologie/hydrologie/messnetz-grundwasser/> (Accessed: 18 April 2023).
- Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg (2017) Gewässermonitoring in Baden-Württemberg.
- Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (2006) Grundwasserüberwachungsprogramm. Grundwasserfauna in Baden-Württemberg. Available at: <https://pudi.lubw.de/detailseite/-/publication/77258> (Accessed: 13 August 2024).
- Landesbetrieb für Hochwasserschutz und Wasserwirtschaft Sachsen-Anhalt (LHW) (2009) Erhebung und Bewertung der Grundwasserfauna Sachsen-Anhalts. Available at: https://lhw.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik_und_Verwaltung/Landesbetriebe/LHW/neu_PDF/5.0_GLD/Dokumente_GLD/Berichte_Dokumente_GW/Abschlussbericht_GW_Fauna_2009.pdf (Accessed: 13 August 2024).
- Landesportal Sachsen-Anhalt (2023a) Gewässerüberwachung, Landesportal Sachsen-Anhalt. Available at: <https://lhw.sachsen-anhalt.de/untersuchen-bewerten/gewaesserueberwachung> (Accessed: 18 April 2023).
- Landesportal Sachsen-Anhalt (2023b) Hydrologie im Gewässerkundlichen Landesdienst. Available at: <https://lhw.sachsen-anhalt.de/untersuchen-bewerten/hydrologie-im-gld> (Accessed: 18 April 2023).
- Landesportal Sachsen-Anhalt (2023c) Landesbetrieb für Hochwasserschutz und Wasserwirtschaft Sachsen-Anhalt (LHW), Landesportal Sachsen-Anhalt. Available at: <https://lhw.sachsen-anhalt.de/> (Accessed: 18 April 2023).

- Landesportal Schleswig-Holstein (2022) Grundwasserüberwachung in Schleswig-Holstein, schleswig-holstein.de. Available at: <https://www.schleswig-holstein.de/DE/fachinhalte/G/grundwasser/Messstellen/messstellen.html> (Accessed: 18 April 2023).
- Landesportal Schleswig-Holstein (2023) Die Gewässerüberwachung - das Monitoring, schleswig-holstein.de. Available at: https://www.schleswig-holstein.de/DE/fachinhalte/F/fluesse_baeche/monitoring.html (Accessed: 18 April 2023).
- Landesregierung Brandenburg (2023a) Monitoring Flussgebiet Spree. Available at: <https://lfu.brandenburg.de/lfu/de/aufgaben/wasser/fliessgewaesser-und-seen/gewaesserueberwachung/monitoring-flussgebiet-spree/> (Accessed: 17 April 2023).
- Landesregierung Brandenburg (2023b) Grundwasseruntersuchung | Startseite | LfU. Available at: <https://lfu.brandenburg.de/lfu/de/aufgaben/wasser/grundwasser/grundwasserbeschaffenheit/grundwasseruntersuchung/#> (Accessed: 14 March 2024).
- Le, K.T., Yuan, Z., Syed, A., Ratelle, D., Orenstein, E.C., Carter, M.L., Strang, S., Kenitz, K.M., Morgado, P., Franks, P.J.S., Vasconcelos, N., Jaffe, J.S., 2022. Benchmarking and Automating the Image Recognition Capability of an In Situ Plankton Imaging System. *Front. Mar. Sci.* 9, 869088. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.869088>
- Lee, S., Kim, H., Cho, B.-K., 2023. Deep Learning-Based Image Classification for Major Mosquito Species Inhabiting Korea. *Insects* 14, 526. <https://doi.org/10.3390/insects14060526>
- Lee, B.B. et al. (2020) 'Rapid Genetic Identification of the Blue Crab *Callinectes sapidus* and Other *Callinectes* spp. Using Restriction Enzyme Digestion and High Resolution Melt (HRM) Assays', *Frontiers in Marine Science*, 7. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2020.00633> (Accessed: 15 August 2023).
- Lee, E.S. et al. (2021) 'Detection of the Benthic Dinoflagellates, *Ostreopsis* cf. *ovata* and *Amphidinium massartii* (Dinophyceae), Using Loop-Mediated Isothermal Amplification', *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(8), p. 885. Available at: <https://doi.org/10.3390/jmse9080885>.
- Lee, H.-G. et al. (2020) 'Quantification of the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Alexandrium* species using a digital PCR', *Harmful Algae*, 92, p. 101726. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101726>.
- Lee, S. et al. (2019) 'Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR methods', *Water Research*, 160, pp. 371–379. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.049>.
- Lee, Y.-Y., Park, R., Miller, S. M., Li, Y. (2022): Genetic Compensation of Triacylglycerol Biosynthesis in the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 111 (4), 1069–80. <https://doi.org/10.1111/tbj.15874>.
- Leese, F. et al. (2016) 'DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe', *Research Ideas and Outcomes*, 2, p. e11321. Available at: <https://doi.org/10.3897/rio.2.e11321>.
- Lekki, J., Deutsch, E., Sayers, M., Bosse, K., Anderson, R., Tokars, R., Sawtell, R., 2019. Determining remote sensing spatial resolution requirements for the monitoring of harmful algal blooms in the Great Lakes. *J. Great Lakes Res.* 45, 434–443. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.03.014>
- Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (2023) RESI-Konzept. Available at: <https://www.resi-project.info/konzept/> (Accessed: 19 April 2023).
- Le Quinio, A., De Oliveira, E., Girard, A., Guillard, J., Roussel, J.-M., Zaoui, F., Martignac, F., 2023. Automatic detection, identification and counting of anguilliform fish using in situ acoustic camera data: Development of a cross-camera morphological analysis approach. *PLOS ONE* 18, e0273588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273588>

- Le Roux, J. (2022): Incorporating evolutionary biology into invasive species management, in: The Evolutionary Ecology of Invasive Species. Elsevier, pp. 189–208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818378-6.00010-3>
- Li, H. et al. (2022) ‘Rapid detection of *Edwardsiella ictaluri* in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) by real-time RPA and RPA-LFD’, *Aquaculture*, 552, p. 737976. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737976>.
- Li, H.-H., Cai, Y., Li, J.-C., Su, M. P., Liu, W.-L., Cheng, L., Chou, S.-J., Yu, G.-Y., Wang, H.-D., Chen, C.-H. (2020a): C-Type Lectins Link Immunological and Reproductive Processes in *Aedes aegypti*. *iScience* 23, 101486. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101486>
- Li, H.-H., Li, J.-C., Su, M. P., Liu, K.-L., Chen, C.-H. (2021a): Generating mutant *Aedes aegypti* mosquitoes using the CRISPR/Cas9 system. *STAR Protoc.* 2, 100432. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100432>
- Li, J., Han, M., Yu, J. (2018a): Simple paratransgenic mosquitoes models and their dynamics. *Math. Biosci.* 306, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2018.10.005>
- Li, J., Macdonald, J. and Stetten, F. von (2019) ‘Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification’, *Analyst*, 144(1), pp. 31–67. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8AN01621F>.
- Li, M., Xu, X., Jiang, Z., Liu, C., Shi, X., Qi, G., Li, Y., et al. (2018b), “Fish SAMHD1 performs as an activator for IFN expression”, *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 86, pp. 138–146, doi: 10.1016/j.dci.2018.05.011.
- Li, Y.-P., Bu, Q.-T., Li, J.-F., Xie, H., Su, Y.-T., Du, Y.-L., Li, Y.-Q. (2021b): Genome-based rational engineering of *Actinoplanes deccanensis* for improving fidaxomicin production and genetic stability. *Bioresour. Technol.* 330, 124982. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124982>
- Li, Y., Lu, Z., Zhan, F., Yang, M., Zhao, L., Shi, F., Li, J., et al. (2021c), “Nrf2 modulates host defense during antibacterial immunity response in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)”, *Aquaculture*, Vol. 536, p. 736474, doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736474.
- Li, Y., Mao, Y., Yu, N., Xu, X., Li, M., Jiang, Z., Wu, C., et al. (2020b), “Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) TRAF6 up-regulates IFN1 expression by activating IRF5”, *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 102, p. 103475, doi: 10.1016/j.dci.2019.103475.
- Li, Y., Qiu, X., Lu, Z., Zhan, F., Yang, M., Sarath Babu, V., Li, J., et al. (2021d), “Molecular and functional characterization of MST2 in grass carp during bacterial infection”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 119, pp. 19–30, doi: 10.1016/j.fsi.2021.09.026.
- Li, Z., Ding, D., Wang, H., Liu, L., Fang, H., Chen, T., Zhang, D. (2020b): Engineering *Escherichia coli* to improve tryptophan production via genetic manipulation of precursor and cofactor pathways. *Synth. Syst. Biotechnol.* 5, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.06.009>
- Li, H., Zheng, C., Xiao, M., Huan, Q., Chen, J., Dong, M., Hao, W., Hu, Z., Lei, A., Wang, J. (2020c): Plastid Terminal Oxidases in *Chlamydomonas*: Connections with Astaxanthin and Bio-Hydrogen Production. Preprint. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-21273/v1>.
- Liang, Y., Jiao, S., Wang, M., Yu, H., Shen, Z. (2020): A CRISPR/Cas9-based genome editing system for *Rhodococcus ruber* TH. *Metab. Eng.* 57, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.10.003>
- Liang, Y., Wei, Y., Jiao, S., Yu, H. (2021): A CRISPR/Cas9-based single-stranded DNA recombineering system for genome editing of *Rhodococcus opacus* PD630. *Synth. Syst. Biotechnol.* 6, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.08.001>
- Lin, Z., Li, H., He, L., Jing, Y., Pistolozzi, M., Wang, T., Ye, Y. (2021): Efficient genome editing for *Pseudomonas aeruginosa* using CRISPR-Cas12a. *Gene* 790, 145693. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145693>

- Lin, J.-Y., Lin, W.-R., Ng I-S. (2022): CRISPRa/i with Adaptive Single Guide Assisted Regulation DNA (AS-GARD) Mediated Control of *Chlorella Sorokiniana* to Enhance Lipid and Protein Production. *Biotechnology Journal* 17 (10), 2100514. <https://doi.org/10.1002/biot.202100514>.
- Lin, W.-R., Tan, S.-I., Hsiang, C.-C., Sung, P.-K., Ng, I-S. (2019): Challenges and Opportunity of Recent Genome Editing and Multi-Omics in Cyanobacteria and Microalgae for Biorefinery. *Bioresource Technology* 291 (November), 121932. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121932>.
- Liu, Y., Du, H., Wang, S., Lv, Y., Deng, H., Chang, K., Zhou, P., et al. (2021), “Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TNK1 modulates JAK-STAT signaling through phosphorylating STAT1”, *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 116, p. 103951, doi: 10.1016/j.dci.2020.103951.
- Liu, F., Ye, Z., Baker, A., Sun, H., Zwiebel, L. J. (2020a): Gene editing reveals obligate and modulatory components of the CO₂ receptor complex in the malaria vector mosquito, *Anopheles coluzzii*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 127, 103470. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103470>
- Liu, H., Chen, Y., Zhang, Y., Zhao, W., Guo, H., Wang, Siqi, Xia, W., Wang, Shufang, Liu, R., Yang, C. (2022): Enhanced production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2440 by a combination of genome streamlining and promoter engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 209, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.004>
- Liu, K., Gao, Y., Li, Z.-H., Liu, M., Wang, F.-Q., Wei, D.-Z. (2022a): CRISPR-Cas12a assisted precise genome editing of *Mycobacterium neoaurum*. *New Biotechnol.* 66, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.10.003>
- Liu, M. et al. (2020) ‘A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists’, *Ecological Entomology*, 45(3), pp. 373–385. Available at: <https://doi.org/10.1111/een.12831>.
- Liu, P., Jin, B., Li, X., Zhao, Y., Gu, J., Biedler, J. K., Tu, Z. J., Chen, X.-G. (2020b): Nix is a male-determining factor in the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 118, 103311. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103311>
- Liu, S., Xia, Y., Yang, H., Shen, W., Chen, X. (2022b): Rational chromosome engineering of *Escherichia coli* for overproduction of salidroside. *Biochem. Eng. J.* 184, 108474. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108474>
- Liu, Y., Gao, J., Wang, Y., Duan, W., Liu, J., Zhang, Y., Zhang, H., Zhao, M. (2022c): The removal of antibiotic resistant bacteria and genes and inhibition of the horizontal gene transfer by contrastive research on sulfidated nanoscale zerovalent iron activating peroxymonosulfate or peroxydisulfate. *J. Hazard. Mater.* 423, 126866. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126866>
- Liu, Z., Chen, S., Xie, W., Song, Y., Li, J., Lai, L., Li, Z. (2022d): Versatile and efficient in vivo genome editing with compact *Streptococcus pasteurianus* Cas9. *Mol. Ther.* 30, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.06.013>
- Liu, Y., Li, Y., Zhao, H., Zhu, B., Xu, J., Xu, F., Liu, S., Li, X., Zhou, C. (2022e): Phloroglucinol Promotes Fucoxanthin Synthesis by Activating the Cis-Zeatin and Brassinolide Pathways in *Thalassiosira Pseudonana*. *Applied and Environmental Microbiology* 88 (6), e02160-21. <https://doi.org/10.1128/aem.02160-21>.
- Liu, H., Yu, T., Hu, B., Hou, X., Zhang, Z., Liu, X., Liu, J., Wang, X., Zhong, J., Tan, Z., Xia, S., Qian, B., 2021. UAV-Borne Hyperspectral Imaging Remote Sensing System Based on Acousto-Optic Tunable Filter for Water Quality Monitoring. *Remote Sens.* 13, 4069. <https://doi.org/10.3390/rs13204069>
- Lobanova, J. S., Gorshkova, N. V., Krylov, A. A., Stoyanova, N. V., Mashko, S. V. (2022): Genome engineering of the *Corynebacterium glutamicum* chromosome by the Extended Dual-In/Out strategy. *J. Microbiol. Methods* 200, 106555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106555>

- Lobato, I.M. and O'Sullivan, C.K. (2018) 'Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances', *Trends in Analytical Chemistry*, 98, pp. 19–35. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.
- Lopez-Marcano, S., L. Jinks, E., Buelow, C.A., Brown, C.J., Wang, D., Kusy, B., M. Ditria, E., Connolly, R.M., 2021. Automatic detection of fish and tracking of movement for ecology. *Ecol. Evol.* 11, 8254–8263. <https://doi.org/10.1002/ece3.7656>
- Loutfi, H., Pellen, F., Le Jeune, B., Lteif, R., Kallassy, M., Le Brun, G., Abboud, M., 2020. Real-time monitoring of bacterial growth kinetics in suspensions using laser speckle imaging. *Sci. Rep.* 10, 408. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57281-2>
- Low, R., Boger, R., Nelson, P., Kimura, M., 2021. GLOBE Mosquito Habitat Mapper Citizen Science Data 2017–2020. *GeoHealth* 5. <https://doi.org/10.1029/2021GH000436>
- Low, R.D., Schwerin, T.G., Boger, R.A., Soeffing, C., Nelson, P.V., Bartlett, D., Ingle, P., Kimura, M., Clark, A., 2022. Building International Capacity for Citizen Scientist Engagement in Mosquito Surveillance and Mitigation: The GLOBE Program's GLOBE Observer Mosquito Habitat Mapper. *Insects* 13, 624. <https://doi.org/10.3390/insects13070624>
- Lu, S., Peng, X., Lin, G., Xu, K., Wang, S., Qiu, W., Du, H., et al. (2021), "Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) SHP2 suppresses IFN I expression via decreasing the phosphorylation of GSK3 β in a non-contact manner", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 116, pp. 150–160, doi: 10.1016/j.fsi.2021.07.005.
- Lucker, B.F., Temple, J.A., Panchy, N.L., Benning, U.F., Bibik, J.D., Neofotis, P.G., Weissman, J.C., Baxter, I.R., Shiu, S.-H., Kramer, D.M., 2022. Selection-enriched genomic loci (SEGL) reveals genetic loci for environmental adaptation and photosynthetic productivity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* 64, 102709. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102709>
- Luo, L., Zhu, D., Huang, R., Xiong, L., Mehjabin, R., He, L., Liao, L., et al. (2019), "Molecular cloning and preliminary functional analysis of six RING-between-ring (RBR) genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 87, pp. 62–72, doi: 10.1016/j.fsi.2018.12.078.
- Luo, Q., Zou, X., Wang, C., Li, Y., Hu, Z. (2021): The Roles of Cullins E3 Ubiquitin Ligases in the Lipid Biosynthesis of the Green Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (9), 4695. <https://doi.org/10.3390/ijms22094695>.
- Ma, J., Fan, Y., Zhou, Y., Liu, W., Jiang, N., Zhang, J. and Zeng, L. (2018), "Efficient resistance to grass carp reovirus infection in JAM-A knockout cells using CRISPR/Cas9", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 76, pp. 206–215, doi: 10.1016/j.fsi.2018.02.039.
- Ma, J., Jin, S., Li, J., He, Y., Shang, W., 2021. Spatio-Temporal Variations and Driving Forces of Harmful Algal Blooms in Chaohu Lake: A Multi-Source Remote Sensing Approach. *Remote Sens.* 13, 427. <https://doi.org/10.3390/rs13030427>
- Ma, X., Yao, L., Yang, B., Lee, Y. K., Chen, F., Liu, J. (2017): RNAi-Mediated Silencing of a Pyruvate Dehydrogenase Kinase Enhances Triacylglycerol Biosynthesis in the Oleaginous Marine Alga *Nannochloropsis Salina*. *Scientific Reports* 7 (1), 11485. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11932-4>.
- Maasz, G. et al. (2020) 'Testing the Applicability of MALDI-TOF MS as an Alternative Stock Identification Method in a Cryptic Species Complex', *Molecules*, 25(14), p. 3214. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25143214>.
- Mabrok, M. et al. (2021) 'Rapid visualization in the specific detection of *Flavobacterium columnare*, a causative agent of freshwater columnaris using a novel recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow dipstick (LFD) assay', *Aquaculture*, 531, p. 735780. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735780>.

