



Gutachten

Identifizierung potenzieller Förderschwerpunkte zu genetischen Sequenzier- und Analysemethoden für das behördliche Monitoring der Bodenbiodiversität

Ina Schaefer, Valentyna Krashevskaya, Cecilia Díaz, Fabian Essfeld, Lukas Beule

Senckenberg Biodiversität und Klima Forschungszentrum, Fraunhofer Institut für
Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, Fachhochschule Südwestfalen



Impressum

Herausgegeben von:

Bundesrepublik Deutschland, vertreten durch das Bundesamt für Naturschutz (BfN)
Nationales Monitoringzentrum zur Biodiversität (NMZB)

Standort des BfN in Leipzig
Alte Messe 6
04103 Leipzig

E-Mail: monitoringzentrum@bfn.de

Internet: www.monitoringzentrum.de

Ausführende Stelle:

Senckenberg Biodiversität und Klima Forschungszentrum (SGN), Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME), Fachhochschule Südwestfalen (FH-SWF)

Verfasst von:

Dr. Ina Schaefer (SGN), Dr. Valentyna Krashevskaya (SGN), Dr. Cecilia Díaz (IME), Dr. Fabian Essfeld (IME), Prof. Dr. Lukas Beule (FH-SWF)

Fachbetreuung:

Helen Ballasus, Dr. Christina Lachmann, Zentrale des Nationalen Monitoringzentrums zur Biodiversität am Bundesamt für Naturschutz

Geschäftszeichen: Z3-53202-StStG-FA-2025-16

Stand: 30.04.2026

Bildnachweis Cover:

Christina Lachmann, Nationales Monitoringzentrum zur Biodiversität, BfN

Zitiervorschlag:

Schaefer I., Krashevskaya, V., Díaz, C., Essfeld, F., Beule, L. (2026). Identifizierung potenzieller Förderschwerpunkte zu genetischen Sequenzier- und Analysemethoden für das behördliche Monitoring der Bodenbiodiversität. Gutachten für das Nationale Monitoringzentrum zur Biodiversität (NMZB). Leipzig, Bundesamt für Naturschutz.

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.19352224>

Diese Veröffentlichung wurde im Auftrag des Bundesamtes für Naturschutz (BfN) im Rahmen eines Vorhabens am Nationalen Monitoringzentrum zur Biodiversität (NMZB) erstellt. Die Auftraggebende Seite übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter. Die in dieser Veröffentlichung geäußerten Meinungen und Einschätzungen liegen in der Verantwortung der jeweiligen Autorinnen und Autoren und geben nicht notwendigerweise die Auffassung der Auftraggebenden und Fachbetreuung wieder.



Dieses Dokument wird unter den Bedingungen der Creative Commons Lizenz Namensnennung 4.0 International (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de>).

Inhaltsverzeichnis

Impressum.....	2
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis.....	5
1 Einleitung	6
1.1 Hintergrund	6
1.2 Aufbau und Struktur des Gutachtens.....	7
1.3 Literaturoauswahl: Grundlage zur Methodenbewertung	8
1.4 Vorgehen bei der Literaturoauswahl	8
2 Aussagekraft und Robustheit der molekularbiologischen Methoden.....	11
2.1 Differenzierte Analyse der Aussagekraft und Robustheit molekularbiologischer Methoden nach Bodenorganismengruppen	13
2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse nach molekularbiologischer Methode	16
2.3 Synthese zur Aussagekraft und Robustheit molekularbiologischer Methoden	20
3 Identifikation von Meilensteinen zur Weiterentwicklung der molekularbiologischen Verfahren	21
3.1 Organismenübergreifende methodische Entwicklungsschritte	22
3.2 Organismenspezifische Entwicklungsschritte molekularbiologischer Methoden	27
4 Entwicklungsschritte genombasierter Analysemethoden.....	38
4.1 Aufbau von Referenzgenomen.....	39
4.2 Standardisierung durchführen	40
4.3 Metatranskriptomikspezifische Entwicklungsschritte.....	41
5 Identifikation von Meilensteinen zur Entwicklung innovativer Auswerteverfahren von Bodenbiodiversitätsdaten	45
5.1 Aussagekraft taxonomiefreier Ansätze evaluieren.....	45
5.2 Evaluation der Analyse funktioneller Gruppen und Merkmale	46
5.3 Automatisierte Bildauswertung zur Anwendungsreife entwickeln.....	46
5.4 Kompetenz im Umgang mit KI-Daten stärken	47
6 Entwicklungsdauer und Kostenschätzung für Fördermaßnahmen zur Anwendbarkeit von molekularbiologischen Methoden und innovativen Auswertungsansätzen im Bodenbiodiversitätsmonitoring.....	50
6.1 Organismenübergreifende Fördermaßnahmen molekularbiologischer Methoden	51
6.2 Organismenspezifische Fördermaßnahmen zur Anwendbarkeit molekularbiologischer Methoden.....	53