- Macher, T. (2020) GeDNA Projekt, GeDNA Projekt. Available at: <https://gednaprojekt.wordpress.com/> (Accessed: 19 April 2023).
- Macias, V. M., Jimenez, A. J., Burini-Kojin, B., Pledger, D., Jasinskiene, N., Phong, C. H., Chu, K., Fazekas, A., Martin, K., Marinotti, O., James, A. A. (2017): nanos-Driven expression of piggyBac transposase induces mobilization of a synthetic autonomous transposon in the malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 87, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.014>
- MacNeil, L., Missan, S., Luo, J., Trappenberg, T., LaRoche, J., 2021. Plankton classification with high-throughput submersible holographic microscopy and transfer learning. *BMC Ecol. Evol.* 21, 123. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01839-0>
- Madureira, T.V., Pinheiro, I., Malhão, F., Castro, L.F.C., Rocha, E. and Urbatzka, R. (2019), “Silencing of PPAR α Bb mRNA in brown trout primary hepatocytes: effects on molecular and morphological targets under the influence of an estrogen and a PPAR α agonist”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 229, pp. 1–9, doi: 10.1016/j.cbpb.2018.12.001.
- Mahapatra, S., Yadav, R., Ramakrishna, W., 2022. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *J. Appl. Microbiol.* 132, 3543–3562. <https://doi.org/10.1111/jam.15480>
- Malik, H., Naeem, A., Hassan, S., Ali, F., Naqvi, R.A., Yon, D.K., 2023. Multi-classification deep neural networks for identification of fish species using camera captured images. *PLOS ONE* 18, e0284992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284992>
- Mandpe, A., Bombaywala, S., Paliya, S., Kumar, S. (2022): Efficacy of microbes in removal of pesticides from watershed system, in: *Synergistic Approaches for Bioremediation of Environmental Pollutants : Recent Advances and Challenges*. Elsevier, pp. 27–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91860-2.00010-5>
- Mankiewicz, J.L., Picklo, M.J., Idso, J. and Cleveland, B.M. (2022), “Leptin Receptor Deficiency Results in Hyperphagia and Increased Fatty Acid Mobilization during Fasting in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, doi: <https://doi.org/10.3390/biom12040516>.
- Markoulatos, P., Siafakas, N. and Moncany, M. (2002) ‘Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach’, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), pp. 47–51. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>.
- Martinou, A.F., Fawcett, J., Georgiou, M., Angelidou, I., Philippou, M., Schaffner, F., 2021. Occurrence of *Aedes cretinus* in Cyprus based on information collected by citizen scientists. *J. Eur. Mosq. Control Assoc.* 39, 31–38. <https://doi.org/10.52004/JEMCA2021.0002>
- Martzy, R. et al. (2017) ‘A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Enterococcus* spp. in water’, *Water Research*, 122, pp. 62–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.023>.
- Matsui, K., Ishii, N., Kawabata, Z., 2003. Microbial interactions affecting the natural transformation of *Bacillus subtilis* in a model aquatic ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 211–218. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00148-X)
- McCullagh, J. and Oldham, N. (2019) *Mass Spectrometry*. Oxford University Press.
- Mehta, K., Shukla, A., Saraf, M. (2021): Articulating the exuberant intricacies of bacterial exopolysaccharides to purge environmental pollutants. *Heliyon* 7, e08446. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08446>

- Meijers, A. S., Troost, R., Ummels, R., Maaskant, J., Speer, A., Nejentsev, S., Bitter, W., Kuijl, C. P. (2020): Efficient genome editing in pathogenic mycobacteria using *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9. *Tuberculosis* 124, 101983. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101983>
- Mello, R.V. et al. (2017) 'MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green microalgae (Selenastreae, Chlorophyta)', *Algal Research*, 28, pp. 151–160. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.015>.
- Mergen, P. et al. (2018) 'DNAqua-Net or how to navigate on the stormy waters of standards and legislations', *Biodiversity Information Science and Standards*, 2, p. e25953. Available at: <https://doi.org/10.3897/biss.2.25953>.
- Merkling, S. H., Raquin, V., Dabo, S., Henrion-Lacritick, A., Blanc, H., Moltini-Conclois, I., Frangeul, L., Varet, H., Saleh, M.-C., Lambrechts, L. (2020): Tudor-SN Promotes Early Replication of Dengue Virus in the *Aedes aegypti* Midgut. *iScience* 23, 100870. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100870>
- Merz, E., Kozakiewicz, T., Reyes, M., Ebi, C., Isles, P., Baity-Jesi, M., Roberts, P., Jaffe, J.S., Dennis, S.R., Hardeman, T., Stevens, N., Lorimer, T., Pomati, F., 2021. Underwater dual-magnification imaging for automated lake plankton monitoring. *Water Res.* 203, 117524. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117524>
- M. Gulfan, C.N.A., Vilela-Malabanan, C.M., 2022. Evaluating the usability and user experience of phytoplankton cell counter prototype. *Procedia Comput. Sci.* 197, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2021.12.145>
- Miklau, M., Burn, S.-J., Eckerstorfer, M., Dolezel, M., Greiter, A., Heissenberger, A., Hörtenhuber, S., Zollitsch, W., Hagen, K. (2024): Horizon scanning of potential environmental applications of terrestrial animals, fish, algae and microorganisms produced by genetic modification, including the use of new genomic techniques. *Front. Genome Ed.* 6, 1376927. doi: 10.3389/fgeed.2024.1376927
- Min, J. and Kim, K.Y. (2023) 'Seasonal change and subniche dynamics of three *Alexandrium* species in the Korea Strait', *Harmful Algae*, 125, p. 102420. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102420>.
- Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie und Mobilität and Rheinland-Pfalz, Abt. Wasserwirtschaft (2023) AKTION BLAU - Gewässerentwicklung in Rheinland-Pfalz. Available at: <https://aktion-blau-plus.rlp-umwelt.de/servlet/is/8380/> (Accessed: 18 April 2023).
- Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie und Mobilität, Rheinland-Pfalz, Abt. Wasserwirtschaft and Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie und Mobilität (2022) Abwasser. Available at: <https://wasser.rlp-umwelt.de/servlet/is/1217/> (Accessed: 18 April 2023).
- Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Klimaschutz (MLUK) des Landes Brandenburg (2022a) Anthropogene Spurenstoffe | MLUK. Available at: <https://mluk.brandenburg.de/mluk/de/umwelt/wasser/abwasser/anthropogene-spurenstoffe/> (Accessed: 13 June 2023).
- Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Klimaschutz (MLUK) des Landes Brandenburg (2022b) Bewirtschaftungserlasse Eisen und Sulfat | MLUK. Available at: <https://mluk.brandenburg.de/mluk/de/umwelt/wasser/bergbaufolgen-fuer-den-wasserhaushalt/bewirtschaftungserlasse-eisen-und-sulfat/> (Accessed: 13 June 2023).
- Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Klimaschutz (MLUK) des Landes Brandenburg (2022c) Wassermengen-/Wassergütesteuern | MLUK. Available at: <https://mluk.brandenburg.de/mluk/de/umwelt/wasser/bergbaufolgen-fuer-den-wasserhaushalt/wassermengen-wasserguesteuern/> (Accessed: 13 June 2023).
- Ministerium für Umwelt, Forsten und Verbraucherschutz (2008) Gewässerüberwachung Messen - Beobachten - Dokumentieren.

- Ministerium für Umwelt, Klima, Mobilität, Agrar und Verbraucherschutz (2019a) Gewässerökologie, Wasser. Available at: https://www.saarland.de/mukmav/DE/portale/wasser/informationen/oberflaechengewaesser/gewaesseroekologie/gewaesseroekologie_node.html (Accessed: 18 April 2023).
- Ministerium für Umwelt, Klima, Mobilität, Agrar und Verbraucherschutz (2019b) Grundwasserüberwachung, Wasser. Available at: https://www.saarland.de/mukmav/DE/portale/wasser/informationen/grundwasser/grundwasserueberwachung/grundwasserueberwachung_node.html (Accessed: 18 April 2023).
- Ministerium für Umwelt, Klima und and Energiewirtschaft Baden-Württemberg (2022) Gewässerüberwachung in Baden-Württemberg, Baden-Württemberg.de. Available at: <https://um.baden-wuerttemberg.de/de/umwelt-natur/wasser/gewaesserueberwachung> (Accessed: 18 April 2023).
- Ministerium für Umwelt, Klima und and Energiewirtschaft Baden-Württemberg (2023) Projekt: SAMOSEE-BW, Baden-Württemberg.de. Available at: <https://um.baden-wuerttemberg.de/de/umwelt-natur/nachhaltigkeit/nachhaltige-digitalisierung/projekte/samosee-bw> (Accessed: 18 April 2023).
- Miri, S., Saini, R., Davoodi, S.M., Pulicharla, R., Brar, S. K., Magdouli, S. (2022): Biodegradation of microplastics: Better late than never. *Chemosphere* 286, 131670. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131670>
- Mo, J., Wang, S., Zhang, W., Li, C., Deng, Z., Zhang, L., Qu, X. (2019): Efficient editing DNA regions with high sequence identity in actinomycetal genomes by a CRISPR-Cas9 system. *Synth. Syst. Biotechnol.* 4, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.02.004>
- Mohammed-Awel, J., Iboi, E. A., Gumel, A. B. (2020): Insecticide resistance and malaria control: A genetics-epidemiology modeling approach. *Math. Biosci.* 325, 108368. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2020.108368>
- Moosburner, M. A., Gholami, P., McCarthy, J. K., Tan, M., Bielinski, V. A., Allen, A. E. (2020): Multiplexed Knockouts in the Model Diatom *Phaeodactylum* by Episomal Delivery of a Selectable Cas9. *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00005>.
- Moshi, H.A., Shilla, D.A., Kimirei, I.A., O’ Reilly, C., Clymans, W., Bishop, I., Loiselle, S.A., 2022. Community monitoring of coliform pollution in Lake Tanganyika. *PLOS ONE* 17, e0262881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262881>
- Mou, C.-Y., Wang, Y., Yu, P., Li, Z., Wang, Z.-W., Li, X.-Y., Li, S., et al. (2022), “Cooperative antiviral activities of two duplicated viperin homeologs confirmed by CRISPR/Cas9 editing in hexaploid gibel carp”, *Aquaculture*, Vol. 548, p. 737609, doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737609.
- Murindahabi, M.M., Hoseni, A., Corné Vreugdenhil, L.C., Van Vliet, A.J.H., Umupfasoni, J., Mutabazi, A., Hakizimana, E., Poortvliet, P.M., Mutesa, L., Takken, W., Koenraadt, C.J.M., 2021. Citizen science for monitoring the spatial and temporal dynamics of malaria vectors in relation to environmental risk factors in Ruhuha, Rwanda. *Malar. J.* 20, 453. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03989-4>
- Murindahabi, M.M., Takken, W., Hakizimana, E., Van Vliet, A.J.H., Poortvliet, P.M., Mutesa, L., Koenraadt, C.J.M., 2022. A handmade trap for malaria mosquito surveillance by citizens in Rwanda. *PLOS ONE* 17, e0266714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266714>
- Nachtigall, P.G. et al. (2017) ‘A multiplex PCR approach for the molecular identification and conservation of the Critically Endangered daggernose shark’, *Endangered Species Research*, 32, pp. 169–175. Available at: <https://doi.org/10.3354/esr00798>.
- Naduthodi, M. I. S., Mohanraju, P., Südfeld, C., D’Adamo, S., Barbosa, M. J., van der Oost, J. (2019): CRISPR–Cas Ribonukleoprotein Mediated Homology-Directed Repair for Efficient Targeted Genome Editing in Microalgae *Nannochloropsis Oceanica* IMET1. *Biotechnology for Biofuels* 12 (1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1401-3>.

- Naduthodi, M. I. S., Südfeld, C., Avitzigiannis, E. K., Trevisan, N., van Lith, E., Sancho, J. A., D'Adamo, S., Barbosa, M., van der Oost, J. (2021): Comprehensive Genome Engineering Toolbox for Microalgae *Nannochloropsis Oceanica* Based on CRISPR-Cas Systems. *ACS Synthetic Biology* 10 (12), 3369–78. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00329>.
- Nanjani, S., Soni, R., Paul, D., Keharia, H. (2022): Genome analysis uncovers the prolific antagonistic and plant growth-promoting potential of endophyte *Bacillus velezensis* K1. *Gene* 836, 146671. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146671>
- Natiello, M. A., Solari, H. G. (2020): Modelling population dynamics based on experimental trials with genetically modified (RIDL) mosquitoes. *Ecol. Model.* 424, 108986. <https://doi.org/10.1016/j.ecol-model.2020.108986>
- Nationalparkamt Müritz (2023) Gewässer-Monitoring - Müritz-Nationalpark. Available at: <https://www.muertitz-nationalpark.de/wissen-verstehen/forschung/schwerpunkte/gewaesser-monitoring> (Accessed: 17 April 2023).
- Naturpark Schlei e.V. (2023) Modellregion Schlei - Umweltzustand. Available at: <https://www.naturparkschlei.de/natur-und-umweltschutz/modellregion-schlei> (Accessed: 18 April 2023).
- Nawaly, H., Tsuji, Y., Matsuda, Y. (2020): Rapid and Precise Genome Editing in a Marine Diatom, *Thalassiosira Pseudonana* by Cas9 Nickase (D10A). *Algal Research* 47 (May), 101855. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101855>.
- Nebbak, A. et al. (2018) 'Field application of MALDI-TOF MS on mosquito larvae identification', *Parasitology*, 145(5), pp. 677–687. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0031182017001354>.
- Nebbak, A. and Almeras, L. (2020) 'Identification of Aedes mosquitoes by MALDI-TOF MS biotyping using protein signatures from larval and pupal exuviae', *Parasites & Vectors*, 13(1), p. 161. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04029-x>.
- Needs, S.H., Osborn, H.M.I., Edwards, A.D., 2021. Counting bacteria in microfluidic devices: Smartphone compatible 'dip-and-test' viable cell quantitation using resazurin amplified detection in microliter capillary arrays. *J. Microbiol. Methods* 187, 106199. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106199>
- Nelson, J.S. (2016), *Fishes of the World*, Vol. 5, John Wiley & Sons.
- Ng, I-S., Keskin, B. B., Tan, S.-I (2020): A Critical Review of Genome Editing and Synthetic Biology Applications in Metabolic Engineering of Microalgae and Cyanobacteria. *Biotechnology Journal* 15 (8), 1900228. <https://doi.org/10.1002/biot.201900228>.
- Nguyen, P.L. et al. (2018) 'Rapid Detection and Monitoring of *Flavobacterium psychrophilum* in Water by Using a Handheld, Field-Portable Quantitative PCR System', *Journal of Aquatic Animal Health*, 30(4), pp. 302–311. Available at: <https://doi.org/10.1002/aah.10046>.
- Nguyen, T. H. T., Park, S., Jeong, J., Shin, Y. S., Sim, S. J., Jin, E. (2020): Enhancing Lipid Productivity by Modulating Lipid Catabolism Using the CRISPR-Cas9 System in *Chlamydomonas*. *Journal of Applied Phycology* 32 (5), 2829–40. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02172-7>.
- Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz and Universitätsklinikums Bonn (2019) Abschlussbericht Niedersächsisches Sondermessprogramm zum Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien und von Antibiotikarückständen in niedersächsischen Kläranlagen und Oberflächengewässern.
- Niedersächsisches Ministerium für Umwelt, Energie und Klimaschutz (2023) Gewässerüberwachungssystem (GÜN) | Nds. Ministerium für Umwelt, Energie und Klimaschutz. Available at: https://www.umwelt.niedersachsen.de/startseite/themen/wasser/flusse_bache_seen/gewasser-uberwachungssystem_gun/guen-105475.html (Accessed: 17 April 2023).

- Nievergelt, A. P., Diener, D. R., Bogdanova, A., Pigino, G. (2022): Efficient Precision Genome Editing of *Chlamydomonas reinhardtii* with CRISPR/Cas. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.07.24.501283>.
- Nomura, T., Inoue, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Yamada, K., Iwata, O., Suzuki, K., Mochida, K. (2019): Highly Efficient Transgene-free Targeted Mutagenesis and Single-stranded Oligodeoxynukleotide-mediated Precise Knock-in in the Industrial Microalga *Euglena Gracilis* Using Cas9 Ribonukleoproteins. Plant Biotechnology Journal 17 (11), 2032–34. <https://doi.org/10.1111/pbi.13174>.
- Nurika, I., Shabrina, E. N., Azizah, N., Suhartini, S., Bugg, T. D. H., Barker, G. C. (2022): Application of ligninolytic bacteria to the enhancement of lignocellulose breakdown and methane production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). Bioresour. Technol. Rep. 17, 100951. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100951>
- Nweke, E. E., Thimiri Govinda Raj, D. B. (2021): Development of insect cell line using CRISPR technology, in: Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier, pp. 1–20. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.003>
- Obruča, S., Dvořák, P., Sedláček, P., Koller, M., Sedlář, K., Pernicová, I., Šafránek, D. (2022): Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. Biotechnol. Adv. 58, 107906. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107906>
- Offenbaume, K.L., Bertone, E., Stewart, R.A., 2020. Monitoring Approaches for Faecal Indicator Bacteria in Water: Visioning a Remote Real-Time Sensor for E. coli and Enterococci. Water 12, 2591. <https://doi.org/10.3390/w12092591>
- Öffentlichkeitsarbeit, R.K. und (2023) Chemische und physikalische Gewässergütedaten - LUIS - Landwirtschaft- und Umweltinformationssystem für Geodaten - sachsen.de. Available at: <https://luis.sachsen.de/fachbereich-wasser-gewaesserguetedaten.html> (Accessed: 18 April 2023).
- Okano, K., Sato, Y., Hizume, T., Honda, K. (2021): Genome editing by miniature CRISPR/Cas12f1 enzyme in *Escherichia coli*. J. Biosci. Bioeng. 132, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.04.009>
- Okoli, A.S., Blix, T., Myhr, A.I., Xu, W., Xu, X., 2022. Sustainable use of CRISPR/Cas in fish aquaculture: the biosafety perspective. Transgenic Res. 31, 1–21. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00274-7>
- Olkeba, B.K., Goethals, P.L.M., Boets, P., Duchateau, L., Degefa, T., Eba, K., Yewhalaw, D., Mereta, S.T., 2021. Mesocosm Experiments to Quantify Predation of Mosquito Larvae by Aquatic Predators to Determine Potential of Ecological Control of Malaria Vectors in Ethiopia. Int. J. Environ. Res. Public Health 18, 6904. <https://doi.org/10.3390/ijerph18136904>
- Ong, S.-Q., Ahmad, H., Nair, G., Isawasan, P., Majid, A.H.A., 2021. Implementation of a deep learning model for automated classification of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse) in real time. Sci. Rep. 11, 9908. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89365-3>
- Orenstein, E.C., Ratelle, D., Briseño-Avena, C., Carter, M.L., Franks, P.J.S., Jaffe, J.S., Roberts, P.L.D., 2020. The Scripps Plankton Camera system: A framework and platform for in situ microscopy. Limnol. Oceanogr. Methods 18, 681–695. <https://doi.org/10.1002/lom3.10394>
- Ortega-E. J. A., Jasper, R., Miller, S. M. (2019): CRISPR/Cas9 Mutagenesis in *Volvox Carteri*.” The Plant Journal 97 (4), 661–72. <https://doi.org/10.1111/tpj.14149>.
- Palmer, M., Álvarez-Ellacuría, A., Moltó, V., Catalán, I.A., 2022. Automatic, operational, high-resolution monitoring of fish length and catch numbers from landings using deep learning. Fish. Res. 246, 106166. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106166>
- Pandey, S., Park, Y., Ankita, A., Phillips, G.J., 2021. Scan4CFU: Low-cost, open-source bacterial colony tracking over large areas and extended incubation times. HardwareX 10, e00249. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2021.e00249>

- Papenfus, M., Schaeffer, B., Pollard, A.I., Loftin, K., 2020. Exploring the potential value of satellite remote sensing to monitor chlorophyll-a for US lakes and reservoirs. *Environ. Monit. Assess.* 192, 808. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08631-5>
- Park, M. et al. (2018) 'Monitoring the seasonal dynamics of microalgae in the South Sea of Korea by use of a cytochrome c oxidase I DNA barcode', *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 21(1), pp. 10–18. Available at: <https://doi.org/10.1080/14634988.2018.1432942>.
- Park, R. V., Asbury, H., Miller, S. M. (2020): Modification of a *Chlamydomonas reinhardtii* CRISPR/Cas9 Transformation Protocol for Use with Widely Available Electroporation Equipment. *MethodsX* 7, 100855. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100855>.
- Park, J., Kim, D.I., Choi, B., Kang, W., Kwon, H.W., 2020. Classification and Morphological Analysis of Vector Mosquitoes using Deep Convolutional Neural Networks. *Sci. Rep.* 10, 1012. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57875-1>
- Parretti, P., Monteiro, J.G., Gizzi, F., Martínez-Escarriaza, R., Alves, F., Chebaane, S., Almeida, S., Pessanha Pais, M., Almada, F., Fernandez, M., Nogueira, N., Andrade, C., Canning-Clode, J., 2023. Citizen Science and Expert Judgement: A Cost-Efficient Combination to Monitor and Assess the Invasiveness of Non-Indigenous Fish Escapees. *J. Mar. Sci. Eng.* 11, 438. <https://doi.org/10.3390/jmse11020438>
- Pastore, V.P., Zimmerman, T.G., Biswas, S.K., Bianco, S., 2020. Annotation-free learning of plankton for classification and anomaly detection. *Sci. Rep.* 10, 12142. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68662-3>
- Pataki, B.A., Garriga, J., Eritja, R., Palmer, J.R.B., Bartumeus, F., Csabai, I., 2021. Deep learning identification for citizen science surveillance of tiger mosquitoes. *Sci. Rep.* 11, 4718. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83657-4>
- Patterson, E. I., Villinger, J., Muthoni, J. N., Dobel-Ober, L., Hughes, G. L. (2020): Exploiting insect-specific viruses as a novel strategy to control vector-borne disease. *Curr. Opin. Insect Sci.* 39, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.02.005>
- Pavelin, J., Jin, Y.H., Gratacap, R.L., Taggart, J.B., Hamilton, A., Verner-Jeffreys, D.W., Paley, R.K., et al. (2021), "The nedd-8 activating enzyme gene underlies genetic resistance to infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon", *Genomics*, Vol. 113 No. 6, pp. 3842–3850, doi: 10.1016/j.ygeno.2021.09.012.
- Pawlowski, J. et al. (2022) 'Environmental DNA metabarcoding for benthic monitoring: A review of sediment sampling and DNA extraction methods', *Science of The Total Environment*, 818, p. 151783. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151783>.
- Pedro, P.M. et al. (2021) 'Efficient Monitoring of Adult and Immature Mosquitoes Through Metabarcoding of Bulk Samples: A Case Study for Non-Model Culicids With Unique Ecologies', *Journal of Medical Entomology*, 58(3), pp. 1210–1218. Available at: <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa267>.
- Pérez-Belmont, P., Alvarado, J., Vázquez-Salvador, N., Rodríguez, E., Valiente, E., Díaz, J., 2019. Water quality monitoring in the Xochimilco peri-urban wetland: experiences engaging in citizen science. *Freshw. Sci.* 38, 342–351. <https://doi.org/10.1086/703395>
- Pernat, N., Kampen, H., Jeschke, J.M., Werner, D., 2021a. Citizen science versus professional data collection: Comparison of approaches to mosquito monitoring in Germany. *J. Appl. Ecol.* 58, 214–223. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13767>
- Pernat, N., Kampen, H., Jeschke, J.M., Werner, D., 2021b. Buzzing Homes: Using Citizen Science Data to Explore the Effects of Urbanization on Indoor Mosquito Communities. *Insects* 12, 374. <https://doi.org/10.3390/insects12050374>

- Pernat, N., Kampen, H., Ruland, F., Jeschke, J.M., Werner, D., 2021c. Drivers of spatio-temporal variation in mosquito submissions to the citizen science project 'Mückenatlas.' *Sci. Rep.* 11, 1356. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80365-3>
- Pernat, N., Zscheischler, J., Kampen, H., Ostermann-Miyashita, E.-F., Jeschke, J.M., Werner, D., 2022. How media presence triggers participation in citizen science—The case of the mosquito monitoring project 'Mückenatlas'. *PLOS ONE* 17, e0262850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262850>
- Peterson, R.K.D., Rolston, M.G., 2022. Larval mosquito management and risk to aquatic ecosystems: A comparative approach including current tactics and gene-drive *Anopheles* techniques. *Transgenic Res.* 31, 489–504. <https://doi.org/10.1007/s11248-022-00315-9>
- Picariello, T., Hou, Y., Kubo, T., McNeill, N. A., Yanagisawa, H.-A., Oda, T., Witman, G. B. (2020): TIM, a Targeted Insertional Mutagenesis Method Utilizing CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* 15 (5), e0232594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232594>.
- Pinar-Méndez, A. et al. (2022) 'Monitoring Bacterial Community Dynamics in a Drinking Water Treatment Plant: An Integrative Approach Using Metabarcoding and Microbial Indicators in Large Water Volumes', *Water*, 14(9), p. 1435. Available at: <https://doi.org/10.3390/w14091435>.
- Pisithkul, T., Schroeder, J.W., Trujillo, E.A., Yeesin, P., Stevenson, D.M., Chaiamarit, T., Coon, J.J., Wang, J.D., Amador-Noguez, D., 2019. Metabolic Remodeling during Biofilm Development of *Bacillus subtilis*. *mBio* 10, e00623-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00623-19>
- Pole, A., Srivastava, A., Zakeel, M.C.M., Sharma, V. K., Suyal, D. C., Singh, A. K., Soni, R. (2022): Role of microbial biotechnology for strain improvement for agricultural sustainability, in: *Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy*. Elsevier, pp. 285–317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91595-3.00001-X>
- Poliner, E., Farré, E. M., Benning, C. (2018): Advanced Genetic Tools Enable Synthetic Biology in the Oleaginous Microalgae *Nannochloropsis* Sp. *Plant Cell Reports* 37 (10), 1383–99. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2270-0>.
- Poliner, E., Takeuchi, T., Du, Z.-Y., Benning, C., Farré, E. M. (2019): Non-Transgenic Marker-Free Gene Disruption by an Episomal CRISPR System in the Oleaginous Microalga, *Nannochloropsis Oceanica* CCMP1779. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 99 (1), 112–27. <https://doi.org/10.1111/tpj.14314>.
- Pondeville, E., Puchot, N., Parvy, J.-P., Carissimo, G., Poidevin, M., Waterhouse, R. M., Marois, E., Bourgouin, C. (2020): Hemocyte-targeted gene expression in the female malaria mosquito using the hemolectin promoter from *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 120, 103339. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103339>
- Pont, D. et al. (2023) 'Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR', *Molecular Ecology Resources*, 23(2), pp. 396–409. Available at: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13715>.
- Popović, N.T. et al. (2017) 'Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS', *Environmental Research*, 152, pp. 7–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.020>.
- Porretta, D., Fotakis, E. A., Mastrantonio, V., Chaskopoulou, A., Michaelakis, A., Kioulos, I., Weill, M., Urbanelli, S., Vontas, J., Bellini, R. (2019): Focal distribution of diflubenzuron resistance mutations in *Culex pipiens* mosquitoes from Northern Italy. *Acta Trop.* 193, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.024>
- Pu, F., Ding, C., Chao, Z., Yu, Y., Xu, X., 2019. Water-Quality Classification of Inland Lakes Using Landsat8 Images by Convolutional Neural Networks. *Remote Sens.* 11, 1674. <https://doi.org/10.3390/rs11141674>

- Pugliese, L. et al. (2017) 'A high resolution melting method for the molecular identification of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia* spp. in the Mediterranean Sea', *Scientific Reports*, 7(1), p. 4259. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04245-z>.
- Qi, G., Yu, N., Xu, K., Xie, X., Mao, Y., Chen, X., Ran, X., et al. (2020), "Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) Bcl-xl: transcriptional regulation and anti-apoptosis analysis", *Fish Physiology and Biochemistry*, Vol. 46 No. 2, pp. 483–500, doi: 10.1007/s10695-019-00668-9.
- QIAGEN GmbH - Germany (2023) dPCR vs. qPCR – QIAGEN. Available at: <http://www.qiagen.com/de/applications/digital-pcr/beginners/dpcr-vs-qpcr> (Accessed: 29 August 2023).
- Qin, Q., Ling, C., Zhao, Y., Yang, T., Yin, J., Guo, Y., Chen, G. Q. (2018): CRISPR/Cas9 editing genome of extremophile *Halomonas* spp. *Metab. Eng.* 47, 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.018>
- Qin, Z., Yu, S., Liu, L., Wang, L., Chen, J., Zhou, J. (2021): A SacB-based system for diverse and multiple genome editing in *Gluconobacter oxydans*. *J. Biotechnol.* 338, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.07.004>
- Rafei, R. et al. (2018) 'Distribution and antibiotic susceptibility profiles of *Aeromonas* spp. from different aquatic environments in north Lebanon', *Journal of infection in developing countries*, 12(2.1), p. 6S. Available at: <https://doi.org/10.3855/jidc.10055>.
- Raji, J. I., Melo, N., Castillo, J. S., Gonzalez, S., Saldana, V., Stensmyr, M. C., DeGennaro, M. (2019): *Aedes aegypti* Mosquitoes Detect Acidic Volatiles Found in Human Odor Using the IR8a Pathway. *Curr. Biol.* 29, 1253-1262.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.045>
- Ramesh, K., Walvekar, V.A., Wong, B., Sayed, A. M. M., Missé, D., Kini, R. M., Mok, Y. K., Pompon, J. (2019): Increased Mosquito Midgut Infection by Dengue Virus Recruitment of Plasmin Is Blocked by an Endogenous Kazal-type Inhibitor. *iScience* 21, 564–576. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.056>
- Ranian, K., Kashif Zahoor, M., Zulhussnain, M., Ahmad, A. (2022): CRISPR/Cas9 mediated sex-ratio distortion by sex specific gene editing in *Aedes aegypti*. *Saudi J. Biol. Sci.* 29, 3015–3022. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.034>
- Ranjbar, S., Malcata, F. X. (2022): Challenges and Prospects for Sustainable Microalga-Based Oil: A Comprehensive Review, with a Focus on Metabolic and Genetic Engineering. *Fuel* 324 (September), 124567. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124567>.
- Rao, Y., Wan, Q., Su, H., Xiao, X., Liao, Z., Ji, J., Yang, C., et al. (2018), "ROS-induced HSP70 promotes cytoplasmic translocation of high-mobility group box 1b and stimulates antiviral autophagy in grass carp kidney cells", *Journal of Biological Chemistry*, Elsevier, Vol. 293 No. 45, pp. 17387–17401, doi: 10.1074/jbc.RA118.003840.
- Rao, Y., Wan, Q., Yang, C. and Su, J. (2017), "Grass Carp Laboratory of Genetics and Physiology 2 Serves As a Negative Regulator in Retinoic Acid-Inducible Gene I- and Melanoma Differentiation-Associated Gene 5-Mediated Antiviral Signaling in Resting State and Early Stage of Grass Carp Reovirus Infection", *Frontiers in Immunology*, Vol. 8, doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00352>.
- Rato, C., Carvalho, M.F., Azevedo, C., Oblessuc, P.R., 2021. Genome editing for resistance against plant pests and pathogens. *Transgenic Res.* 30, 427–459. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00262-x>
- Regierungspräsidien Baden-Württemberg (2022) Grundwassermonitoring - Regierungspräsidien Baden-Württemberg. Available at: <https://rp.baden-wuerttemberg.de/themen/wasserboden/grundwasser/seiten/grundwassermonitoring/> (Accessed: 18 April 2023).
- Regionales Wasserressourcen-Management für den nachhaltigen Gewässerschutz in Deutschland (2023a) 'NaWaM-ReWaM | GroundCare'. Available at: <https://bmbf.nawam-rewam.de/projekt/groundcare/> (Accessed: 19 April 2023).

- Regionales Wasserressourcen-Management für den nachhaltigen Gewässerschutz in Deutschland (2023b) 'NaWaM-ReWaM | MUTReWa'. Available at: <https://bmbf.nawam-rewam.de/projekt/mutrewa/> (Accessed: 19 April 2023).
- Riaz, M. A., Adang, M. J., Hua, G., Rezende, T. M. T., Rezende, A. M., Shen, G.-M. (2020): Identification of *Lysinibacillus sphaericus* Binary toxin binding proteins in a malarial mosquito cell line by proteomics: A novel approach towards improving mosquito control. J. Proteomics 227, 103918. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103918>
- Rojo, D. et al. (2020) 'High-resolution melting analysis for identification of microalgae species', Journal of Applied Phycology, 32(6), pp. 3901–3911. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02240-y>.
- Romeis, J., Collatz, J., Glandorf, D. C. M., Bonsall, M. B. (2020): The value of existing regulatory frameworks for the environmental risk assessment of agricultural pest control using gene drives. Environ. Sci. Policy 108, 19–36. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2020.02.016>
- Rono, M. K., Muturi, C. N., Ochieng, R., Mwakubabanya, R., Wachira, F. N., Mwangangi, J., Kinyanjui, S., Njunge, J., Mireji, P. O. (2019): Cadmium tolerance pathway in *Anopheles gambiae sensu stricto*. Acta Trop. 198, 105033. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.024>
- Rossel, S. et al. (2021) 'Rapid species level identification of fish eggs by proteome fingerprinting using MALDI-TOF MS', Journal of Proteomics, 231, p. 103993. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103993>.
- Rossi, G.J., Power, M.E., Carlson, S.M., Grantham, T.E., 2022. Seasonal growth potential of *Onchorhynchus mykiss* in streams with contrasting prey phenology and streamflow. Ecosphere 13. <https://doi.org/10.1002/ecs2.4211>
- Roux, O., Renault, D., Mouline, K., Diabaté, A., Simard, F., 2021. Living with predators at the larval stage has differential long-lasting effects on adult life history and physiological traits in two anopheline mosquito species. J. Insect Physiol. 131, 104234. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104234>
- Rozen-Gagnon, K., Gu, M., Luna, J. M., Luo, J.-D., Yi, S., Novack, S., Jacobson, E., Wang, W., Paul, M. R., Scheel, T. K. H., Carroll, T., Rice, C. M. (2021): Argonaute-CLIP delineates versatile, functional RNAi networks in *Aedes aegypti*, a major vector of human viruses. Cell Host Microbe 29, 834-848.e13. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.004>
- Russo, M. T., Cigliano, R. A., Sanseverino, W., Ferrante, M. I. (2018): Assessment of Genomic Changes in a CRISPR/Cas9 *Phaeodactylum Tricornutum* Mutant through Whole Genome Resequencing. PeerJ 6 (October), e5507. <https://doi.org/10.7717/peerj.5507>.
- Rycroft, T., Hamilton, K., Linkov, I. (2019): A quantitative risk assessment method for synthetic biology products in the environment. Sci. Total Environ. 696, 133940.
- Ryu, A. J. (2020): Engineering of *Nannochloropsis Salina* for Enhanced Lipid Biosynthesis by High-Throughput Screening and Genome Editing. <https://koasas.kaist.ac.kr/handle/10203/284105>.
- Ryu, A. J., Jeong, B.-r., Kang, N. K., Jeon, S., Sohn, M. G., Yun, Lim, H. J. M., et al. (2021): Safe-Harboring Based Novel Genetic Toolkit for *Nannochloropsis Salina* CCMP1776: Efficient Overexpression of Transgene via CRISPR/Cas9-Mediated Knock-in at the Transcriptional Hotspot. Bioresource Technology 340 (November), 125676. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125676>.
- Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (2022) Messnetze - Landeshochwasserzentrum - sachsen.de. Available at: <https://www.hochwasserzentrum.sachsen.de/umwelt/info-systeme/lhwz/messnetze.html> (Accessed: 18 April 2023).
- Sächsisches Staatsministerium für Energie, Klimaschutz, Umwelt und Landwirtschaft (2023) Landesmessnetz Grundwasser - Wasser - sachsen.de. Available at: <https://www.wasser.sachsen.de/grundwassermessnetze.html> (Accessed: 18 April 2023).