6.3	Metagenomik	56
6.4	Metatranskriptomik	56
6.5	Auswerteverfahren.....	58
7	Abschließende Bewertung und Empfehlung	73
7.1	Strategische Entscheidungen zur Sequenzierungstechnologie.....	75
7.2	Standardisierung von Laborschritten und Bioinformatik	76
7.3	Kuratierung und Ergänzung von Referenzdatenbanken.....	77
7.4	Quantifizierung von Bakterien, Archaeen, Pilzen.....	78
7.5	Erweiterte Metagenomik- und Metatranskriptomik-Ansätze	78
7.6	Alternative Auswerteverfahren, taxonomiefreie und funktionale Indizes.....	79
	Gesamtbewertung	80
	Verweis auf bestehende ISO-Richtlinien	81
	Literaturverzeichnis	82
	Anhangsverzeichnis	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Übersicht über die Anzahl und den abgedeckten Zeitraum der 175 als relevant eingestuft und im Gutachten berücksichtigten Publikationen, die als Quellen für die Beurteilung der drei Methoden (Metabarcoding, Metagenomik, Metatranskriptomik) herangezogen wurden.....	10
Abb. 2	Aufschlüsselung der 175 als relevant eingestuften und im Gutachten berücksichtigten Publikationen nach Organismengruppe und eingesetzter Methode.....	11
Abb. 3	Bewertungen der Aussagekraft und Robustheit für die drei molekularbiologischen Methoden und für die Organismengruppen.....	14
Abb. 4	Einsatzreife der molekularbiologischen Methoden basierend auf der Auswertung von 175 als relevant eingestuften und im Gutachten berücksichtigten Publikationen nach eingesetzter Methode und Organismengruppe.....	16
Abb. 5	Zusammenfassung der Bewertungen der Einsatzreife der drei molekularbiologischen Methoden und der Organismengruppen mit Bezug zu den Organismengruppen anhand eines Ampelsystems.	21
Abb. 6	Entwicklung der Sequenzierungskosten pro Megabasenpaar von 2001 bis 2022.....	50
Abb. 7	Zeitlicher Rahmen und Priorisierung der sechs Handlungsfelder für die Weiterentwicklung des molekularbiologischen Bodenbiodiversitätsmonitorings.	80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Organismenübergreifende Bewertung des Metabarcoding.....	26
Tab. 2:	Organismenspezifische Bewertung des Metabarcoding	34
Tab. 3:	Entwicklungsschritte für genombasierte Verfahren.....	43
Tab. 4:	Entwicklungsschritte alternative Auswerteverfahren von Bodenbiodiversitätsdaten.	48
Tab. 5:	Entwicklungsdauer und Kostenschätzung identifizierter Zielbilder.	61

1 Einleitung

Böden sind hochkomplexe Lebensräume und tragen dank ihrer hohen biologischen Vielfalt entscheidend zur Stabilität und Funktionsfähigkeit terrestrischer Ökosysteme bei. Mikroorganismen und wirbellose Tiere übernehmen dabei nicht nur Schlüsselrollen in Nährstoffkreisläufen und im Kohlenstoffhaushalt, sondern haben auch entscheidenden Einfluss auf bodenphysikalische Eigenschaften wie die Bodenstruktur. Bakterien, Archaeen, Pilze, Protisten und wirbellose Bodentiere bilden auf engstem Raum hochkomplexe Lebensgemeinschaften. Durch ihre vielfältigen Interaktionen untereinander sowie mit der belebten und unbelebten Umwelt erbringen sie zentrale Ökosystemleistungen. Diese sind für die Bodengesundheit und das Funktionieren ganzer Ökosysteme unverzichtbar und besitzen zugleich Relevanz für Landwirtschaft, Nahrungsmittelproduktion und Klimaschutz. Der Erhalt der Bodenbiodiversität ist daher ökologisch, gesellschaftlich und ökonomisch von hoher Bedeutung. Umwelteinflüsse wie Klimaveränderungen, die wirtschaftliche Nutzung von Wiesen, Äckern und Wäldern, Pestizid- und Schadstoffeinträge oder Antibiotikarückstände können diese empfindlichen Bodenlebensgemeinschaften nachhaltig stören. Dadurch können die von ihnen erbrachten Ökosystemleistungen erheblich bis unwiederbringlich beeinträchtigt werden, oft mit schwer vorhersehbaren Folgen. Daher ist es neben der Erfassung der Biodiversität ebenso wichtig, die Funktionen und funktionellen Gruppen der Bodenorganismen systematisch zu erfassen, um ein fundiertes Monitoring und eine nachhaltige Bodenbewirtschaftung zu gewährleisten.

1.1 Hintergrund

Für ein wirksames Umweltmonitoring und eine fundierte Bewertung des Bodenzustands ist die regelmäßige Erfassung der biologischen Vielfalt unverzichtbar. Mit der Einführung des EU-Bodenüberwachungsgesetzes (Soil Monitoring Law, EU 2025/2360; Bodenüberwachungsrichtlinie) wurde ein verbindlicher Rahmen geschaffen, der ein EU-weites Monitoring und die Bewertung der Bodengesundheit vorsieht, um bis 2050 gesunde Böden zu erhalten. Bisherige, überwiegend morphologische Monitoringansätze stoßen jedoch angesichts der enormen Artenvielfalt und der begrenzten taxonomischen Expertise an methodische und personelle Grenzen. Nur ein Bruchteil der im Boden lebenden Bakterien, Archaeen und Pilze lässt sich morphologisch bestimmen. Die morphologische Bestimmung von Protisten sowie der überwiegend sehr kleinen Invertebratenfauna ist zeitaufwendig, da bei der Probenahme für verschiedene Organismengruppen unterschiedliche Methoden notwendig sind, um diese effektiv aus der Bodenmatrix zu gewinnen. Zudem erfordert die Bestimmung ein hohes Maß an taxonomischer Expertise. Böden kommen in verschiedenen Nutzungskontexten vor und sind Teil nahezu aller Lebensräume. Ein zeiteffizientes und kosteneffektives Monitoring ihres Zustands und ihrer Entwicklung ist deshalb wichtig, stellt aber zugleich eine Herausforderung dar. Molekularbiologische Verfahren, insbesondere DNA-basierte Ansätze wie das Metabarcoding und die Metagenomik, bieten hier neue Möglichkeiten, Biodiversität effizient und großflächig zu erfassen. Für funktionelle Analysen bieten RNA-basierte Ansätze, wie Metatranskriptomik, neue methodische Ansätze. Gleichzeitig bestehen noch Herausforderungen in Bezug auf Standardisierung, Referenzdatenbanken sowie die quantitative Bestimmung von Häufigkeit (Abundanz) und Biomasse. Darüber hinaus liegen derzeit keine eindeutig definierten Kostenstrukturen vor, die eine klare Trennung zwischen kurzfristigen operativen Aufwendungen

(Probenahme, Labor- und Sequenzierungskosten) und langfristigen strukturellen Kosten (Kuratierung von Referenzdatenbanken, Datenaufbereitung, Auswertung und Interpretation) ermöglichen. Dennoch zeichnen sich diese Technologien durch ein erhebliches Zukunftspotenzial aus, sowohl in Bezug auf die Erhöhung der Datenqualität, die Auswerteverfahren als auch die Integration in behördliche Monitoringprogramme im Sinne nationaler und europäischer Biodiversitätsstrategien.