- Samuel, M. D., Liao, W., Atkinson, C. T., LaPointe, D. A. (2020): Facilitated adaptation for conservation – Can gene editing save Hawaii’s endangered birds from climate driven avian malaria? *Biol. Conserv.* 241, 108390. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108390>
- Sánchez C., H.M., Wu, S.L., Bennett, J.B., Marshall, J.M., 2020. MGD RIV E: A modular simulation framework for the spread of gene drives through spatially explicit mosquito populations. *Methods Ecol. Evol.* 11, 229–239. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13318>
- Sarais, F., Kummerow, S., Montero, R., Rebl, H., Köllner, B., Goldammer, T., Collet, B., et al. (2021), “PIAS Factors from Rainbow Trout Control NF- κ B- and STAT-Dependent Gene Expression”, *International Journal of Molecular Sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 22 No. 23, p. 12815, doi: 10.3390/ijms222312815.
- Saurabh, S., Prasad, D. (2021): Targeted genome engineering for insects control, in: *CRISPR and RNAi Systems*. Elsevier, pp. 15–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821910-2.00007-2>
- Sawaya, K., 2003. Extending satellite remote sensing to local scales: land and water resource monitoring using high-resolution imagery. *Remote Sens. Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.rse.2003.04.0006>
- Schoen, L. (2016) Steckbriefe zu den Flussgebietseinheiten, Umweltbundesamt. Umweltbundesamt. Available at: <https://www.umweltbundesamt.de/steckbriefe-zu-den-flussgebietseinheiten> (Accessed: 13 March 2024).
- Schoener, E., Zittra, C., Weiss, S., Walder, G., Barogh, B.S., Weiler, S., Fuehrer, H.-P., 2019. Monitoring of alien mosquitoes of the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) in Austria. *Parasitol. Res.* 118, 1633–1638. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06287-w>
- Schowalter, T. D. (2022): Managing insect populations, in: *Insect Ecology*. Elsevier, pp. 799–849. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85673-7.00005-8>
- Schultz, M. J., Frydman, H. M., Connor, J. H. (2018): Dual Insect specific virus infection limits Arbovirus replication in *Aedes mosquito* cells. *Virology* 518, 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.022>
- Sebastiá-Frasquet, M.-T., Aguilar-Maldonado, J.-A., Herrero-Durá, I., Santamaría-del-Ángel, E., Morell-Monzó, S., Estornell, J., 2020. Advances in the Monitoring of Algal Blooms by Remote Sensing: A Bibliometric Analysis. *Appl. Sci.* 10, 7877. <https://doi.org/10.3390/app10217877>
- Seegers, B.N., Werdell, P.J., Vandermeulen, R.A., Salls, W., Stumpf, R.P., Schaeffer, B.A., Owens, T.J., Bailey, S.W., Scott, J.P., Loftin, K.A., 2021. Satellites for long-term monitoring of inland U.S. lakes: The MERIS time series and application for chlorophyll-a. *Remote Sens. Environ.* 266, 112685. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2021.112685>
- Semple, S.L. and Dixon, B. (2020), “Salmonid Antibacterial Immunity: An Aquaculture Perspective”, *Biology*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 9 No. 10, p. 331, doi: 10.3390/biology9100331.
- Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz (2021a) Biologische Gewässergüte. Available at: <https://www.berlin.de/sen/uvk/umwelt/wasser-und-geologie/oberflaechengewaesser/biologische-gewaesserguete/> (Accessed: 17 April 2023).
- Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz (2021b) Chemisch-physikalische Gewässergüte. Available at: <https://www.berlin.de/sen/uvk/umwelt/wasser-und-geologie/oberflaechengewaesser/chemisch-physikalische-gewaesserguete/> (Accessed: 17 April 2023).
- Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz (2021c) Monitoring Oberflächenwassergüte. Available at: <https://www.berlin.de/sen/uvk/umwelt/wasser-und-geologie/oberflaechengewaesser/monitoring-wasserguete/> (Accessed: 17 April 2023).

- Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz (2022a) Maßnahmen: Spree- und Havel-Wasserstraßen. Available at: <https://www.berlin.de/sen/uvk/umwelt/wasser-und-geologie/europaeische-wasserrahmenrichtlinie/berlin/spree-havel/> (Accessed: 17 April 2023).
- Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz (2022b) Monitoring Grundwassergüte. Available at: <https://www.berlin.de/sen/uvk/umwelt/wasser-und-geologie/grundwasser/monitoring-grundwasserguete/> (Accessed: 17 April 2023).
- Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz (2022c) Überwachung der Grundwassergüte. Available at: <https://www.berlin.de/sen/uvk/umwelt/wasser-und-geologie/grundwasser/grundwasserguete/> (Accessed: 17 April 2023).
- Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz (2023a) Wasserportal Gewässerkundliche Messdaten. Available at: <https://wasserportal.berlin.de/start.php> (Accessed: 17 April 2023).
- Senatsverwaltung für Umwelt, Mobilität, Verbraucher- und Klimaschutz (2023b) Wasserstände und Abflüsse. Available at: <https://www.berlin.de/sen/uvk/umwelt/wasser-und-geologie/oberflaechengewaesser/wasserstaende-und-abfluesse/> (Accessed: 17 April 2023).
- Seok, J. Y., Han, Y. H., Yang, J.-S., Yang, J., Lim, H. G., Kim, S. G., Seo, S. W., Jung, G. Y. (2021): Synthetic biosensor accelerates evolution by rewiring carbon metabolism toward a specific metabolite. *Cell Rep.* 36, 109589. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109589>
- Serif, M., Lepetit, B., Weißert, K., Kroth, P. G., Bartulos, C. R. (2017): A Fast and Reliable Strategy to Generate TALEN-Mediated Gene Knockouts in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Algal Research* 23 (April), 186–95. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.005>.
- Serif, M., Dubois, G., Finoux, A.-L., Teste, M.-A., Jallet, D., Daboussi, F. (2018): One-Step Generation of Multiple Gene Knock-Outs in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* by DNA-Free Genome Editing. *Nature Communications* 9 (1), 3924. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06378-9>.
- Shahi, N., Mallik, S.K. and Sarma, D. (2022), “Muscle growth in targeted knockout common carp (*Cyprinus carpio*) mstn gene with low off-target effects”, *Aquaculture*, Vol. 547, p. 737423, doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737423.
- Sharma, A. K., Mühlroth, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Alipanah, L., Kissen, R., Brembu, T., Bones, A., Winge, P. (2020): The Myb-like Transcription Factor Phosphorus Starvation Response (PtPSR) Controls Conditional P Acquisition and Remodeling in Marine Microalgae. *New Phytologist* 225, 2380–95. <https://doi.org/10.1111/nph.16248>.
- Shuchman, R.A., Sayers, M.J., Brooks, C.N., 2013. Mapping and monitoring the extent of submerged aquatic vegetation in the Laurentian Great Lakes with multi-scale satellite remote sensing. *J. Gt. Lakes Res.* 39, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2013.05.006>
- Sidstedt, M., Rådström, P. and Hedman, J. (2020) ‘PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(9), pp. 2009–2023. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>.
- Skaftnesmo, K.O., Crespo, D., Kleppe, L., Andersson, E., Edvardsen, R.B., Norberg, B., Fjellidal, P.G., et al. (2021), “Loss of *stra8* Increases Germ Cell Apoptosis but Is Still Compatible With Sperm Production in Atlantic Salmon (*Salmo salar*)”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 9, doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.657192>.
- Silva, C.S., Aires, R., Rodrigues, F., 2020. Automatic fish measurement using a camera and a 3D sensor applied to a long-term experiment. *ICES J. Mar. Sci.* 77, 3050–3057. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsaa190>

- Simoni, A., Hammond, A.M., Beaghton, A.K., Galizi, R., Taxiarchi, C., Kyrou, K., Meacci, D., Gribble, M., Morselli, G., Burt, A., Nolan, T., Crisanti, A., 2020. A male-biased sex-distorter gene drive for the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *Nat. Biotechnol.* 38, 1054–1060. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0508-1>
- Singh, P., Mazumdar, P. (2022): Microbial pesticides, in: *Biopesticides*. Elsevier, pp. 37–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00023-7>
- Sizova, I., Kelterborn, S., Verbenko, V., Kateriya, S., Hegemann, P. (2021): *Chlamydomonas* POLQ Is Necessary for CRISPR/Cas9-Mediated Gene Targeting. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 11 (7), jkab114. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab114>.
- Slattery, S. S., Diamond, A., Wang, H., Therrien, J. A., Lant, J. T., Jazey, T., Lee, K. et al. (2018): An Expanded Plasmid-Based Genetic Toolbox Enables Cas9 Genome Editing and Stable Maintenance of Synthetic Pathways in *Phaeodactylum Tricornutum*. *ACS Synthetic Biology* 7 (2), 328–38. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00191>.
- Smidler, A.L., Pai, J.J., Apte, R.A., Sánchez C., H.M., Corder, R.M., Gutiérrez, E.J., Thakre, N., Antoshechkin, I., Marshall, J.M., Akbari, O.S., 2022. A confinable female-lethal population suppression system in the malaria vector, *Anopheles gambiae* (preprint). *Bioengineering*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.30.505861>
- Smith, B.L. et al. (2023) ‘High-throughput identification of tuna (*Thunnus* spp.) larvae in the Gulf of Mexico using unlabelled-probe high-resolution melting analysis’, *Journal of Fish Biology*, 102(6), pp. 1425–1433. Available at: <https://doi.org/10.1111/jfb.15391>.
- Sokolova, M., Thompson, F., Mariani, P., Krag, L.A., 2021. Towards sustainable demersal fisheries: Nep-Con image acquisition system for automatic *Nephrops norvegicus* detection. *PLOS ONE* 16, e0252824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252824>
- Sollweck, K. et al. (2021) ‘A Chip-Based Colony Fusion Recombinase Polymerase Amplification Assay for Monitoring of Antimicrobial Resistance Genes and Their Carrying Species in Surface Water’, *ACS ES&T Water*, 1(3), pp. 584–594. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsestwater.0c00110>.
- Song, F., Wang, L., Yu, Z., Zhu, W., Fu, J. and Dong, Z. (2021a), “Knockdown of *igf3* gene by RNA interference causes gonadal development inhibition of common carp (*Cyprinus carpio*)”, *Aquaculture Research*, Vol. 52 No. 7, pp. 3006–3014, doi: 10.1111/are.15145.
- Song, F., Wang, L., Zhu, W. and Dong, Z. (2019), “Long noncoding RNA and mRNA expression profiles following *igf3* knockdown in common carp, *Cyprinus carpio*”, *Scientific Data*, Nature Publishing Group, Vol. 6 No. 1, p. 190024, doi: 10.1038/sdata.2019.24.
- Song, I., Kim, J., Baek, K., Choi, Y., Shin, B., Jin, E. (2020): The Generation of Metabolic Changes for the Production of High-Purity Zeaxanthin Mediated by CRISPR-Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbial Cell Factories* 19 (1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01480-4>.
- Song, X., Liu, L., Liu, X.-X., Xiong, Z.-Q., Xie, C.-L., Wang, S.-J., Ai, L.-Z. (2021b): Single-plasmid systems based on CRISPR-Cas9 for gene editing in *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Sci.* 104, 10576–10585. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19901>
- Song, I., Kim, S., Kim, J., Oh, H., Jang, J., Jeong, J., Baek, K., Shin, W.-S., Sim, S. J., Jin, E. (2022): Macular Pigment-Enriched Oil Production from Genome-Edited Microalgae. *Microbial Cell Factories* 21 (1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01736-7>.
- Southern, S. J., Oyston, P. C. F. (2020): Genome editing of *Francisella tularensis* using (CRISPR-Cas9). *J. Microbiol. Methods* 176, 106004. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106004>
- Sousa, L.B., Craig, A., Chitkara, U., Fricker, S., Webb, C., Williams, C., Baldock, K., 2022. Methodological Diversity in Citizen Science Mosquito Surveillance: A Scoping Review. *Citiz. Sci. Theory Pract.* 7, 8. <https://doi.org/10.5334/cstp.469>

- Spielmann, G. et al. (2019) 'Using loop-mediated isothermal amplification for fast species delimitation in eels (genus *Anguilla*), with special reference to the European eel (*Anguilla anguilla*)', *Food Control*, 101, pp. 156–162. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.022>.
- Srivastava, A., Kalwani, M., Chakdar, H., Pabbi, S., Shukla, P. (2022): Biosynthesis and Biotechnological Interventions for Commercial Production of Microalgal Pigments: A Review. *Bioresource Technology* 352 (May), 127071. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127071>.
- Stoeck, T. et al. (2018) 'Environmental DNA metabarcoding of benthic bacterial communities indicates the benthic footprint of salmon aquaculture', *Marine Pollution Bulletin*, 127, pp. 139–149. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.065>.
- Straume, A.H., Kjærner-Semb, E., Ove Skaftnesmo, K., Güralp, H., Kleppe, L., Wargelius, A. and Edvardsen, R.B. (2020), "Indel locations are determined by template polarity in highly efficient in vivo CRISPR/Cas9-mediated HDR in Atlantic salmon", *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, Vol. 10 No. 1, p. 409, doi: 10.1038/s41598-019-57295-w.
- Straume, A.H., Kjærner-Semb, E., Skaftnesmo, K.O., Güralp, H., Lillico, S., Wargelius, A. and Edvardsen, R.B. (2021a), "A refinement to gene editing in Atlantic salmon using asymmetrical oligonucleotide donors", *bioRxiv*, 9 February, doi: 10.1101/2021.02.08.430296.
- Straume, A.H., Kjærner-Semb, E., Skaftnesmo, K.O., Güralp, H., Lillico, S., Wargelius, A. and Edvardsen, R.B. (2021b), "Single nucleotide replacement in the Atlantic salmon genome using CRISPR/Cas9 and asymmetrical oligonucleotide donors", *BMC Genomics*, Vol. 22 No. 1, p. 563, doi: 10.1186/s12864-021-07823-8.
- Stukenberg, D., Zauner, S., Dell'Aquila, G., Maier, U. G. (2018): Optimizing CRISPR/Cas9 for the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Frontiers in Plant Science* 9, <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00740>.
- Stundl, J., Soukup, V., Franek, R., Pospisilova, A., Psutkova, V., Penika, M., Cerny, R., et al. (2022), "Efficient CRISPR Mutagenesis in Sturgeon Demonstrates Its Utility in Large, Slow-Maturing Vertebrates", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 10, doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.750833>.
- Suandi, D., Wijaya, K. P., Amadi, M., Ganegoda, N. C., Kusdiantara, R., Sidarto, K. A., Syafruddin, D., Soewono, E. (2022): An evolutionary model propounding *Anopheles* double resistance against insecticides. *Appl. Math. Model.* 106, 463–481. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2022.01.025>
- Suandi, D., Wijaya, K. P., Apri, M., Sidarto, K.A., Syafruddin, D., Gtz, T., Soewono, E. (2019): A one-locus model describing the evolutionary dynamics of resistance against insecticide in *Anopheles* mosquitoes. *Appl. Math. Comput.* 359, 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.amc.2019.03.031>
- Sun, H., Liu, F., Ye, Z., Baker, A., Zwiebel, L. J. (2020a): Mutagenesis of the orco odorant receptor co-receptor impairs olfactory function in the malaria vector *Anopheles coluzzii*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 127, 103497. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103497>
- Sun, J., Li, J., Li, Y., Du, J., Zhao, N., Mai, K. and Ai, Q. (2022a), "Regulation of $\Delta 6$ Fads2 Gene Involved in LC-PUFA Biosynthesis Subjected to Fatty Acid in Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Biomolecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 12 No. 5, p. 659, doi: 10.3390/biom12050659.
- Sun, S., Ren, T., Li, X., Cao, X. and Gao, J. (2020b), "Polyunsaturated fatty acids synthesized by freshwater fish: A new insight to the roles of elovl2 and elovl5 in vivo", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 532 No. 3, pp. 414–419, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.08.074.
- Sun, T., Song, J., Wang, M., Zhao, C., Zhang, W. (2022b): Challenges and recent progress in the governance of biosecurity risks in the era of synthetic biology. *J. Biosaf. Biosecurity* 4, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2022.02.002>

- Sun, Y.-J. et al. (2019) 'Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for the parallel detection of harmful algal bloom-forming species distributed along the Chinese coast', *Harmful Algae*, 84, pp. 36–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.02.008>.
- Sundaray, J.K., Hussan, A., Das, I.I., 2022. Aquatic Invasive Species: Traditional Control Options to Emerging Genetic Bio-control Strategies. *J. Indian Soc. Coast. Agric. Res.* 40, 1–25. <https://doi.org/10.54894/JISCAR.40.1.2022.121782>
- Surányi, B.B. et al. (2023) 'Comparing the Efficacy of MALDI-TOF MS and Sequencing-Based Identification Techniques (Sanger and NGS) to Monitor the Microbial Community of Irrigation Water', *Microorganisms*, 11(2), p. 287. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020287>.
- Sutter, A., Price, T. A., Wedell, N. (2021): The impact of female mating strategies on the success of insect control technologies. *Curr. Opin. Insect Sci.* 45, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.02.003>
- Suurnäkki, S. et al. (2020) 'The effect of peracetic acid on microbial community, water quality, nitrification and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance in recirculating aquaculture systems', *Aquaculture*, 516, p. 734534. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734534>.
- Suzuki, Y. et al. (2018) 'Bacterial flora analysis of coliforms in sewage, river water, and ground water using MALDI-TOF mass spectrometry', *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 53(2), pp. 160–173. Available at: <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1383128>.
- Suzuki, Y., Baidaliuk, A., Miesen, P., Frangeul, L., Crist, A.B., Merklings, S. H., Fontaine, A., Lequime, S., Moltini-Conclois, I., Blanc, H., van Rij, R. P., Lambrechts, L., Saleh, M.-C. (2020): Non-retroviral Endogenous Viral Element Limits Cognate Virus Replication in *Aedes aegypti* Ovaries. *Curr. Biol.* 30, 3495-3506.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.057>
- Szydlowski, L., Lan, T. C. T., Shibata, N., Goryanin, I. (2020): Metabolic engineering of a novel strain of electrogenic bacterium *Arcobacter butzleri* to create a platform for single analyte detection using a microbial fuel cell. *Enzyme Microb. Technol.* 139, 109564. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109564>
- Takahashi, K., Ide, Y., Hayakawa, J., Yoshimitsu, Y., Fukuhara, I., Abe, J., Kasai, Y., Harayama, S. (2018): Lipid Productivity in TALEN-Induced Starchless Mutants of the Unicellular Green Alga *Coccomyxa* Sp. Strain Obi. *Algal Research* 32 (June), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.020>.
- Takusagawa, M., Kobayashi, Y., Fukao, Y., Hidaka, K., Endo, M., Sugiyama, H., Hamaji, T. et al. (2021): HBD1 Protein with a Tandem Repeat of Two HMG-Box Domains Is a DNA Clip to Organize Chloroplast nucleoids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (20), e2021053118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021053118>.
- Technische Universität Dresden (2016) BOOT-Monitoring, TU Dresden. Available at: https://tu-dresden.de/bu/umwelt/hydro/isi/sww/die-professur/shy/projekte/boot?set_language=de (Accessed: 19 April 2023).
- Technische Universität Dresden (2020) Verbundvorhaben CYAQUATA, TU Dresden. Available at: https://tu-dresden.de/bu/umwelt/hydro/ifw/forschung/cyaquata_webseite?set_language=de (Accessed: 19 April 2023).
- Tejada-Arranz, A., de Crécy-Lagard, V., de Reuse, H. (2020): Bacterial RNA Degradosomes: Molecular Machines under Tight Control. *Trends Biochem. Sci.* 45, 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.10.002>
- Telang, A., Skinner, J. (2019): Effects of host blood meal source on reproductive output, nutrient reserves and gut microbiome of West Nile virus vector *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.* 114, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.02.001>