Das vorliegende Gutachten untersucht daher den aktuellen Stand, die Potenziale und Grenzen molekularbiologischer Verfahren, die DNA oder RNA als Informationsträger nutzen, für den möglichen Einsatz im behördlichen Monitoring der Bodenbiodiversität. Das Gutachten wurde vom Nationalen Monitoringzentrum zur Biodiversität (NMZB) mit dem Ziel beauftragt, Förderschwerpunkte für die Entwicklung einsatzfähiger molekularbiologischer Methoden für das Bodenbiodiversitätsmonitoring zu identifizieren, um die Umsetzung dieser Methoden im behördlichen Monitoring zu erleichtern. Im Fokus stehen repräsentative Organismengruppen für Lebensgemeinschaften im Boden, nämlich **(1) Mikroorganismen**, die Bakterien, Archaeen, Pilze und Protisten umfassen, sowie **(2) Bodenfauna**, die hier Bodeninvertebraten wie Fadenwürmer (Nematoda), Mikroarthropoden, die Springschwänze (Collembola), Hornmilben (Oribatida) und Raubmilben (Gamasina) umfassen, sowie Enchyträen (Enchytraeidae) und Regenwürmer (Lumbricidae) einschließen. Neben der Bewertung der methodischen Eignung werden technologische Entwicklungen, Kostenaspekte und Perspektiven für den Aufbau eines zukunftsfähigen, standardisierbaren und politisch anschlussfähigen Monitoringsystems analysiert.

1.2 Aufbau und Struktur des Gutachtens

Das Gutachten gliedert sich in mehrere, aufeinander aufbauenden Teile, die gemeinsam eine fundierte Bewertung molekularbiologischer Verfahren (DNA- und RNA-basierte Methoden) für das behördliche Monitoring der Bodenbiodiversität ermöglichen. In einem eigenständigen Kapitel wird ergänzend der aktuelle Stand innovativer Auswerteverfahren dargestellt. Diese Auswerteverfahren werden dort konzeptionell eingeordnet und in ihrem Anwendungspotenzial beschrieben. Ihre Bewertung erfolgt anschließend in den thematischen Kapiteln zu den Methoden:

- 1 Untersuchungsgrundlage (Kapitel 1.3–1.4):** Der aktuelle wissenschaftliche Kenntnisstand zu drei molekularbiologischen Verfahren (Metabarcoding, Metagenomik und Metatranskriptomik) wird mittels einer qualitativen Literaturrecherche erfasst.
- 2 Aussagekraft und Robustheit (Kapitel 2):** Die Aussagekraft und Robustheit wird für jedes Verfahren und über alle betrachteten Organismengruppen bewertet. Die Bewertung erfolgt auf Grundlage definierter Kriterien und basiert auf der ausgewählten wissenschaftlichen Literatur.
- 3 Stand der Technik und Bewertung (Kapitel 3–4):** Auf Basis der Auswertung der gesammelten Literatur werden methodische Lücken identifiziert sowie Meilensteine benannt, die zur Weiterentwicklung der molekularbiologischen Verfahren und der Auswertungsprozesse für ein behördliches Monitoring relevant sind.
- 4 Entwicklungsstand alternativer Auswerteverfahren (Kapitel 5):** Dieses Kapitel gibt eine Übersicht über ausgewählte taxonomiefreie sowie KI-gestützte Auswerteverfahren und

ordnet deren Entwicklungsstand und potenziellen Nutzen für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring ein.

- 5 Identifikation von Entwicklungspotenzialen (Kapitel 6):** Die ermittelten Meilensteine werden thematisch zusammengeführt und in einen zeitlichen sowie finanziellen Rahmen überführt, um den voraussichtlichen Förderbedarf für die Weiterentwicklung abschätzen zu können.

Abschließend erfolgt eine fachliche **Gesamteinordnung der Ergebnisse (Kapitel 7)**, mit dem Ziel, eine priorisierte Förderstrategie für einen effektiven Kapazitätsaufbau zu formulieren. Hierbei werden zentrale Meilensteine für die Weiterentwicklung und den zukünftigen, optimalen Einsatz molekularbiologischer Methoden im Rahmen eines zukunftsfähigen behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitorings beschrieben.

1.3 Literatúrauswahl: Grundlage zur Methodenbewertung

Grundlage für die Identifizierung potenzieller Förderschwerpunkte zu genetischen Sequenzier- und Analysemethoden für das behördliche Monitoring der Bodenbiodiversität ist eine gezielte, qualitative Literaturrecherche in *Google Scholar* und *PubMed*, die den Zeitraum von 2006 bis 2025 abdeckt, aber nicht vollständig erschöpft.

Die Recherche erfolgte systematisch mittels einer Bewertungsmatrix (Anhang, Tabelle A1), die die Kombinationen aus Methode (Metabarcoding, Metagenomik, Metatranskriptomik) und Organismengruppe (Bakterien/Archaeen, Pilze, Protisten, Fadenwürmer, Hornmilben, Raubmilben, Springschwänze, Annelida) und Kategorie (Aussagekraft, Robustheit) und Kriterium (siehe Kapitel 2) enthält. Diese Bewertungsmatrix bildet die Grundlage dafür, welche spezifischen Aspekte in der Literatur adressiert sein müssen, damit eine Studie für die Bewertung der Verfahren im Monitoring berücksichtigt werden kann.