- Terayama, K., Shin, K., Mizuno, K., Tsuda, K., 2019. Integration of sonar and optical camera images using deep neural network for fish monitoring. *Aquac. Eng.* 86, 102000. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.102000>
- Theissinger, K. et al. (2018) 'Using DNA metabarcoding for assessing chironomid diversity and community change in mosquito controlled temporary wetlands', *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, p. e21060. Available at: <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.21060>.
- Thobor, C. (2000) 'Stehende Gewässer im Land Bremen'.
- Thomson-Laing, G. et al. (2021) 'Development of droplet digital Polymerase Chain Reaction assays for the detection of long-finned (*Anguilla dieffenbachii*) and short-finned (*Anguilla australis*) eels in environmental samples', *PeerJ*, 9, p. e12157. Available at: <https://doi.org/10.7717/peerj.12157>.
- Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz (2022) Gewässergüte Überwachungsgrundlagen | Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz. Available at: <https://tlubn.thueringen.de/wasser/oberflaechengewaesser/gewaesserguete> (Accessed: 18 April 2023).
- Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz (2022) Grundwasser | Thüringer Landesamt für Umwelt, Bergbau und Naturschutz. Available at: <https://tlubn.thueringen.de/wasser/grundwasser> (Accessed: 18 April 2023).
- Thüringer Ministerium für Umwelt, Energie und Naturschutz (2023) AKTION-FLUSS | Thüringer Gewässer gemeinsam entwickeln, AKTION-FLUSS. Available at: <https://aktion-fluss.de/> (Accessed: 18 April 2023).
- Tippelt, L., Walther, D. and Kampen, H. (2017) 'The thermophilic mosquito species *Uranotaenia unguiculata* Edwards, 1913 (Diptera: Culicidae) moves north in Germany', *Parasitology Research*, 116(12), pp. 3437–3440. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5652-2>.
- Tiwari, A. et al. (2022) 'Application of digital PCR for public health-related water quality monitoring', *Science of The Total Environment*, 837, p. 155663. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155663>.
- Toldrà, A., Alcaraz, C., Andree, K.B., et al. (2019) 'Colorimetric DNA-based assay for the specific detection and quantification of *Ostreopsis cf. ovata* and *Ostreopsis cf. siamensis* in the marine environment', *Harmful Algae*, 84, pp. 27–35. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.02.003>.
- Toldrà, A., Alcaraz, C., Diogène, J., et al. (2019) 'Detection of *Ostreopsis cf. ovata* in environmental samples using an electrochemical DNA-based biosensor', *Science of The Total Environment*, 689, pp. 655–661. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.448>.
- Tomazetto, G., Hahnke, S., Wibberg, D., Pühler, A., Klocke, M., Schlüter, A. (2018): *Proteiniphilum saccharofermentans* str. M3/6T isolated from a laboratory biogas reactor is versatile in polysaccharide and oligopeptide utilization as deduced from genome-based metabolic reconstructions. *Biotechnol. Rep.* 18, e00254. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00254>
- Tran, N.T., Kaldenhoff, R., 2020. Achievements and challenges of genetic engineering of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* 50, 101986. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101986>
- Tsoupas, A. et al. (2022) 'DNA barcoding identification of Greek freshwater fishes', *PLOS ONE*, 17(1), p. e0263118. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263118>.
- Tuteja, S.K. et al. (2020) *Nanosensors for Environmental Applications*. Springer Nature.
- Umweltbundesamt (2022a) Grundwasserrecht, Umweltbundesamt. Umweltbundesamt. Available at: <https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/wasserrecht/grundwasserrecht> (Accessed: 13 March 2024).

- Umweltbundesamt (2022b) Kleingewässermonitoring- und jetzt?, Umweltbundesamt. Umweltbundesamt. Available at: <https://www.umweltbundesamt.de/service/termine/kleingewaessermonitoring-jetzt> (Accessed: 13 March 2024).
- Umweltbundesamt (2022c) Recht der Oberflächengewässer, Umweltbundesamt. Umweltbundesamt. Available at: <https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/wasserrecht/recht-der-oberflaechengewaeser> (Accessed: 13 March 2024).
- Umweltbundesamt (2022d) Überwachung und Bewertung, Umweltbundesamt. Umweltbundesamt. Available at: <https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/gewaesser/grundwasser/ueberwachung-bewertung> (Accessed: 13 August 2024).
- Umweltbundesamt (2023) Wasserqualität in Badegewässern, Umweltbundesamt. Umweltbundesamt. Available at: <https://www.umweltbundesamt.de/wasserqualitaet-in-badegewaessern> (Accessed: 13 March 2024).
- Universität Konstanz (2023) HyMoBioStrategie. Available at: <https://www.hymobiosteategie.de/startseite/> (Accessed: 19 April 2023).
- Vasconcelos, D., Yin, M.S., Wetjen, F., Herbst, A., Ziemer, T., Förster, A., Barkowsky, T., Nunes, N., Hadaway, P., 2021. Counting Mosquitoes in the Wild: An Internet of Things Approach, in: Proceedings of the Conference on Information Technology for Social Good. Presented at the GoodIT '21: Conference on Information Technology for Social Good, ACM, Roma Italy, pp. 43–48. <https://doi.org/10.1145/3462203.3475914>
- Vavassori, A., Biraghi, C.A., Bratic, G., Carrion, D., Zamboni, G., Brovelli, M.A., 2021. Citizen Science Tools for Lake Monitoring in the Framework of the United Nations Sustainable Development Goals: The Project SIMILE. *GI_Forum* 1, 179–186. https://doi.org/10.1553/giscience2021_01_s179
- Venkatesh, D.M.M., Dr B. Usharani, Dr S. Anbazhagi, Dr C.K. Vidyal Raj (2022) Polymerase Chain Reactions: Basic Optimization Techniques. Notion Press.
- Verruto, J., Francis, K., Wang, Y., Low, M. C., Greiner, J., Tacke, S., Kuzminov, F. et al. (2018): Unrestrained Markerless Trait Stacking in *Nannochloropsis Gaditana* through Combined Genome Editing and Marker Recycling Technologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (30), E7015–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718193115>.
- Vinauger, C., Lahondère, C., Wolff, G. H., Locke, L. T., Liaw, J. E., Parrish, J. Z., Akbari, O. S., Dickinson, M. H., Riffell, J. A. (2018): Modulation of Host Learning in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Curr. Biol.* 28, 333–344.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.015>
- Vontas, J., Katsavou, E., Mavridis, K. (2020): Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. *Pestic. Biochem. Physiol.* 170, 104666. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104666>
- Vossen, R.H.A.M. et al. (2009) 'High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening', *Human Mutation*, 30(6), pp. 860–866. Available at: <https://doi.org/10.1002/humu.21019>.
- Walker, J. E., Lanahan, A. A., Zheng, T., Toruno, C., Lynd, L. R., Cameron, J. C., Olson, D. G., Eckert, C. A. (2020): Development of both type I–B and type II CRISPR/Cas genome editing systems in the cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*. *Metab. Eng. Commun.* 10, e00116. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00116>
- Wamba, A. N. R., Ibrahim, S. S., Kusimo, M. O., Muhammad, A., Mugenzi, L. M. J., Irving, H., Wondji, M. J., Hearn, J., Bigoga, J. D., Wondji, C. S. (2021): The cytochrome P450 CYP325A is a major driver of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in Central Africa. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 138, 103647. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103647>

- Wang, B. et al. (2021) 'Development of a recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick assay for rapid and sensitive detection of *Heterosigma akashiwo*', *Journal of Applied Phycology*, 33(5), pp. 3165–3178. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02538-5>.
- Wang, J., Bu, Y., 2022d. Internet of Things-based smart insect monitoring system using a deep neural network. *IET Netw.* 11, 245–256. <https://doi.org/10.1049/ntw2.12046>
- Wang, L. et al. (2022) 'Rapid Identification of *Salmo salar* Using a Combined Isothermal Recombinase Polymerase Amplification–Lateral Flow Strip Approach', *Food Analytical Methods*, 15(2), pp. 401–412. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02128-8>.
- Wang, L., Wu, Z., Huang, Q., Huang, K., Qi, G., Wu, C., Mao, H., et al. (2018a), "Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) STAT3 regulates the eIF2 α phosphorylation through interaction with PKR", *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 78, pp. 26–34, doi: 10.1016/j.dci.2017.08.019.
- Wang, M.-T., Li, Z., Ding, M., Yao, T.-Z., Yang, S., Zhang, X.-J., Miao, C., et al. (2022a), "Two duplicated gsdf homeologs cooperatively regulate male differentiation by inhibiting cyp19a1a transcription in a hexaploid fish", *PLOS Genetics*, Public Library of Science, Vol. 18 No. 6, p. e1010288, doi: 10.1371/journal.pgen.1010288.
- Wang, P., Zhang, G., Xu, Z., Chen, Z., Liu, X., Wang, C., Zheng, C., Wang, J., Zhang, H., Yan, A. (2022b): Whole-cell FRET monitoring of transcription factor activities enables functional annotation of signal transduction systems in living bacteria. *J. Biol. Chem.* 298, 102258. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102258>
- Wang, Q., Gong, Y., He, Y., Xin, Y., Lv, N., Du, X., Li, Y., Jeong, B.-r., Xu, J. (2021): Genome Engineering of *Nannochloropsis* with Hundred-Kilobase Fragment Deletions by Cas9 Cleavages. *The Plant Journal* 106 (4), 1148–62. <https://doi.org/10.1111/tpj.15227>.
- Wang, S., Hong, W., Dong, S., Zhang, Z.-T., Zhang, J., Wang, L., Wang, Y. (2018b): Genome engineering of *Clostridium difficile* using the CRISPR-Cas9 system. *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 1095–1099. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.026>
- Wang, X., He, Q., Yang, Y., Wang, J., Haning, K., Hu, Y., Wu, B., He, M., Zhang, Y., Bao, J., Contreras, L. M., Yang, S. (2018c): Advances and prospects in metabolic engineering of *Zymomonas mobilis*. *Metab. Eng.* 50, 57–73. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.001>
- Wang, X., Hao, T.-B., Balamurugan, S., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Dong, H. P., Li, H.-Y. (2017): A Lipid Droplet-Associated Protein Involved in Lipid Droplet Biogenesis and Triacylglycerol Accumulation in the Oleaginous Microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *Algal Research* 26 (September), 215–24. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.028>.
- Wang, Y., Lai, Y., Fan, X. and Zhao, Y. (2022c), "Macrophage migration inhibitory factor is vital for inflammatory properties and survival of peripheral blood leukocytes via enhancing mitochondrial function in *Ctenopharyngodon idellus*", *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 131, pp. 518–526, doi: 10.1016/j.fsi.2022.10.030.
- Wang, Y., Liu, Y., Liu, J., Guo, Y., Fan, L., Ni, X., Zheng, X., Wang, M., Zheng, P., Sun, J., Ma, Y. (2018d): MACBETH: Multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metab. Eng.* 47, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.02.016>
- Wang, Y., Wang, Z., Chen, Y., Hua, X., Yu, Y., Ji, Q. (2019): A Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Genome Engineering Platform in *Acinetobacter baumannii* to Understand the H₂O₂-Sensing Mechanism of OxyR. *Cell Chem. Biol.* 26, 1732-1742.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.09.003>
- Wang, Z. et al. (2022) 'Metabarcoding of harmful algal bloom species in sediments from four coastal areas of the southeast China', *Frontiers in Microbiology*, 13. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.999886> (Accessed: 17 July 2023).

- Watanabe, K., Perez, C. M. T., Kitahori, T., Hata, K., Aoi, M., Takahashi, H., Sakuma, T., Okamura, Y., Nakashimada, Y., Yamamoto, T., Matsuyama, K., Mayuzumi, S., Aki, T. (2021): Improvement of fatty acid productivity of thraustochytrid, *Aurantiochytrium* sp. by genome editing. *J. Biosci. Bioeng.* 131, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.11.013>
- Weber, U. et al. (2022) ‘MOSES: A Novel Observation System to Monitor Dynamic Events across Earth Compartments’, *Bulletin of the American Meteorological Society*, 103(2), pp. E339–E348. Available at: <https://doi.org/10.1175/BAMS-D-20-0158.1>.
- Wei, L., Jiang, Z., Liu, B. (2022): A CRISPR/DCas9-Based Transcription Activated System Developed in Marine Microalga *Nannochloropsis Oceanica*. *Aquaculture* 546 (January), 737064. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737064>.
- Wei, L., Shen, C., Hajjami, M. E., You, W., Wang, Q., Zhang, P., Ji, Y. et al. (2019): Knockdown of Carbonate Anhydrase Elevates *Nannochloropsis* Productivity at High CO₂ Level. *Metabolic Engineering* 54 (July), 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.03.004>.
- Weigand, A. et al. (2019) ‘Taming the Wild West of Molecular Tools Application in Aquatic Research and Biomonitoring’, *Biodiversity Information Science and Standards*, 3, p. e37215. Available at: <https://doi.org/10.3897/biss.3.37215>.
- Weigand, H. et al. (2019) ‘DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work’, *Science of The Total Environment*, 678, pp. 499–524. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.247>.
- Weisner, O. (2022) Übersicht - Kleingewässermonitoring. Available at: <https://www.ufz.de/kgm/index.php?de=44480> (Accessed: 19 April 2023).
- Weller, D.L., Weller, D.E., Strawn, L.K., Love, T.M.T., 2022. Scale of analysis drives the observed ratio of spatial to non-spatial variance in microbial water quality: insights from two decades of citizen science data (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2022.02.01.478743>
- Wen, A., Havens, K. L., Bloch, S. E., Shah, N., Higgins, D. A., Davis-Richardson, A. G., Sharon, J., Rezaei, F., Mohiti-Asli, M., Johnson, A., Abud, G., Ane, J.-M., Maeda, J., Infante, V., Gottlieb, S. S., Lorigan, J. G., Williams, L., Horton, A., McKellar, M., Soriano, D., Caron, Z., Elzinga, H., Graham, A., Clark, R., Mak, S.-M., Stupin, L., Robinson, A., Hubbard, N., Broglie, R., Tamsir, A., Temme, K. (2021): Enabling Biological Nitrogen Fixation for Cereal Crops in Fertilized Fields. *ACS Synth. Biol.* 10, 3264–3277. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00049>
- Weng, P., Wu, L., Jiang, Z., Ran, X., Xu, K., Xie, X., Xu, X., et al. (2019), “Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) RSK2 protects cells anti-apoptosis by up-regulating BCL-2”, *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 97, pp. 45–56, doi: 10.1016/j.dci.2019.03.011.
- Werling, K., Shaw, W. R., Itoe, M. A., Westervelt, K. A., Marcenac, P., Paton, D. G., Peng, D., Singh, N., Smidler, A. L., South, A., Deik, A. A., Mancio-Silva, L., Demas, A. R., March, S., Calvo, E., Bhatia, S. N., Clish, C. B., Catteruccia, F. (2019): Steroid Hormone Function Controls Non-competitive *Plasmodium* Development in *Anopheles*. *Cell* 177, 315–325.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.036>
- Werner, D., Kowalczyk, S., Kampen, H., 2020. Nine years of mosquito monitoring in Germany, 2011–2019, with an updated inventory of German culicid species. *Parasitol. Res.* 119, 2765–2774. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06775-4>
- Wieland, R., Kuhls, K., Lentz, H.H.K., Conraths, F., Kampen, H., Werner, D., 2021. Combined climate and regional mosquito habitat model based on machine learning. *Ecol. Model.* 452, 109594. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2021.109594>
- Wiltshire, R. M., Duman-Scheel, M. (2020): Advances in oral RNAi for disease vector mosquito research and control. *Curr. Opin. Insect Sci.* 40, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.05.002>

- Wong, R. and Tse, H. (2008) Lateral Flow Immunoassay. Springer Science & Business Media.
- Wu, C., Li, F., Yi, S., Ge, F. (2021a): Genetically engineered microbial remediation of soils co-contaminated by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons: Advances and ecological risk assessment. *J. Environ. Manage.* 296, 113185. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113185>
- Wu, C., Deng, H., Li, D., Fan, L., Yao, D., Zhi, X., Mao, H., et al. (2021b), “Ctenopharyngodon idella Tollip regulates MyD88-induced NF- κ B activation”, *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 123, p. 104162, doi: 10.1016/j.dci.2021.104162.
- Wu, C., Xu, X., Zhi, X., Jiang, Z., Li, Y., Xie, X., Chen, X., et al. (2019), “Identification and functional characterization of IRAK-4 in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 87, pp. 438–448, doi: 10.1016/j.fsi.2019.01.031.
- Wu, G. et al. (2023) ‘Establishment of a multiplex polymerase chain reaction detection assay for three common harmful microalgae in the East China Sea’, *Environmental Science and Pollution Research*, 30(21), pp. 60500–60513. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26821-9>.
- Xia, Y., Yu, E., Li, Z., Zhang, K., Tian, J., Wang, G., Xie, J., et al. (2021), “Both TGF- β 1 and Smad4 regulate type I collagen expression in the muscle of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*”, *Fish Physiology and Biochemistry*, Vol. 47 No. 4, pp. 907–917, doi: 10.1007/s10695-021-00941-w.
- Xie, X., Xu, K., Mao, H., Lv, Y., Weng, P., Chang, K., Lin, G., et al. (2020), “Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) IRAK1 and STAT3 up-regulate synergistically the transcription of IL-10”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 102, pp. 28–35, doi: 10.1016/j.fsi.2020.04.014.
- Xiong, B., Hong, T., Schellhorn, H., Fang, Q., 2021. Dual-Modality Imaging Microfluidic Cytometer for Onsite Detection of Phytoplankton. *Photonics* 8, 435. <https://doi.org/10.3390/photonics8100435>
- Xiong, Xiong et al. (2021) ‘Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid screening of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) in processed fish products’, *Journal of Food Composition and Analysis*, 102, p. 104038. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104038>.
- Xu, K., Xie, X., Qi, G., Weng, P., Hu, Z., Han, K., Yuan, H., et al. (2019a), “Grass carp STK38 regulates IFN I expression by decreasing the phosphorylation level of GSK3 β ”, *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 99, p. 103410, doi: 10.1016/j.dci.2019.103410.
- Xu, X., Li, M., Deng, Z., Li, D., Lu, S., Deng, H., Lv, Y., et al. (2021a), “Grass carp Mre11A activates IFN 1 response by targeting STING to defend against GCRV infection”, *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 116, p. 103909, doi: 10.1016/j.dci.2020.103909.
- Xu, X., Li, M., Li, D., Jiang, Z., Liu, C., Shi, X., Wu, C., et al. (2019b), “Identification of the SAMHD1 gene in grass carp and its roles in inducing apoptosis and inhibiting GCRV proliferation”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 88, pp. 606–618, doi: 10.1016/j.fsi.2019.03.028.
- Xu, X., Li, M., Wu, Z., Wang, H., Wang, L., Huang, K., Liu, X., et al. (2017), “Endoplasmic Reticulum Transmembrane Proteins ZDHHC1 and STING Both Act as Direct Adaptors for IRF3 Activation in Teleost”, *The Journal of Immunology*, Vol. 199 No. 10, pp. 3623–3633, doi: 10.4049/jimmunol.1700750.
- Xu, Y.-H., Hogstrand, C., Xu, Y.-C., Zhao, T., Zheng, H. and Luo, Z. (2021b), “Environmentally relevant concentrations of oxytetracycline and copper increased liver lipid deposition through inducing oxidative stress and mitochondria dysfunction in grass carp *Ctenopharyngodon idella*”, *Environmental Pollution*, Vol. 283, p. 117079, doi: 10.1016/j.envpol.2021.117079.
- Xu, Z., Li, M., Li, Y., Cao, H., Miao, L., Xu, Zhaochao, Higuchi, Y., Yamasaki, S., Nishino, K., Woo, P. C. Y., Xiang, H., Yan, A. (2019c): Native CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing Enables Dissecting and Sensitizing Clinical Multidrug-Resistant *P. aeruginosa*. *Cell Rep.* 29, 1707-1717.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.006>