1.4 Vorgehen bei der Literatúrauswahl

- 1 Erste Identifikation (breiter Suchkorpus):** Alle Publikationen, die die jeweiligen Suchbegriffe oder Synonyme der Matrix-Kombinationen erfüllten, wurden einbezogen. Dies umfasste Arbeiten zu Metabarcoding, Metagenomik und Metatranskriptomik für alle relevanten Bodenorganismengruppen. Dabei wurden für den Bereich der Metatranskriptomik ausschließlich PCR-freie Ansätze berücksichtigt. RNA-Metabarcoding-Studien flossen nicht in die Literaturrecherche ein, da sich der Begriff Metatranskriptomik in diesem Gutachten ausschließlich auf die direkte Sequenzierung von aus dem Boden extrahierter RNA bezieht.
- 2 Matrixbasierte Prüfung:** Eine Publikation wurde nur dann weiter berücksichtigt, wenn sie mindestens ein Kriterium (siehe Kapitel 2) der Bewertungsmatrix adressierte.
- 3 Taxonomische Mindestanforderung:** Nur Studien mit einer taxonomischen Auflösung auf oder unterhalb der Familienebene wurden einbezogen. Arbeiten mit geringerer taxonomischer Auflösung (zum Beispiel nur „Nematoda“ oder „Collembola“) wurden ausgeschlossen, da sie kein belastbares Monitoring-Kriterium der Matrix erfüllen.
- 4 Priorisierung bestimmter Publikationstypen:** Da es sich um eine qualitative Recherche handelt, wurden Reviews, methodische Synthesen, Validierungs- und Vergleichsstudien bevorzugt. Dies erklärt, warum für einige Organismengruppen (zum Beispiel Bodenbakterien)

trotz sehr großer Literaturlbasis nur wenige, aber methodisch besonders aussagekräftige Studien in die Analyse eingingen.

- 5 Ausschlusskriterien:** Nicht berücksichtigt wurden Publikationen, die zwar Suchbegriffe enthielten, aber keines der Matrix-Kriterien erfüllten, rein ökologische Fragestellungen ohne methodische Bewertung behandelten, oder keine für das Monitoring relevante taxonomische oder funktionelle Auflösung boten.
- 6 Endauswahl:** Nach diesem mehrstufigen Verfahren wurden 175 begutachtete internationale Publikationen in die Bewertung übernommen (Anhang Tabelle A2, Abbildung 1). Diese decken alle Kombinationen der Bewertungsmatrix ab und bilden die Grundlage für die Einschätzung von Aussagekraft, Robustheit, Lücken und Entwicklungsmeilensteinen für jede Organismengruppe und Methode.

Für die Bewertung des Metabarcoding wurden 46 Publikationen ausgewertet, für die Metagenomik 77 Publikationen und für die Metatranskriptomik 70 Publikationen (Abbildung 1A). Der geringere Anteil an Metabarcoding-Publikationen ist gut erklärbar. Metabarcoding ist als Methode bereits weit entwickelt und teilweise etabliert, sodass aktuell weniger grundlegende methodische Arbeiten erscheinen. Zudem existiert zwar eine große Menge an Metabarcoding-Literatur, diese konnte im Rahmen des Gutachtens jedoch stärker gefiltert werden. Viele Studien boten keine ausreichende taxonomische Auflösung oder erfüllten nicht die methodischen Kriterien, die für ein behördliches Monitoring relevant sind. Für die Metagenomik und die Metatranskriptomik hingegen wurden ein größerer Anteil der für die verwendeten Bewertungskriterien relevanten Literatur einbezogen, da der verfügbare Pool kleiner ist. Einige Publikationen behandelten beide genombasierten Ansätze gemeinsam, wodurch diese methodisch mehrfach ausgewertet wurden, was die Zahl der berücksichtigten Auswertungen erhöht.

Die meisten der berücksichtigten Publikationen stammen aus den Jahren 2012 bis 2025 (Abbildung 1B). Ein Anstieg der Veröffentlichungen ist besonders seit 2015 für die Metagenomik zu erkennen, gefolgt von der Metatranskriptomik. Diese Entwicklung spiegelt den raschen technischen Fortschritt, sinkende Sequenzierkosten und sowie die Entwicklung bioinformatischer Analysetools für genombasierte Methoden wider.

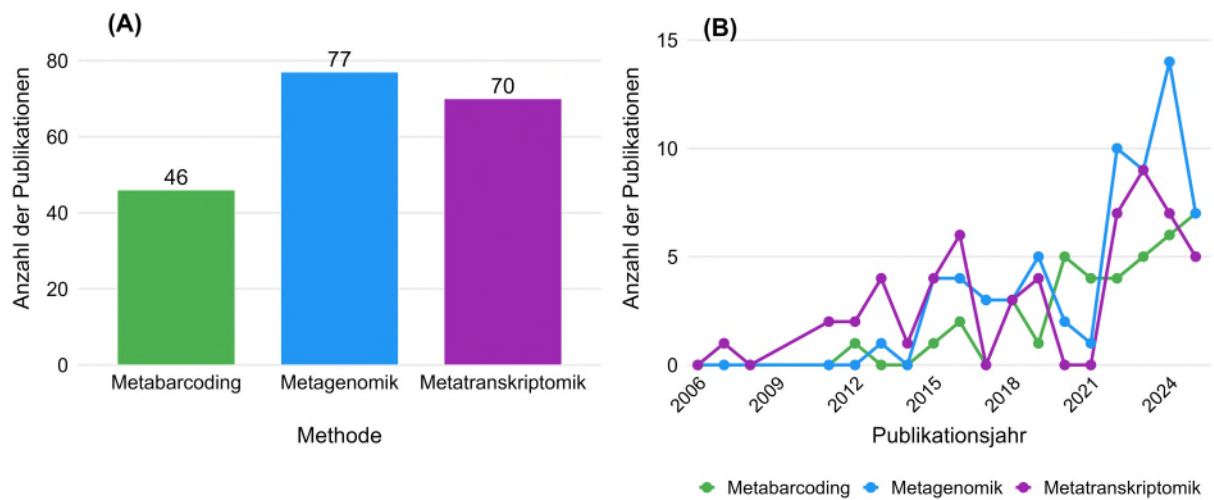


Abb. 1 Übersicht über die Anzahl und den abgedeckten Zeitraum der 175 als relevant eingestuft und im Gutachten berücksichtigten Publikationen, die als Quellen für die Beurteilung der drei Methoden (Metabarcoding, Metagenomik, Metatranskriptomik) herangezogen wurden.

(A) Für Metagenomik und Metatranskriptomik wurden mehr Publikationen angegeben als für Metabarcoding, da einige genom-basierte Studien sowohl Metagenomik als auch Metatranskriptomik behandeln, sodass eine Publikation in beiden Kategorien gezählt wird. (B) Die Publikationen pro Jahr zeigen, dass Metagenomik und Metabarcoding die ältesten Quellen in dieser Auswahl haben, und dass die meisten Publikationen in dieser Auswahl für jede der drei Methoden im Zeitraum zwischen 2022 und 2025 liegen.