- Yan, R., Zhou, Q., Xu, Z., Zhu, G., Dong, K., Zhorov, B. S., Chen, M. (2020): Three sodium channel mutations from *Aedes albopictus* confer resistance to Type I, but not Type II pyrethroids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 123, 103411. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103411>
- Yan, Y., Hillyer, J. F. (2019): Complement-like proteins TEP1, TEP3 and TEP4 are positive regulators of peritostial hemocyte aggregation in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 107, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.01.007>
- Yang, J., Gong, Y., Cai, J., Zheng, Y. and Zhang, Z. (2020), “Chlorpyrifos induces apoptosis and autophagy in common carp lymphocytes by influencing the TCR γ -dependent PI3K/AKT/JNK pathway”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 99, pp. 587–593, doi: 10.1016/j.fsi.2020.02.039.
- Yao, F. A., Millogo, A.-A., Epopa, P. S., North, A., Noulin, F., Dao, K., Drabo, M., Guissou, C., Kekele, S., Namountougou, M., Ouedraogo, R. K., Pare, L., Barry, N., Sanou, R., Wandaogo, H., Dabire, R. K., McKemey, A., Tripet, F., Diabaté, A. (2022): Mark-release-recapture experiment in Burkina Faso demonstrates reduced fitness and dispersal of genetically-modified sterile malaria mosquitoes. *Nature Communications* 13, 796. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28419-0>
- Yap, J. K., Sankaran, R., Chew, K. W., Munawaroh, H. S. H., Ho, S.-H., Banu, J. R., Show, P. L. (2021): Advancement of Green Technologies: A Comprehensive Review on the Potential Application of Microalgae Biomass. *Chemosphere* 281 (October), 130886. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130886>.
- Yates, L. E., Natarajan, A., Li, M., Hale, M. E., Mills, D. C., DeLisa, M. P. (2019): Glyco-recoded *Escherichia coli*: Recombineering-based genome editing of native polysaccharide biosynthesis gene clusters. *Metab. Eng.* 53, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.02.002>
- Ye, Z., Liu, F., Ferguson, S. T., Baker, A., Pitts, R. J., Zwiebel, L. J. (2021): Ammonium transporter AcAmt mutagenesis uncovers reproductive and physiological defects without impacting olfactory responses to ammonia in the malaria vector mosquito *Anopheles coluzzii*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 134, 103578. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103578>
- Ye, Z., Liu, F., Sun, H., Barker, M., Pitts, R. J., Zwiebel, L. J. (2020): Heterogeneous expression of the ammonium transporter AgAmt in chemosensory appendages of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 120, 103360. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103360>
- Yoshimitsu, Y., Abe, J., Harayama, S. (2018): Cas9-Guide RNA Ribonukleoprotein-Induced Genome Editing in the Industrial Green Alga *Coccomyxa* Sp. Strain KJ. *Biotechnology for Biofuels* 11 (1), 326. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1327-1>.
- Yu, D. et al. (2021) ‘Using environmental DNA methods to improve detectability in an endangered sturgeon (*Acipenser sinensis*) monitoring program’, *BMC Ecology and Evolution*, 21(1), p. 216. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01948-w>.
- Yu, N., Xu, X., Qi, G., Liu, D., Chen, X., Ran, X., Jiang, Z., et al. (2018), “Ctenopharyngodon idella TBK1 activates innate immune response via IRF7”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 80, pp. 521–527, doi: 10.1016/j.fsi.2018.06.045.
- Yu, T., Zeng, Q., Mao, H., Liu, Y., Zhang, H., Wang, S., Hu, C., et al. (2022), “Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) NLK2 inhibits IFN I response through blocking MAVS-IRF3 axis”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 131, pp. 206–217, doi: 10.1016/j.fsi.2022.10.002.
- Yu, Z., Wang, E., Geng, Y., Wang, K., Chen, D., Huang, X., Ouyang, P., Zuo, Z., He, C., Tang, L., Yang, Z., Lai, W. (2019): Multiplex genome editing by natural transformation in *Vibrio mimicus* with potential application in attenuated vaccine development. *Fish Shellfish Immunol.* 92, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.025>
- Yuan, Y. et al. (2018) ‘Detection of viable *Escherichia coli* in environmental water using combined propidium monoazide staining and quantitative PCR’, *Water Research*, 145, pp. 398–407. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.044>.

- Yun, J., Zaved, H.M., Zhang, Y., Zhang, G., Zhao, M., Qi, X. (2022): Improving tolerance and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* using physical mutagenesis, adaptive evolution and genome shuffling. *Bioresour. Technol.* 363, 127967. <https://doi.org/10.1016/j.bior-tech.2022.127967>
- Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ), M.M.G. (2023) ddPCR (droplet digital PCR). Available at: <https://www.medizinische-genetik.de/diagnostik/allgemeine-informationen/methoden/ddpcr-droplet-digital-pcr> (Accessed: 29 August 2023).
- Zhai, G., Shu, T., Chen, K., Lou, Q., Jia, J., Huang, J., Shi, C., et al. (2022), “Successful Production of an All-Female Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Population Using *cyp17a1*-Deficient Neomale Carp”, *Engineering*, Vol. 8, pp. 181–189, doi: 10.1016/j.eng.2021.03.026.
- Zhai, X., Luo, T., Peng, X., Ma, P., Wang, C., Zhang, C., Suo, J., Bao, L. (2018): The truncated Rv2820c of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family augments intracellular survival of *M. smegmatis* by altering cytokine profile and inhibiting NO generation. *Infect. Genet. Evol.* 59, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.01.027>
- Zhang, C. et al. (2023) ‘Using cyanobacteria and other phytoplankton to assess trophic conditions: A qPCR-based, multi-year study in twelve large rivers across the United States’, *Water Research*, 235, p. 119679. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119679>.
- Zhang, J., Zong, W., Hong, W., Zhang, Z.-T., Wang, Y. (2018): Exploiting endogenous CRISPR-Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium tyrobutyricum* and engineer the strain for high-level butanol production. *Metab. Eng.* 47, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.007>
- Zhang, Y.-T., Jiang, J.-Y., Shi, T.-Q., Sun, X.-M., Zhao, Q.-Y., Huang, H., Ren, L.-J. (2019): Application of the CRISPR/Cas System for Genome Editing in Microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (8), 3239–48. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09726-x>.
- Zhao, Z., Tian, D., McBride, C. S. (2021): Development of a pan-neuronal genetic driver in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Rep. Methods* 1, 100042. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100042>
- Zhong, B., Jiang, Z., Chen, Z., Ishihara, K., Mao, H., Wang, S., Lin, G., et al. (2019), “Overexpression of *CiIKKβ* enhances CIK cell viability against ER stress”, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 92, pp. 706–711, doi: 10.1016/j.fsi.2019.07.003.
- Zhou, C., Liu, H., Yuan, F., Chai, H., Wang, H., Liu, F., Li, Y., Zhang, H., Lu, F. (2019): Development and application of a CRISPR/Cas9 system for *Bacillus licheniformis* genome editing. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.170>
- Zhou, Z., Zhao, Y., 2011. Research on the Water Quality Monitoring System for Inland Lakes based on Remote Sensing. *Procedia Environ. Sci.* 10, 1707–1711. <https://doi.org/10.1016/j.pro-env.2011.09.268>
- Zhou, F., Zhou, P., Xie, J., Zeng, Y., Zhu, C., Huang, S., Xia, L., Zhang, T., Zhao, X., Yi, Z., Liu, Z., Lu, J., Quan, M., Ding, X. (2020): Effects of SpoIVA on the formation of spores and crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Res.* 239, 126523. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126523>
- Zhu, D., Huang, R., Fu, P., Chen, L., Luo, L., Chu, P., He, L., et al. (2019), “Investigating the Role of BATF3 in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Immune Modulation: A Fundamental Functional Analysis”, *International Journal of Molecular Sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 20 No. 7, p. 1687, doi: 10.3390/ijms20071687.
- Zoppo, M., Okoniewski, N., Pantelyushin, S., vom Berg, J. and Schirmer, K. (2021), “A ribonucleoprotein transfection strategy for CRISPR/Cas9-mediated gene editing and single cell cloning in rainbow trout cells”, *Cell & Bioscience*, Vol. 11 No. 1, p. 103, doi: 10.1186/s13578-021-00618-0.

Zou, S., Zhao, K., Tang, H., Zhang, Z., Zhang, B., Liu, Z., Zheng, Y. (2021): Improved production of D-pantothenic acid in *Escherichia coli* by integrated strain engineering and fermentation strategies. J. Biotechnol. 339, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.07.014>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Flussdiagramm zur Beschreibung der Vorgehensweise bei der Literaturrecherche.....	18
Abb. 2:	Anzahlen der selektierten Publikationen zu neuen gentechnischen Methoden bei Mücken gegliedert nach Taxa und Themenfeldern.	32
Abb. 3:	Anzahlen der selektierten Publikationen zu neuen gentechnischen Methoden bei Bakterien gegliedert nach Gattungen und Themenfeldern.	44
Abb. 4:	Verteilung der selektierten Publikationen zur gene editing-Thematik auf die verschiedenen Mikroalgen-Gattungen	62
Abb. 5:	Verteilung der selektierten Publikationen zur gene editing-Thematik auf die verschiedenen Fisch-Arten	83
Abb. 6:	Wirkungsgraph des Modells von <i>Anopheles gambiae</i>	94
Abb. 7:	Wirkungsgraph des Modells von <i>Bacillus subtilis</i>	96
Abb. 8:	Wirkungsgraph des Modells von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	98
Abb. 9:	Wirkungsgraph des Modells von <i>Oncorhynchus mykiss</i>	99
Abb. 10:	Ergebnisse des Referenzszenarios für <i>Anopheles gambiae</i>	106
Abb. 11:	Ergebnisse des Referenzszenarios für <i>Anopheles gambiae</i>	106
Abb. 12:	Ergebnisse des Referenzszenarios für <i>Bacillus subtilis</i>	107
Abb. 13:	Ergebnisse des Referenzszenarios für <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	108
Abb. 14:	Ergebnisse des Referenzszenarios für <i>Oncorhynchus mykiss</i>	109
Abb. 15:	Graphische Darstellung der Verteilung aller zusammengestellten Publikationen.....	166
Abb. 16:	Übersicht über die Verteilung der recherchierten Publikationen auf die behandelten Organismengruppen und die Themenfelder neben molekularen Methoden.	206

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Suchergebnisse zu den Fischen vor und nach der detaillierten Suche	16
Tab. 2:	Tabellarische Zusammenfassung der Verteilung und Aufschlüsselung der Gattungen von Bakterien	44
Tab. 3:	Tabellarische Zusammenfassung der Verteilung sowie eine Aufschlüsselung der Gattungen von Mikroalgen	63
Tab. 4:	Erläuterungen der in den Wortmodellen verwendeten Begriffe.	91
Tab. 5:	Akronyme, Größen und Definitionen der Parameter und Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario des Modells für Mücken.	100
Tab. 6:	Akronyme, Größen und Definitionen der Parameter und Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario des Modells für Bakterien.....	102
Tab. 7:	Akronyme, Größen und Definitionen der Parameter und Anfangsbedingungen für je ein realistisches Referenzszenario des Modells für Algen.	103
Tab. 8:	Akronyme, Größen und Definitionen der Parameter und Anfangsbedingungen für je ein Referenzszenario des Modells für Fische.	105
Tab. 9:	Ergebnisse der lokalen Sensitivitätsanalysen des Mückenmodells	111
Tab. 10:	Ergebnisse der lokalen Sensitivitätsanalysen des Bakterienmodells.....	112
Tab. 11:	Ergebnisse der lokalen Sensitivitätsanalysen des Algenmodells	112
Tab. 12:	Ergebnisse der lokalen Sensitivitätsanalysen des Fischmodells	113
Tab. 13:	Annahmen von jeweils sechs Szenarien für die Modelle der vier Beispielarten.....	114
Tab. 14:	Ergebnisse der Szenarienanalysen des Mückenmodells.....	116
Tab. 15:	Ergebnisse der Szenarienanalysen des Bakterienmodells	117
Tab. 16:	Ergebnisse der Szenarienanalysen des Algenmodells.....	119
Tab. 17:	Ergebnisse der Szenarienanalysen des Fischmodells.....	120
Tab. 18:	Auflistung der Internationalen Flussgebietskommissionen mit einer Beteiligung der Bundesrepublik Deutschland	124
Tab. 19:	Auflistung der deutschen Flussgebietsgemeinschaften.....	129
Tab. 20:	Zusammenstellung aller ermittelten Publikationen zur Anwendung neuartiger molekularbiologischer Nachweismethoden im aquatischen Monitoring.....	165
Tab. 21:	Übersicht über die Parameter, für die das jeweilige Modell die höchsten betragsmäßigen Sensitivitäten aufweist.....	282
Tab. 22:	Tabellarische Zusammenfassung der etablierten Monitoringprogramme der deutschen Bundesländer.....	283

Tab. 23:	Zusammenfassung aller recherchierten, neuartigen Monitoringmethoden, die potentiell für eine Erfassung von nGVO in aquatischen Systemen geeignet sind	309

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AE	AquaEcology GmbH & Co. KG
biome-id	biome-id Dres. Barco & Knebelsberger GbR
BfN	Bundesamt für Naturschutz
BMUV	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz
cDNA	complementary DNA
CNN	Convolutional Neural Network
CRISPR/Cas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated proteins
CRISPRa	CRISPR activation (CRISPR Aktivierung)
CRISPRi	CRISPR interference (CRISPR Interferenz)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dPCR	digitale PCR
eDNA	environmental DNA
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
HDR	homology directed repair (homologiegerichtete Reparatur)
HR	homologous recombination (homologe Rekombination)
HRM	High-Resolution Meltig
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
LFA	Lateral Flow Assay
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization- time of flight mass spectrometry
mRNA	messenger RNA
nGMO	new Genetically Modified Organism
nGVO	neuer gentechnisch veränderter Organismus
NHEJ	non-homologous end joining (nichthomologe Endenvereinigung)
ODM	Oligo Directed Mutagenesis (oligo-gerichtete Mutagenese)

Abkürzung	Erklärung
pdf	portable document file
qPCR	quantitative PCR
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA Interference (RNA-Interferenz)
RNP	Ribonukleoprotein
RPA	Recombinase Polymerase Amplification
rRNA	ribosomale RNA
sgRNA	single guide RNA (einfach führende RNA)
SNV	single nucleotide variants (Varianten einzelner Nukleotide)
TALENs	Transcription Activator-like Effector Nucleases (transkriptionsaktivatorartige Effekternukleasen)
WT	Wildtyp
ZFNs	Zinc-finger nucleases (Zinkfingernukleasen)

A Anhang

Tab. 21: Übersicht über die Parameter, für die das jeweilige Modell die höchsten betragsmäßigen Sensitivitäten aufweist. Bezüglich der Erklärung der Akronyme wird auf die Tabellen 5 bis 8 verwiesen. Für die Parameter mit dem höchsten Rang hat das jeweilige Modell die höchsten Sensitivitäten.

Rang	Mückenmodell	Bakterienmodell	Algenmodell	Fischmodell
1	k_5	F_K	F_K	k_6
2	k_6	k_6	F_{nGVO}	F_{nGVO}
3	k_3	k_7	k_6	k_3
4	k_9	a_1	k_7	ÖK
5	F_{nGVO}	F_{nGVO}	k_4	k_1
6	k_2	ÖK	k_5	
7	F_K			

Tab. 22: Tabellarische Zusammenfassung der etablierten Monitoringprogramme der deutschen Bundesländer. Dargestellt werden die Bezeichnungen der jeweiligen Messprogramme, eine Beschreibung, die räumliche Ausdehnung, die beteiligten Bundesländer, der Probennahmezyklus und die erhobenen Parameter. Weiterhin sind Bewertungen (Punktzahlen) anhand von sechs Kriterien zur Eignung für ein nGVO-Monitoring angegeben. Die Monitoringprogramme sind in absteigender Reihenfolge gemäß der Gesamtpunktzahl sortiert. Grüne Markierungen zeigen an, dass sowohl biotische als auch abiotische Parameter überwacht werden. Blaue Markierungen zeigen an, dass nur abiotische Parameter erfasst werden. Gelbe Markierungen wurden solchen Verfahren zugewiesen, die sich noch in der konzeptionellen Entwicklung befinden, d.h. bei diesen Verfahren liegen noch keine Messungen vor.

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probennahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Monitoring der Oberflächengewässerqualität BW	Überwachung des Gewässerzustandes	National	BW	Seit 1974	Kontinuierlich bzw. In regelmäßigen Abständen	Fische, Phytoplankton, Makrophyten, Phyto-benthos, Makrozoobenthos, Temperatur, Sauerstoffkonzentration, elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert, Trübung	5	4	5	5	2	4	24,5
Monitoringprogramm Oberflächengewässerbeschaffenheit BY	Überwachung der Oberflächen-gewässerqualität	National	BY	Keine Angabe	Keine Angabe	Fische, Phytoplankton, Makrophyten, Phyto-benthos, Makrozoobenthos, Zooplankton, Temperatur, Sauerstoffgehalt, Nährstoffe, Schadstoffe, Hydromorphologie, Radioaktivität, Versauerung	5	4	5	5	2	4	24,5

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Monitoringprogramm zur Überwachung der Beschaffenheit und Menge von Oberflächengewässern und des Grundwassers MV	Überwachung der Gewässerqualität	National	MV	Seit 1993	Mehrmals jährlich	Wasserstand, Verdunstung, Grundwasserneubildung, Fische, Makrozoobenthos, Phytoplankton, andere aquatische Flora, Temperatur, Sauerstoffgehalt, Salzgehalt, Nährstoffe, Versauerung, Chlorophyll a-Gehalt, Schadstoffe, Hydromorphologie, Uferstruktur	5	4	5	5	2	4	24,5
Monitoring Oberflächengewässer RP	Überwachung des Gewässerzustands	National	RP	Keine Angabe	Keine Angabe	Niederschlagsintensität, Wasserstand, Durchfluss, Temperatur, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt, Nährstoffe, Spurenstoffe, Fische, Makrozoobenthos, Makrophyten, Phytobenthos, Zooplankton, Phytoplankton, Cyanobakterien, mikrobiologisch-hygienische Parameter	5	4	5	5	2	4	24,5
Gewässermonitoring SH	Monitoringprogramme zur Überwachung	National	SH	Keine Angabe	Keine Angabe	Fische, Spurenstoffe	5	4	5	5	2	4	24,5

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
	der Gewässerqualität												
Aktion Fluss	Umfasst das „Landesprogramm Gewässerschutz 2022-2027“	National	TH	2022-2027	Kontinuierlich	Fische, Makrozoobenthos, Makrophyten, Phytobenthos, Diatomeen, Phytoplankton, chemische Wasserbeschaffenheit	5	4	5	5	2	4	24,5
Überwachung der Oberflächengewässer BB	Hydrologisches Landesmessnetz	National	BB	Keine Angabe	Kontinuierlich bzw. in regelmäßigen Abständen	Phytoplankton, Makrophyten und Phytobenthos, Makrozoobenthos, Fische, Sauerstoffgehalt, Salzgehalt, Nährstoffgehalt, etc., hydromorphologische Parameter	5	4	5	5	2	4	24,5
Gewässerüberwachungsprogramm Sachsen-Anhalt	Messnetze für ein Gewässermonitoring sowie verschiedene Sondermessprogramme	National	ST	Keine Angabe	Kontinuierlich bzw. in regelmäßigen Abständen	Physikalisch-chemische Wasserbeschaffenheit, biologisch-ökologische Wasserbeschaffenheit, Hydrologie	5	4	5	5	2	4	24,5
Wassergütemessnetze SN	Erfassung der biologischen, chemischen und physikalischen Gewässergütedaten	National	SN	Keine Angabe	Kontinuierlich bzw. Monatlich	Temperatur, pH-Wert, Wasserstand, Wasserbeschaffenheit, Spurenstoffe, Chlorophyll a-Gehalt, ökologischer Zustand	5	4	5	5	2	4	24,5

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Wassergütemessnetz HH	Überwachung der Gewässerqualität	National	HH	Seit 1988	Kontinuierlich	Sauerstoffgehalt, Trübung, pH-Wert, Temperatur, elektrische Leitfähigkeit, UV-Absorption, Öl, Schadstoffe, ökologischer Zustand	5	4	4	4	3	4	24
Gewässer-Überwachungssystem Niedersachsen (GÜN)	Monitoring der Niederschlags, Grundwassers, der oberirdischen Gewässer und der Küstengewässer	National	NI	Keine Angabe	täglich, wöchentlich bzw. monatlich	Wasserstand, Pflanzenschutzmittel, Versalzung, Sonderuntersuchungen: Schadstoffe, radioaktive Stoffe, Schwermetallen, ökologischer Zustand	5	4	4	5	2	4	24
Gewässermonitoringkonzept Müritz-Nationalpark	35 Seen des Müritz-Nationalpark langfristig durch das Gewässermonitoringkonzept überwacht	National	MV	2011	Keine Angabe	Gewässergüte, Erhaltungszustand der Lebensraumtypen, Fische, Makrophyten, weitere Artvorkommen (u.a. Libellen, Amphibien)	5	4	5	4	2	4	23,5

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Laborschiff „MAX PRÜSS“	Schiff-gestützte Gewässermonitoring	National	NW	Seit 1964	220 Tage im Jahr	Nährstoffe, Kohlenwasserstoffe, toxische Wasserinhaltsstoffe, Schwermetalle, physikalische, chemische und biologische Wasserbeschaffenheit, Temperatur, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt, Trübung, Lufttemperatur, Luftfeuchtigkeit, Windgeschwindigkeit	4	5	4	4	3	4	23,5
Monitoring der Berliner Oberflächenwassergüte	Systematische Überwachung der Gewässerqualität	National	BE	Seit 50 Jahren	kontinuierlich, monatlich bzw. bei Bedarf	Sauerstoffgehalt, Temperatur, Nährstoffe, Schwermetalle, Spurenstoffe, mikrobiologisch-hygienische Parameter, ökologischer Zustand	5	4	4	4	2	4	23
Bestimmung der Gewässerbiologie	Bewertung des ökologischen Zustands	National	HH	Keine Angabe	Min. siebenmal jährlich	Makrozoobenthos und Phytoplankton	5	4	4	4	2	4	23
Gewässerentwicklungskonzept Luppe-Salza	Bewertung des ökologischen Zustands der Gewässer Luppe und Salza	National	ST	Keine Angabe	Keine Angabe	Wasserbeschaffenheit	3	5	5	4	3	4	23

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Monitoringprogramm zur Oberflächengewässergüte HB	Biologisch-chemische Einstufung der Beschaffenheit der stehenden Gewässer	National	HB	Keine Angabe	Ein- bis dreimal jährlich	Sauerstoffgehalt, elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert, Temperatur, Nährstoffe, Schwermetalle, ökologischer Zustand	4	4	4	3	2	5	23
International Cooperative Programme (ICP) Waters	Versauerungsmonitoring	International	BW, BY, NI, NW, RP, SN, SH	Seit 1986	Keine Angabe	pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Schadstoffe, Makrozoobenthos, Diatomeen, Phytoplankton, Zooplankton	3	4	4	5	2	4	22
Flussgebiet Spree	Überwachung von Bergbaufolgen im brandenburgischen Teil der Spree	National	BB	Keine Angabe	Täglich bzw. In regelmäßigen Abständen	Elektrische Leitfähigkeit, Eisen, Sulfat, pH-Wert, Fische, Makrozoobenthos, Diatomeen	4	4	4	3	3	4	22
Hafenmessfahrten	Mobile Messungen zur Gewässergüte, Erfassung der Planktonalgen-Blüte	National	HH	1997	Sechsmal jährlich	Sauerstoffgehalt, Nährstoffe, Zooplankton, Phytoplankton	4	4	4	3	3	4	22
Überwachung der Wasserhygiene	Untersuchung von Trinkwasser und Badewasser	National	MV	Keine Angabe	Keine Angabe	Krankheitserreger, mikrobiologisch-hygienische Parameter, chemische Stoffe, Geschmack, Geruch, Aussehen, Verunreinigungen, Algenaufkommen, Sichttiefe, pH-Wert	4	4	4	3	3	4	22

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
GeDNA-Projekt	Genetische Untersuchung verschiedener Gewässer	International	BY	2019-2022	Keine Angabe	Fische, Makrozoobenthos, Phyto-benthos	2	4	3	2	4	5	21,5
Eco-AlpsWater	Vergleich neuartiger (eDNA/NGS) mit konventionellen Methoden	International	BY	2018-2021	Keine Angabe	Fische, Pflanzen, Bakterien	2	4	3	2	4	5	21,5
Rheinintensivüberwachung	Frühwarnsystem, Erfassung akuter Stoffeinträge	International	BW	Keine Angabe	Kontinuierlich bzw. täglich	pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Temperatur, elektrischen Leitfähigkeit, Schadstoffe	5	5	5	5	2	2	21
Grundwassermonitoring BW	Überwachung der Grundwassermenge und -beschaffenheit	National	BW	Seit 1991	Jährlich	Faunistische Parameter, hydrochemische Feldparameter, Schadstoffe	4	4	4	5	2	3	21
Monitoring von Badegewässern auf Blaualgentoxine	Überwachung der Badegewässer in Hinblick auf Cyanobakterien und deren Toxine	National	BY	Keine Angabe	Keine Angabe	Cyanobakterien, deren Toxine	5	4	4	4	2	3	21
Systematische Überwachung des Abwassers von kommunalen Kläranlagen und Industriebetrieben	Abwassermonitoring	National	BY	Keine Angabe	Keine Angabe	Auswirkungen des eingeleiteten Abwassers auf die Gewässerqualität	5	4	4	4	2	3	21

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Monitoring der Gewässerbeschaffenheit SL	Übersicht über die Gewässerqualität, anlassbezogene Sondermessungen	National	SL	Keine Angabe	Keine Angabe	Sauerstoffgehalt, Temperatur, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Trübung, Redox-Potential, Nährstoffe, Schadstoffe, ökologischer Zustand	4	4	4	3	2	4	21
Monitoring der Abwassereinleitungen durch Kläranlagen oder industrielle Einrichtungen	Untersuchung werden die Abwasserbeschaffenheit und der ordnungsgemäße Betrieb der Anlage	National	RP	Keine Angabe	Täglich bzw. In regelmäßigen Abständen	Temperatur, pH-Wert, Nährstoffe	5	5	5	5	2	2	21
Gewässerökologisches Klimafolgenmonitoring	Untersuchung von Klimawandelfolgen und Entwicklung sogenannter Klimaindikatoren	National	BW, BY, HE, RP	Seit 2018	Kontinuierlich bzw. In regelmäßigen Abständen	Fische, Makrozoobenthos, Temperatur, chemische Wasserbeschaffenheit, Abfluss, Sauerstoffgehalt	5	4	4	3	2	3	20
Grundwassergütemessnetz BE	Beurteilung der Grundwasserbeschaffenheit	National	BE	1994	zweimal jährlich	pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Hauptionen, Schwermetalle, Spurenstoffe, mikrobiologische Parameter	4	4	4	4	2	3	20
Überwachung des Grundwassers BB	Landesmessnetz Grundwasserbeschaffenheit & Messnetz zur Überwachung	National	BB	Keine Angabe	Zweimal Jährlich, Pegelstände täglich	Vor-Ort-Parameter, Hauptinhaltsstoffe, Summenparameter, Metalle, Pflanzenschutzmittel,	5	4	4	5	2	2	20

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
	des Grundwasserstandes				oder wöchentlich	Arzneimittel, Künstliche Süßstoffe, weitere organische Schadstoffe							
Grundwasser-Messnetze SL	Überwachung der Grundwassermenge und –güte	National	SL	Keine Angabe	ein- bis viermal jährlich	Schadstoffe, Nährstoffe, Spurenstoffe, mikrobiologisch-hygienische Parameter	4	4	4	4	2	3	20
Hygienisch relevante Mikroorganismen und Krankheitserreger in multifunktionalen Gewässern und Wasserkreisläufen – nachhaltiges Management unterschiedlicher Gewässertypen Deutschlands (FLUSSHYGIENE)	Überwachung des Mikroorganismen-Vorkommens in Badesewässern	National	BE, BY, NW	2015-2018	Keine Angabe	physikalisch-chemische Wasserbeschaffenheit, mikrobielle Indikatororganismen, Krankheitserreger	3	4	3	2	3	4	19,5

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Niedersächsisches Sondermessprogramm zum Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien und von Antibiotikarückständen in niedersächsischen Kläranlagen und Oberflächengewässern	Erkenntnisse zur Belastung der Gewässer durch antibiotikaresistente Erreger, potenzielle Eintragsquellen und Verbreitung von Resistenzen über den Umweltpfad	National	NI	2018-2019	Keine Angabe	Antibiotikarückstände, antitiotikaresistente Bakterien	4	4	5	3	2	3	19,5
Laborschiff MS "Burgund"	Physikalisch-chemische Untersuchung der Gewässer	National	RP	Keine Angabe	Keine Angabe	Temperatur, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt, Nährstoffe, Spurenstoffe	4	5	4	4	3	2	19,5
Aktion Blau Plus	Ökomorphologische Gewässerbewertung	National	RP	1995		Wasserbeschaffenheit	3	5	4	4	2	3	19,5
Untersuchung der Denitrifikation des Grundwassers	Messung des Nitratabbauvermögens	National	ST	Keine Angabe	Keine Angabe	Denitrifikation	4	5	4	4	3	2	19,5
KgM Kleingewässer Monitoring	Pflanzenschutzmittel-Rückstände sowie deren Auswirkung auf die Artenvielfalt	National	Alle	2018, 2019	Keine Angabe	Pflanzenschutzmittel, Wirbellose Wasserorganismen (Fokus auf pestizid-vulnerable Arten)	4	4	4	3	2	3	19

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
GroundCare	Neuartige Methoden für ein Grundwassermonitoring	National	BW, BY, HE, HH, NW, RP, SN	2015-2018	Keine Angabe	Mikrobiologische Kenngrößen (Gesamtzellzahl, intrazelluläres ATP, assimilierbarer organischer Kohlenstoff)	3	3	3	2	3	4	19
Monitoringprogramm Grundwasserbeschaffenheit BY	Überwachung der Grundwasserqualität	National	BY	Keine Angabe	ein- bis zweimal jährlich bzw. in größeren Abständen	pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt, Hauptionen, Schadstoffe, Spurenstoffe	4	4	4	5	2	2	19
Versauerungsmonitoring	Einfluss von Emissionen aus Industrie, Verkehr und Landwirtschaft auf die Umweltkompartimente Boden, Wasser und Luft sowie daraus resultierende Folgen für Flora und Fauna	National	BY	Keine Angabe	Keine Angabe	Diatomeen, Makrozoobenthos, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Temperatur, Schadstoffe	3	4	4	4	2	3	19
Messung der Wasserstände und der Durchflüsse	Eng mit dem Monitoring der Berliner Oberflächenwassergüte verknüpft	National	BE	Keine Angabe	Keine Angabe	Wasserstand, Fließgeschwindigkeit, Durchfluss	5	5	5	4	3	1	19

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Grundwasser-Messnetze SH	Überwachung des Grundwassers	National	SH	Keine Angabe	Keine Angabe	WRRL-Güte, Nährstoffe	5	4	4	4	2	2	19
Grundwasser-messnetz TH	Überwachung der Qualität des Grundwassers	National	TH	Keine Angabe	Kontinuierlich bzw. einmal jährlich	Wasserbeschaffenheit	5	4	4	4	2	2	19
Untersuchung der Wechselbeziehungen von toxinbildenden Cyanobakterien und Wasserqualität in Talsperren unter Berücksichtigung sich verändernder Umweltbedingungen und Ableitung einer nachhaltigen Bewirtschaftungsstrategie (CYAQUATA)	Entwicklung von Cyanobakterien und ihrer Toxine	National	BE, SN	2015-2018	Keine Angabe	Cyanobakterien, deren genetisches Potenzial zur Toxinbildung	2	3	3	2	3	4	18
Güteklassifikation von rückgestauten planktondominierten Fließgewässern	Überwachung der biologischen Güte rückgestauter Gewässer	National	BE	Keine Angabe	Keine Angabe	Chlorophyll a-Gehalt	3	4	4	4	3	2	18

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Monitoring der chemisch-physikalischen Gewässergüte	Wasserbeschaffenheit der Berliner Fließgewässer	National	BE	Keine Angabe	Keine Angabe	Sauerstoffgehalt, Temperatur, Nährstoffe, Schadstoffe, Spurenstoffe	5	4	4	3	2	2	18
Grundwasser-Monitoring HB	Erfassung der Grundwasserqualität	National	HB	Seit 1986	zweimal jährlich bzw. in größeren Abständen	pH-Wert, Temperatur, elektrische Leitfähigkeit, Haptionen, Schwermetalle, Spurenstoffe,	4	4	4	4	2	2	18
Bestimmung der Gewässerchemie	Wird im Fall von lokalen und aktuellen Erfordernissen durchgeführt, chemische Überwachung der Oberflächengewässer, der technischer Bäder und Trinkwasserentnahmestellen nach dem Infektionsschutzgesetz	National	HH	Keine Angabe	Keine Angabe	Verschieden	5	4	4	4	3	1	18
Messnetz Grundwasser RP	Messung von Grundwasserstand und Grundwasserbeschaffenheit	National	RP	Keine Angabe	Täglich bzw. In regelmäßigen Abständen	Wasserstand, Wasserbeschaffenheit	5	5	5	4	2	1	18

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Nährstoffeinträge in das Grundwasser und Oberflächengewässer in Sachsen-Anhalt	Zustandsanalyse der Nährstoffeinträge in das Grundwasser	National	ST	2023	Keine Angabe	Nährstoffe	3	5	5	4	2	2	18
Nährstoff- und Schadstoffbelastung der Gera 2015 – 2017	Untersuchung der Belastung durch Nähr- und Schadstoffe	National	TH	2015-2017	Keine Angabe	Nährstoffe, Schadstoffe	4	4	4	4	2	2	18
Vergleich klassisches Bestimmungsverfahren vs. genetische Verfahren für die Bewertung von Makrozoobenthos	Verwendung von Hochdurchsatzsequenzierung zum Gewässermonitoring	National	BY, NW	2019-2020	Keine Angabe	Makrozoobenthos	1	4	3	2	3	4	17,5
Danube Sediment	Sediment- und Wassermanagement der Donau	International	BY	2017-2019	Keine Angabe	Sedimenthaushalt, Sedimentfracht, Wasserbeschaffenheit	3	4	4	5	3	1	17
Bootgestütztes Messsystem für die Erfassung longitudinaler Gewässerprofile der Morphometrie, Wasserqualität und Hydrologie als Teil eines	Überwachung der Wasserqualität von Kleingewässern	National	MV, SN	2015-2018	Keine Angabe	Ökologische und chemische Wasserbeschaffenheit, Morphometrie, Hydrologie	2	3	3	2	4	3	17

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
integrierten Gewässermonitorings (BOOT-Monitoring)													
Elbe 2020	Auswirkungen von hydro-meteorologischen Extremereignissen sowie der Einträge von Nähr- und Schadstoffen, Nutzung des „Modular Observation Solutions for Earth Systems“ (MOSES)	National	NI, SH	2017-2022	Keine Angabe	Temperatur, Sauerstoffgehalt, Nährstoffe, Schwermetalle, Phytoplankton, Tidenzyklus	3	4	4	2	2	3	17
Modellregion Schlei	Monitoring zur Erfassung der Nährstoffkonzentrationen	National	SH	Keine Angabe	Keine Angabe	Nährstoffe	3	4	4	3	3	2	17
Überwachung der Badegewässerqualität BB	Brandenburgische Badegewässerverordnung	National	BB	Keine Angabe	Monatlich (innerhalb der	Hygienische Parameter	4	3	4	4	2	3	16,5

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
					Badesaison)								
Masterplan Ems 2050	Maßnahmen zur Verbesserung des Zustandes der Natura 2000-Gebiete an der Ems	National	NI	2015-2050	Kontinuierlich	Salzgehalt, Temperatur, Sauerstoffgehalt, Flüssigschlickdynamik, Tiefenprofil, Strömungen	4	5	4	4	2	1	16,5
Erfassung der Wasserqualität und Wasserflächenausdehnung von Binnengewässern durch Fernerkundung (BIGFE)	Erdbeobachtungssatelliten-gestütztes Gewässermonitoring	National	BW, SN	2021-2024	Täglich bzw. wöchentlich	Wasserqualität, Wasserflächenausdehnung	5	1	1	2	4	2	16
Satellitendaten für das behördliche Gewässermonitoring von Trübung und Chlorophyll (WasMon-CT)	Implementierung eines satelliten-gestützten Gewässermonitorings	National	BW	2015-2018	Keine Angabe	Chlorophyll a-Gehalt	5	1	1	2	4	2	16
Satellitenbasiertes Monitoring von Seen in Baden-	Ermittlung der Wasserqualität mithilfe von Satelliten	National	BW	2019-2022	Keine Angabe	Chlorophyll a-Gehalt, Trübung, Sichttiefe, Temperatur, Cyanobakterien	5	1	1	2	4	2	16