Wenn die Anzahl der ausgewählten Publikationen nach Organismengruppe und Methode aufgeschlüsselt wird, zeigt sich ein klares Bild. Die meisten berücksichtigten Publikationen zu Bakterien, Pilzen und Protisten beziehen sich auf die Methoden Metagenomik und Metatranskriptomik (Abbildung 2). In den ausgewählten und analysierten Studien überwog dabei die Anwendung der Metagenomik gegenüber dem Metabarcoding. Bei der Bodenfauna hingegen ergibt sich ein völlig anderes Bild. Zum einen ist die Anzahl der ausgewählten, relevanten Publikationen insgesamt deutlich geringer, insbesondere bei Mikroarthropoden (Springschwänze, Raub- und Hornmilben), aber auch bei Anneliden (Enchyträen und Regenwürmer). Zum anderen wurde in den meisten Publikationen für jedes Taxon überwiegend Metabarcoding angewendet, Metatranskriptomik wurde nur bei Fadenwürmern (5 Referenzen) und für Springschwänze (1 Referenz) angewendet. Dies lässt den Schluss zu, dass molekularbiologische Methoden generell nur selten bei der Bodenfauna zum Einsatz kommen, wobei Metabarcoding hier häufiger verwendet wird als genomische Methoden.

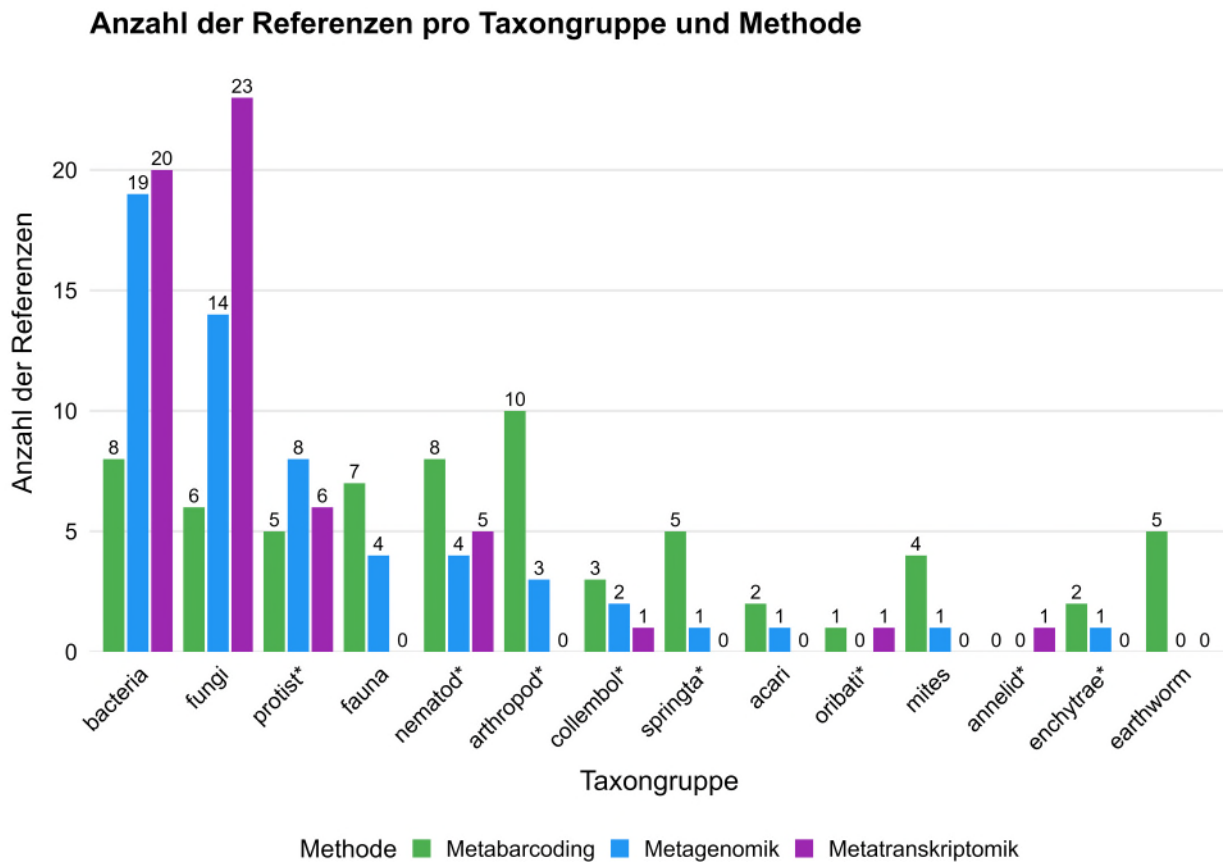


Abb. 2 Aufschlüsselung der 175 als relevant eingestuft und im Gutachten berücksichtigten Publikationen nach Organismengruppe und eingesetzter Methode. Die Aufschlüsselung der Publikationen, die für dieses Gutachten verwendet wurden, nach Organismengruppe und Methode zeigt deutliche Trends. Bei den Bakterien, Pilzen und Protisten wurden zur Metagenomik deutlich mehr Publikationen gefunden als zum Metabarcoding. Im Gegensatz dazu dominiert bei Bodeninvertebraten das Metabarcoding die wissenschaftliche Literatur, während genomische Methoden weniger häufig zum Einsatz kommen. Außer bei Fadenwürmern (Nematoda) sind sowohl metagenomische als auch metatranskriptomische Ansätze bei Bodenfauna nur in wenigen Publikationen vertreten. Für die Analyse wurde die Anzahl der ausgewählten Publikationen in der Literaturdatenbank durch die Verwendung spezifischer Suchbegriffe ermittelt. Dabei wurde die Endung des Taxonnamen bewusst offengelassen, hier angedeutet durch *, um möglichst umfassende Ergebnisse zu erhalten. Interessanterweise ergab die Suche nach dem Begriff „fauna“ keine Ergebnisse für Metatranskriptomik, während für „nematod“ fünf Publikationen gefunden wurden. Zudem zeigt sich, dass die Publikationszahlen je nach eingegebenem Taxon leicht variieren. So macht es beispielsweise einen Unterschied, ob „collembola“ oder „springt“ verwendet wird. Raubmilben wurden in der Literatur unter dem Begriff „acari“ gebündelt.

2 Aussagekraft und Robustheit der molekularbiologischen Methoden

Ziel dieser Auswertung ist es, die Einsatzbereitschaft und die bestehenden Limitationen der drei molekularbiologischen Methoden Metabarcoding, Metagenomik und Metatranskriptomik für ein behördliches Monitoring zu bewerten. Bewertet werden die **(1) Aussagekraft** und die **(2) Robustheit** der drei Methoden. Die Kategorie Praktikabilität wurde nicht als separates Bewertungskriterium berücksichtigt, da sich die Methoden Metabarcoding, Metagenomik und Metatranskriptomik zwar in ihren methodischen Grundlagen und Anforderungen unterscheiden, diese Unterschiede sich jedoch in ihrer Gesamtheit weitgehend ausgleichen. Während Metabarcoding durch eine größere Zahl an Arbeitsschritten charakterisiert ist, erfordern Metagenomik und Metatranskriptomik ein höheres Maß an Erfahrung bei der Extraktion und

Aufreinigung von DNA und RNA, sowie den Analyseverfahren und Auswertungsschritten. Insgesamt bestehen damit keine grundlegenden Einschränkungen in der praktischen Anwendbarkeit, daher stehen die Kriterien Aussagekraft und Robustheit im Vordergrund.

Aufbauend auf der Literaturrecherche wurden insbesondere das Abstract, die Abschnitte Material und Methoden, die Ergebnisse sowie gegebenenfalls die Diskussion der Publikationen gelesen und ausgewertet. In einer Tabelle (Anhang, Tabelle A1) wurde pro Methode für jede Organismengruppe die Aussagekraft und Robustheit ausgewertet. Die Kriterien für **Aussagekraft** sind untergliedert in:

- 1 quantitative Arterfassung,
- 2 funktionelle Analysen (zum Beispiel aus Sequenzinformationen),
- 3 Zustand der Referenzdatenbanken (kuratiert, taxonomische Breite),
- 4 taxonomische Auflösung und die
- 5 Verfügbarkeit funktioneller Informationen (zum Beispiel über funktionelle oder trophische Gruppen).

Kriterien für die **Robustheit** waren untergliedert in:

- ▶ Reproduzierbarkeit,
- ▶ Standardisierbarkeit,
- ▶ Interkalibrierbarkeit und die
- ▶ Vergleichbarkeit der Daten über lange Zeiträume unter Berücksichtigung technologischer Innovationen.

Zuerst wurden die Ergebnisse der Literatur pro Kriterium sprachlich zusammengefasst und eine erste Bewertung eingetragen. Die **Bewertung** erfolgte in den Kategorien:

- ▶ **A** (Entwicklungsstadium),
- ▶ **A/B** (Übergangsstadium),
- ▶ **B** (robust, aber nicht standardisiert),
- ▶ **B/C** (weit fortgeschritten) und
- ▶ **C** (einsatzbereit).

Die beteiligten Sachverständigen hatten die Methoden beziehungsweise Organismengruppen untereinander aufgeteilt und nahmen in ihrem jeweiligen Zuständigkeitsbereich zunächst eine eigenständige Bewertung vor. Die so erarbeiteten Einzelbewertungen wurden anschließend im Kreis aller Sachverständigen diskutiert und harmonisiert, um eine konsensbasierte und möglichst objektive Gesamtbewertung zu gewährleisten. Die finalen Bewertungen wurden für jede Methode und Organismengruppe als Säulendiagramme ausgewertet. Die Ergebnisse werden anhand von vier Abbildungen (Abbildung 3A–D) dargestellt und erläutert. Der Anteil der in die Bewertung einbezogenen Publikationen variiert dabei deutlich zwischen den Methoden und Organismengruppen und wird zur besseren Vergleichbarkeit als Anteil (Prozentwert) angegeben.

Die Bewertung basiert auf der prozentualen Verteilung aller relevanten Publikationen in den fünf Bewertungsstufen A, A/B, B, B/C und C. Für jede molekularbiologische Methode wurden alle Studien, die mindestens ein Kriterium zur Aussagekraft beziehungsweise Robustheit, erfüllten,

einer dieser Kategorien zugeordnet. Anschließend wurden die relativen Anteile pro molekularbiologische Methode berechnet. Die in diesem Kapitel dargestellten Prozentwerte sind somit Summenbewertungen über alle Kriterien hinweg, die die Gesamtposition der Methode im Spektrum zwischen Entwicklungsstadium und Einsatzbereitschaft widerspiegeln.

Metabarcoding weist unter den drei untersuchten molekularbiologischen Methoden die höchste Anwendungsreife auf (Abbildung 3A, 3B). In rund 13 % der Studien wird die Aussagekraft von Metabarcoding als einsatzbereit (Bewertung C) eingestuft, weitere 4 % als weit fortgeschritten (B/C), und etwa 15 % der Bewertungen ordnen die Methode als robust, jedoch noch nicht vollständig standardisiert ein (B). Metabarcoding weist ebenfalls die besten Bewertungen für die Robustheit auf, was durch Ringversuche sowie durch weit verbreitete und standardisierte Protokolle gestützt wird. Metagenomik und Metatranskriptomik erreichen bei der Aussagekraft die Bewertungsstufe „einsatzbereit“ deutlich seltener, werden aber häufig als „weit fortgeschritten“ oder „robust, aber nicht standardisiert“ bewertet. Ihre Robustheit wird hingegen deutlich häufiger im Entwicklungsstadium eingeschätzt, was die Eignung für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring einschränkt. Metatranskriptomik erzielt dabei die geringste Einsatzbereitschaft, was vor allem auf die Instabilität der RNA und die fehlende Interkalibrierung zwischen Studien zurückzuführen ist. Die Methode wird bislang überwiegend in Forschungsprojekten eingesetzt.