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Württemberg (SAMOSEE-BW)													
Sondermessprogramme HH	Monitoring in Schwimmbädern, vor Sportgroßveranstaltungen, bei Havarien, Fischsterben oder hydrologischen Extremereignissen	National	HH	Verschieden	Verschieden	Verschieden	2	3	3	2	3	3	16
Orientierende Messungen gefährlicher Stoffe	Monitoring der Fließgewässer, Abwässer und Klärschlämme	National	HE	1991-2003	Keine Angabe	Organische Spurenstoffe	4	4	4	4	2	1	16
Belastung von Gewässern durch Schadstoffe	Untersuchungen zum Vorhandensein gefährlicher Stoffe an Oberflächengewässern	National	HE	2001-2006	Keine Angabe	Schadstoffe	4	4	4	4	2	1	16
Suspect- und Non-Target-Screening von Wasserproben mittels LC-HRMS	Kläranlageneinleitungen in Gewässer und dadurch bedingte Spurenstoffeinträgen	National	HE	2015	Keine Angabe	Schadstoffe, Spurenstoffe, Nährstoffe	3	4	4	3	2	2	16

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Spurenstoffeinträge in das Grundwasser durch Kläranlageneinleitungen für das Hessische Ried	Beprobung kommunaler Kläranlagen und Bewertung in Hinblick auf den Grundwasserschutz	National	HE	2016	Keine Angabe	Schadstoffe, Spurenstoffe, Nährstoffe	3	4	4	3	2	2	16
Radioaktivitätsmonitoring	Radioaktivitätsbestimmung in den Gewässern, dem Abwasser und dem Grundwasser	National	RP	Keine Angabe	Keine Angabe	Radioaktivität	4	5	5	3	2	1	16
Altersbestimmung von oberflächennahem Grundwasser mit erhöhten Nährstoffkonzentrationen	Nur sehr langsame Verbesserung des Grundwassers, obwohl konkrete Maßnahmen zur Verminderung der Nährstoffeinträge umgesetzt wurden	National	ST	2020-2022	Keine Angabe	Altersbestimmung	3	5	5	4	2	1	16

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Auswirkungen hydromorphologischer Veränderungen von Seeufern (Bodensee) auf den Feststoffhaushalt, submerse Makrophyten und Makrozoobenthos-Biozönosen mit dem Ziel der Optimierung von Mitigationsstrategien (HyMoBioStrategie)	Veränderungen in der Uferzone des Bodensees	National	BW, NW, SL	2015-2018	Keine Angabe	Wellen, Strömungen, Feststoffhaushalt, Unterwasservegetation, Makrophyten, Makrozoobenthos	2	4	3	2	2	3	15,5
Alarmpläne Gewässerökologie Bayern	Frühzeitigen Erkennung kritischer ökologischer Verhältnisse	National	BY	Keine Angabe	Keine Angabe	Temperatur, Sauerstoffgehalt, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Nährstoffe, Abfluss, Trübung, Chlorophyll a-Gehalt, Makrozoobenthos	3	4	3	1	2	3	15,5
Gewässerzustandsbezogenes Monitoring und Management (River-View)	Entwicklung eines ferngesteuerten Trägerboots zur Durchführung eines	National	BE, BY, NW, ST	2015-2018	Keine Angabe	Temperatur, Sauerstoffgehalt, Trübung, elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert, Redoxpotential, suspendierte Stoffe	2	3	3	2	4	2	15

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
	gewässerzustandsbezogenen Monitorings												
Belastung von Fischen mit Umweltchemikalien	Erfassung von Umweltkontaminanten in hessischen Gewässern	National	HE	1999-2000	Keine Angabe	Lipophile Fremdstoffen in Fischen	4	4	4	3	2	1	15
Biota-Monitoring	Schadstoffuntersuchung von Fischen und Muscheln	National	TH	Seit 2013	Einmal jährlich	Schadstoffe	4	4	4	3	2	1	15
Pflanzenschutzmittel in ausgewählten Thüringer Flüssen und Bächen	Erfassung des Eintrags von gewässerschädlichen Pflanzenschutzmitteln	National	TH	Seit 2016	12-mal jährlich	Pflanzenschutzmittel	4	4	4	3	2	1	15
Sondermessprogramm Pharmazeutische Spurenstoffe	Messung der Konzentration verschiedener Pharmazeutika	National	TH	2016-2019	sechs- bis zwölfmal jährlich	Arzneimittel	4	4	4	3	2	1	15
Gütemessprogramm für hydrologische Extremereignisse an der Elbe	Sondermessprogramm bei Hoch- oder Niedrigwasserereignissen	National	BB, HH, NI, SN, ST	Zuletzt 2019	Keine Angabe	Wasserbeschaffenheit, Hauptionen, Nährstoffe, Schwermetalle, Schadstoffe, Spurenstoffe, biologische und bakteriologische Kenngrößen	2	4	3	1	2	3	14,5

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Aquatische Bio-testverfahren	Ökotoxikologische Untersuchung von Abwasser-, Oberflächenwasser- und Deponiesickerwasserproben	National	HH	Keine Angabe	Keine Angabe	Wirkung von chemischen Substanzen auf Wasserorganismen	4	4	3	3	2	1	14,5
Gewässerüberwachung der Kaliindustrie	Beurteilung der chemischen Wasserqualität	National	HE	2008	Kontinuierlich bzw. Monatlich	Chemische Wasserbeschaffenheit	3	4	4	3	2	1	14
Erfassung der Einträge von Pestiziden aus Kläranlagen und Siedlungsentwässerungen in Hessen	Bewertung des Einflusses von Kläranlagenabläufen auf den Eintrag von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen in Fließgewässer	National	HE	2022	Keine Angabe	Pflanzenschutzmittel	3	4	4	3	2	1	14
Sondermessprogramm zur Beeinflussung von oberflächennahem Grundwasser durch stark belastete kleinere Fließgewässer	Untersuchung des Grundwassers auf Arzneimittelrückstände aus kommunalen Kläranlagenabläufen	National	HE	2005	Keine Angabe	Arzneimittel	3	4	4	3	2	1	14

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Uran-Konzentration im hessischen Grundwasser	Messung der Uran-Konzentration und Uranisotopen-Aktivität	National	HE	2010	Keine Angabe	Uran-Konzentration, Uranisotopen-Aktivität	3	4	4	3	2	1	14
Flutungszentrale Lausitz	Monitoring der Bergbaufolgesehen	National	BB, SN	Seit 2000	Wöchentlich	Wasserbeschaffenheit, Flutungsstand	3	4	3	2	3	1	13,5
Länderübergreifende Auswertung Niedrigwasser 2018 und 2019 Schwarze Elster, Spree und Lausitzer Neiße	Auswirkungen des Niedrigwassers	National	BE, BB, SN, ST	2018, 2019	Keine Angabe	Niederschlag, Wasserstand, Wasserbeschaffenheit	3	4	3	2	3	1	13,5
Untersuchung der Wasserqualität des Rummelsburger Sees	Forschungsprojekt RuBuS, Gutachten „Expositionsanalyse zur gesundheitlichen Risikobewertung der Sedimentbelastung im Rummelsburger See“	National	BE	Seit 2011	Kontinuierlich	Schadstoffe	3	3	4	3	2	1	13,5
Geogene Hintergrundwerte der Hauptbestandteile und Spurenstoffe in hessischen Grundwässern	Untersuchung der Verteilung der geogenen Hintergrundwerte gelöster Inhaltsstoffe	National	HE	2013	Keine Angabe	Geogene Hintergrundwerte von Spurenstoffen	3	3	4	3	2	1	13,5

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Strategie zum Umgang mit anthropogenen Spurenstoffen aus Kläranlagen	Reduzierung von Einträgen umwelt- und gesundheitsrelevanter Substanzen aus Großkläranlagen	National	BE, BB	Seit 2022	Keine Angabe	Spurenstoffe	3	3	3	3	2	1	13
Sondermessprogramm Spurenstoffe	Untersuchung der Oberflächen-gewässer auf Schadstoff-Belastung	National	BW	2022	Keine Angabe	Schadstoffe	2	3	3	3	3	1	13
Flussgebiet Schwarze Elster	Bewertung der bergbaulichen Belastungen im Einzugsgebiet der Schwarzen Elster	National	BB		Keine Angabe	Eisen, Sulfat, pH-Wert	3	5	3	2	2	1	13
Flussgebietsbewirtschaftung Spree, Schwarze Elster und Lausitzer Neiße	Gütemonitoring zur bergbaubedingten Stoffbelastung in Fließgewässern	National	BB	Seit 2019	Keine Angabe	Eisen, Sulfat	3	5	3	2	2	1	13
Strategische Gesamtplan zur Senkung der bergbaubedingten Stoffeinträge in die Spree und deren	Grundlage für den "Bewirtschaftungserlass für Eisen und Sulfat"	National	BB	2015-2019	Keine Angabe	Eisen, Sulfat	2	5	3	2	2	1	12

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Zuflüsse in der Lausitz													
Sondermessprogramm Belastungen von Oberflächengewässern und von aktiven Grubenwassereinleitungen mit bergbaubürtigen PCB	Bewertung der PCB-Belastung aus dem Steinkohlebergbau	National	NW	2015-2018	Keine Angabe	PCB-Gehalt	3	3	3	2	2	1	12
Maßnahmen für einen nachhaltigeren Umgang mit Pestiziden und deren Transformationsprodukten im Regionalen Wassermanagement (MUTReWa)	Pestizid-Belastungen regionaler Gewässer sowie die ökotoxikologischen Auswirkungen	National	BW, NI, SH	2015-2018	Keine Angabe	Pesizid-Belastung sowie deren photo- und biologische Abbaubarkeit, Stoffeigenschaften, Toxizität, Mutagenität und Auswirkungen auf heimische Makrophyten	2	3	3	2	2	1	11
Blaues Band	Entwicklung von Maßnahmen	National	Alle	Seit 2019	Keine Angabe	Keine Angabe							

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA)	Erarbeitung verschiedener Monitoringprogramme und Maßnahmen	National	Alle	Seit 1956	Verschieden	Verschieden							
Systematische Überwachung von SARS-CoV-2 im Abwasser (ESI-CorA)	Entwicklung eines abwasserbasierten COVID-19-Frühwarnsystems	National	Alle	2022	Keine Angabe	Häufigkeit und Dynamik von SARS-CoV-2 Viren							
Flussgebietsgemeinschaften	Umsetzung der WRRL, teilweise auch eigene Monitoringprogramme	National	Verschieden	Verschieden	Verschieden	Verschieden							
Mikroplastik in Binnengewässern Süd- und Westdeutschlands	Vorkommen von Mikroplastik in Binnengewässern	National	BW, BY, HE, NW, RP	2014-2017	Keine Angabe	Konzentration, Größe, Sorte und Form der Kunststoffpartikel							
Orientierende Untersuchungen zur Mikroplastikkontamination in Fließgewässern Thüringens am Beispiel der Saale	Mikroplastikbelastung in Thüringer Fließgewässern	National	BW, BY, HE, NW, RP	2014-2017	Keine Angabe	Konzentration, Größe, Sorte und Form der Kunststoffpartikel							
River Ecosystem Service Index (RESI)	Entwicklung einer integrativen ökologisch-	National	BE, BW, BY, NI, SN	2015-2018	Keine Angabe	Ökosystemdienstleistung							

Monitoringprogramm	Beschreibung	Räumliche Ausdehnung	Beteiligte Bundesländer	Zeitliche Rahmenbedingungen	Probenahmezyklus	Erhobene Parameter	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gewichtete Summe
	ökonomischen Bewertungsgrundlage für den Zustand von Gewässern												

Tab. 23: Zusammenfassung aller recherchierten, neuartigen Monitoringmethoden, die potentiell für eine Erfassung von nGVO in aquatischen Systemen geeignet sind. Die Bewertungen (Punktzahlen) anhand von neun Kriterien zur Eignung für ein nGVO-Monitoring sind angegeben. Die Monitoringmethoden sind in absteigender Reihenfolge gemäß der Gesamtpunktzahl sortiert. Bezüglich der verwendeten Abkürzungen wird auf das Abkürzungsverzeichnis verwiesen.

Methode	Organismengruppe	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Nachverfolgung von nGVO	Messung der Umweltexposition	Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gesamtbewertung
qPCR	Bakterien	5	4	4	5	4	4	5	5	2	38,5
qPCR	Fische	4	4	4	5	4	4	5	5	2	37,5
Barcoding	Fische	5	3	4	5	4	4	5	5	1	37
qPCR	Algen	4	4	4	5	4	4	5	4	2	36,5
Barcoding	Mücken	5	3	4	5	4	4	5	4	1	36
Metabarcoding	Fische	5	4	3	5	3	4	4	5	3	36
qPCR	Mücken	3	4	4	5	4	4	5	4	2	35,5
dPCR	Bakterien	3	5	5	4	4	4	5	4	2	35,5
dPCR	Fische	3	5	5	4	4	4	5	4	2	35,5
Metabarcoding	Bakterien	5	4	3	5	3	4	4	4	3	35
Citizen Science	Mücken	4	4	4	4	3	3	4	5	4	34,5

Methode	Organismengruppe	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Nachverfolgung von nGVO	Messung der Umweltexposition	Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gesamtbewertung
Metabarcoding	Algen	5	4	3	5	3	4	4	3	3	34
dPCR	Algen	2	5	5	4	4	4	5	3	2	33,5
Metabarcoding	Mücken	3	4	3	5	3	4	4	4	3	33
dPCR	Mücken	1	5	5	4	4	4	5	3	2	32,5
Barcoding	Algen	3	3	4	5	4	4	5	2	1	32
LAMP	Bakterien	3	3	3	3	4	3	5	5	1	31,5
Optische und akustische Systeme	Mücken	2	4	4	2	3	2	5	5	4	31
LAMP	Algen	2	3	3	3	4	3	5	5	1	30,5
RPA	Bakterien	2	3	3	3	4	3	5	5	1	30,5
RPA	Algen	2	3	3	3	4	3	5	5	1	30,5
Citizen Science	Fische	1	4	4	3	3	3	4	5	4	30,5
LAMP	Fische	1	3	3	3	4	3	5	5	1	29,5
RPA	Mücken	1	3	3	3	4	3	5	5	1	29,5

Methode	Organismengruppe	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Nachverfolgung von nGVO	Messung der Umweltexposition	Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gesamtbewertung
RPA	Fische	1	3	3	3	4	3	5	5	1	29,5
Optische und akustische Systeme	Algen	2	3	3	3	3	2	4	5	4	29,5
HRM	Fische	2	3	3	3	4	3	4	5	1	29
Optische und akustische Systeme	Fische	1	4	4	2	3	2	4	5	4	28,5
HRM	Bakterien	2	3	3	3	4	3	4	4	1	28
Optische und akustische Systeme	Bakterien	1	3	3	2	3	2	4	5	4	27,5
Citizen Science	Bakterien	1	3	3	2	3	2	4	5	4	27,5
Citizen Science	Algen	1	3	3	2	3	2	4	5	4	27,5
HRM	Mücken	1	3	3	3	4	3	4	4	1	27
HRM	Algen	1	3	3	3	4	3	4	4	1	27

Methode	Organismengruppe	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Nachverfolgung von nGVO	Messung der Umweltexposition	Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gesamtbewertung
Multiplex-PCR	Bakterien	3	3	3	3	3	3	4	3	1	26,5
Multiplex-PCR	Mücken	2	3	3	3	3	3	4	3	1	25,5
Multiplex-PCR	Fische	1	3	3	3	3	3	4	4	1	25,5
MALDI-TOF MS	Mücken	2	2	2	3	3	2	4	5	1	25,5
MALDI-TOF MS	Bakterien	3	2	2	3	3	2	4	4	1	25,5
Multiplex-PCR	Algen	1	3	3	3	3	3	4	3	1	24,5
MALDI-TOF MS	Fische	1	2	2	3	3	2	4	5	1	24,5
MALDI-TOF MS	Algen	1	2	2	3	3	2	4	4	1	23,5
Fernerkundung	Algen	3	1	2	3	1	2	1	5	4	21,5
Fernerkundung	Mücken	2	3	3	1	1	4	1	4	4	21
LFA	Algen	2	2	2	2	2	2	2	5	1	20

Methode	Organismengruppe	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Nachverfolgung von nGVO	Messung der Umweltexposition	Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gesamtbewertung
LFA	Mücken	1	2	2	2	2	2	2	5	1	19
LFA	Bakterien	1	2	2	2	2	2	2	5	1	19
LFA	Fische	1	2	2	2	2	2	2	5	1	19
CRISPR/Cas	Mücken	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
CRISPR/Cas	Bakterien	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
CRISPR/Cas	Algen	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
CRISPR/Cas	Fische	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
ELISA	Mücken	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
ELISA	Bakterien	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
ELISA	Algen	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
ELISA	Fische	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant

Methode	Organismengruppe	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Nachverfolgung von nGVO	Messung der Umweltexposition	Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gesamtbewertung
ELONA	Mücken	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
ELONA	Bakterien	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
ELONA	Algen	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
ELONA	Fische	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
HRCA	Mücken	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
HRCA	Bakterien	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
HRCA	Algen	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
HRCA	Fische	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
MHBMDAA	Mücken	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
MHBMDAA	Bakterien	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
MHBMDAA	Algen	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant

Methode	Organismengruppe	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Nachverfolgung von nGVO	Messung der Umweltexposition	Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gesamtbewertung
MHBMDAA	Fische	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
Mikrosatlliten	Mücken	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
Mikrosatlliten	Bakterien	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
Mikrosatlliten	Algen	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
Mikrosatlliten	Fische	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
NPA	Mücken	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
NPA	Bakterien	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
NPA	Algen	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
NPA	Fische	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
SHA	Mücken	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
SHA	Bakterien	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant

Methode	Organismengruppe	Repräsentativität	Sensitivität	Genauigkeit	Vergleichbarkeit	Nachverfolgung von nGVO	Messung der Umweltexposition	Erfassung der Etablierung von nGVO in der Umwelt	Kosteneffizienz	Umweltrelevanz	Gesamtbewertung
SHA	Algen	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
SHA	Fische	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant
Barcoding	Bakterien	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
LAMP	Mücken	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
Fernerkundung	Bakterien	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
Fernerkundung	Fische	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar

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

DOI 10.19217/skr781