2.1 Differenzierte Analyse der Aussagekraft und Robustheit molekularbiologischer Methoden nach Bodenorganismengruppen

Die **Aussagekraft** molekularbiologischer Analysemethoden unterscheidet sich deutlich zwischen den Organismengruppen (Abbildung 3C). Bei Bakterien/Archaeen und Pilzen dominieren die Einstufungen „einsatzbereit“ und „weit fortgeschritten“, während diese Bewertungen bei Protisten und Gruppen der Bodenfauna (Enchyträen, Regenwürmer, Fadenwürmer, Springschwänze, Horn- und Raubmilben) weitgehend fehlen. Bakterien erreichen insgesamt 89 % der Bewertungen in den Kategorien „einsatzbereit“ (33 %) und „weit fortgeschritten“ (56 %). Für Pilze liegt der Anteil in diesen Kategorien bei 44 % (jeweils 22 %). Damit sind die molekularbiologischen Methoden für Bakterien und Pilze am weitesten entwickelt und grundsätzlich für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring einsetzbar.

Bei Protisten und Fadenwürmern zeigen die Methoden bereits eine gewisse methodische Reife, es fehlen jedoch standardisierte Anwendungen. Für Enchyträen ist ein Drittel der Bewertungen in der Kategorie „robust, aber nicht standardisiert“. Bei Regenwürmern und Mikroarthropoden (Springschwänze, Horn- und Raubmilben) liegen die Bewertungen deutlich niedriger. Über die Hälfte der Studien ordnet diese Organismengruppen in die Kategorie „Entwicklungsstadium“ ein, was zeigt, dass die Methoden zwar grundsätzlich anwendbar sind, aber noch weiterentwickelt werden müssen. Ein wesentlicher Grund für das Fehlen der Bewertungen „einsatzbereit“ und „weit fortgeschritten“ bei diesen Gruppen liegt in der unzureichenden qualitativen Arterfassung (zum Beispiel geringe Anzahl nachgewiesener Arten) sowie in der begrenzten taxonomischen Auflösung (oft nur Trennung auf Ordnung- oder Familienebene). In den meisten Studien werden die molekularbiologischen Daten lediglich auf Ordnungs-, Familien- oder Gattungsebene ausgewertet. Außerdem berichten viele Arbeiten, dass ein erheblicher Anteil der genetischen Sequenzen (Reads) nicht mit bestehenden Datenbanken abgeglichen werden konnte.

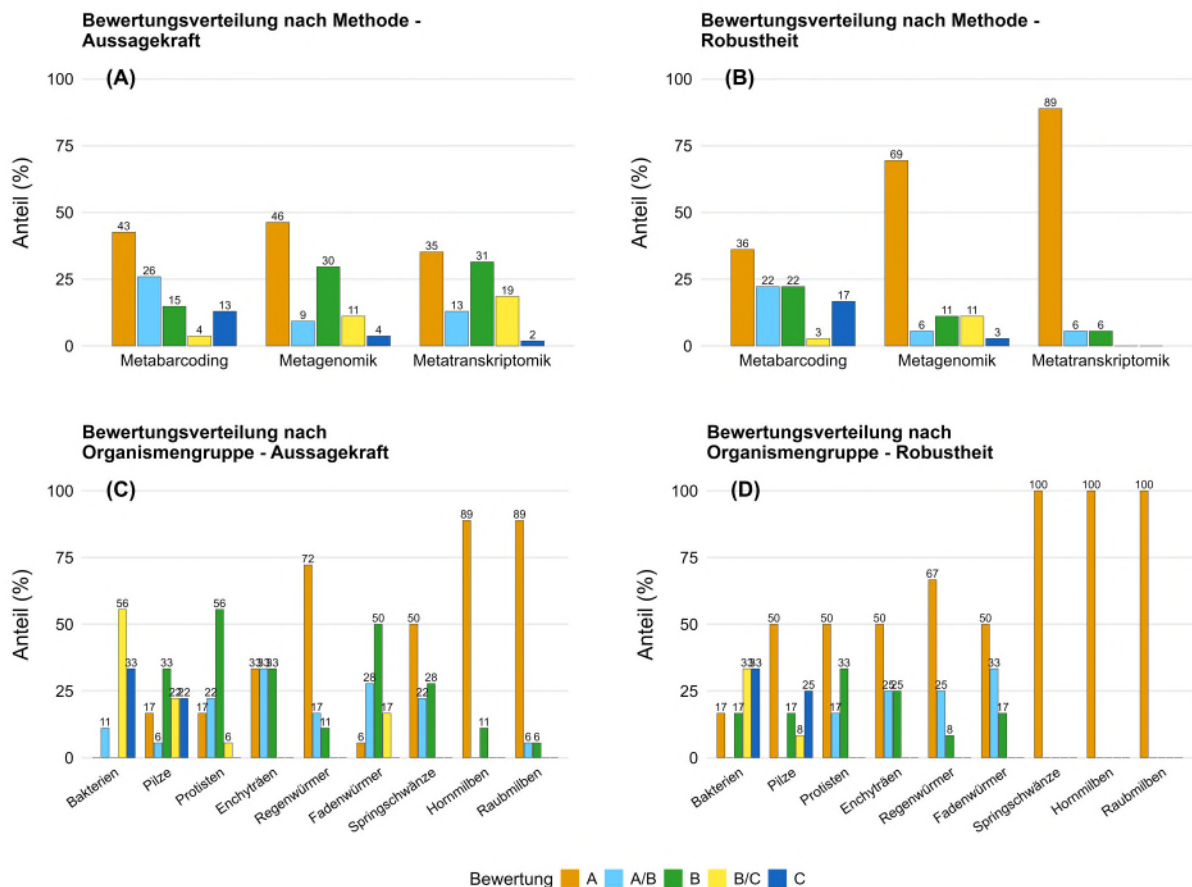


Abb. 3 Bewertungen der Aussagekraft und Robustheit für die drei molekularbiologischen Methoden und für die Organismengruppen. (A) Die Bewertung zur Aussagekraft in den Kategorien A-C ergibt sich aus den Kriterien wie zuverlässig qualitative und quantitative Arterfassungen, taxonomische Auflösung, sowie die Verfügbarkeit funktioneller Informationen und der Zustand der Referenzdatenbanken (kuratiert, taxonomische Breite) derzeit sind, und hat die meisten Bewertungen für B und B/C bei Metabarcoding. (B) Die Robustheit der drei Methoden ergibt sich aus der gesamtheitlichen Bewertung wie zuverlässig Reproduzierbarkeit, Standardisierbarkeit, Interkalibrierbarkeit und die Vergleichbarkeit der Daten über lange Zeiträume in Abhängigkeit von schnell voranschreitenden technologischen Innovationen sind, und zeigt für Metabarcoding die besten Bewertungen. (C) Wenn die Aussagekraft der drei Methoden nach Organismengruppe getrennt wird, zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen mikrobiellen und tierischen Taxa. Die Aussagekraft der Methoden ist bei Bakterien und Pilzen am höchsten, gefolgt von Protisten und Fadenwürmern. (D) Die Robustheit der Methoden getrennt nach den verschiedenen Organismengruppen zeigt ebenfalls einen deutlichen Unterschied zwischen Mikroorganismen und Bodeninvertebraten. Für Bakterien und Pilze sind die molekularbiologischen Methoden zu einem großen Teil weit fortgeschritten und einsatzbereit, für Protisten, Fadenwürmer, Enchyträen und Regenwürmer kann von robusten Methoden gesprochen werden, für die jedoch die Standardisierung noch fehlt. Für Spingschwänze, Horn- und Raubmilben sind die Methoden jedoch noch im Entwicklungsstadium.

Die Bewertung der **Robustheit** molekularbiologischer Methoden zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Organismengruppen und lässt sich in drei Gruppen einteilen (Abbildung 3D). Für Bakterien und Pilze sind die Methoden bereits relativ robust. Protisten, Fadenwürmer und Annelida weisen ebenfalls eine robuste Methodik auf, es fehlen jedoch noch Standardisierungen. Bei Mikroarthropoden (Spingschwänze, Horn- und Raubmilben) befindet sich die Methodik hingegen noch im Entwicklungsstadium.

Für Bakterien wird die hohe Robustheit durch 66 % der Bewertungen in den Kategorien „einsatzbereit“ und „weit fortgeschritten“ (jeweils 33 %) bestätigt (Abbildung 3D). Bei Pilzen fällt die Robustheit etwas geringer aus, mit insgesamt 33 % der Bewertungen im Bereich „einsatzbereit“ (25 %) und „weit fortgeschritten“ (8 %). Für Protisten, Fadenwürmer, Enchyträen und Regenwürmer fehlen Bewertungen der Kategorie „weit fortgeschritten“. Die Methoden befinden sich für diese Taxa überwiegend im Übergang zu einer robusten und standardisierten Anwendungsreife.

Bei den Mikroarthropoden fehlen Bewertungen in den Kategorien „robust“, „robust, aber nicht standardisiert“, „weit fortgeschritten“ und „einsatzbereit“, sodass keine Aussagen zur Robustheit möglich sind. Dieses Defizit liegt daran, dass molekularbiologische Untersuchungen der Bodenfauna bislang nur vereinzelt, stark systemspezifisch und geografisch isoliert durchgeführt wurden. Wiederholte Studien in vergleichbaren Systemen fehlen bislang, sodass die Robustheit der Methoden für diese Organismengruppen derzeit unklar bleibt.

Zur übersichtlichen Darstellung der methodischen Bewertung der **Aussagekraft** wurde eine Heatmap erstellt (Abbildung 4A), die die Ergebnisse für die einzelnen Organismengruppen und Methoden anhand der Bewertungskategorien „einsatzbereit“ und „weit fortgeschritten“ zeigt. Die Auswertung verdeutlicht, dass insbesondere die Metagenomik von Bakterien (100 %) sowie Metabarcoding und Metatranskriptomik (jeweils 83 %) einen hohen Anteil fortgeschrittener Bewertungen aufweisen. Dabei hängt die Aussagekraft metagenomischer Analysen stark von der Fragestellung und vom Entwicklungsstand der Referenzdatenbanken ab: Für Gene des Stickstoffkreislaufs oder Antibiotikaresistenzen sind gut kuratierte Daten verfügbar, während für viele andere Gene und bislang wenig charakterisierte bakterielle Taxa Wissenslücken bestehen.

Für Pilze befinden sich Metabarcoding und Metatranskriptomik (jeweils 50 %) in einem fortgeschrittenen Anwendungsstadium, Metagenomik erreicht nur 33 %. Alle übrigen Kombinationen liegen deutlich niedriger. Bei Protisten zeigt Metatranskriptomik (17 %) erste aussagekräftige Anwendungen. Für Fadenwürmer befinden sich Metatranskriptomik (33 %) und Metabarcoding (17 %) im fortgeschrittenen, jedoch noch nicht standardisierten Stadium. Bei Springschwänzen, Horn- und Raubmilben, Enchyträen und Regenwürmern sind die Methoden noch nicht einsatzfähig, da sie sich entweder im Entwicklungsstadium befinden oder Standardisierungen fehlen. Damit wird deutlich, dass die Aussagekraft DNA- und RNA-basierte Verfahren für das behördliche Monitoring vor allem für mikrobielle Systeme bereits anwendbar ist.

Die Heatmap zur Übersicht der Robustheit molekularbiologischer Methoden für die einzelnen Organismengruppen (Abbildung 4B) zeigt, dass Metabarcoding und Metagenomik für Bakterien bereits sehr robust (100 %) und somit einsatzbereit für das behördliche Monitoring sind. Bei Pilzen ist die Robustheit von Metabarcoding mit 75 % solide, während die Metagenomik nur 25 % erreicht; beide Methoden sind daher aufgrund fehlender Standardisierung noch nicht endgültig einsatzbereit. Für alle anderen Organismengruppen und für die Metatranskriptomik ist die Robustheit derzeit noch nicht ausreichend für den Einsatz im behördlichen Biodiversitätsmonitoring.

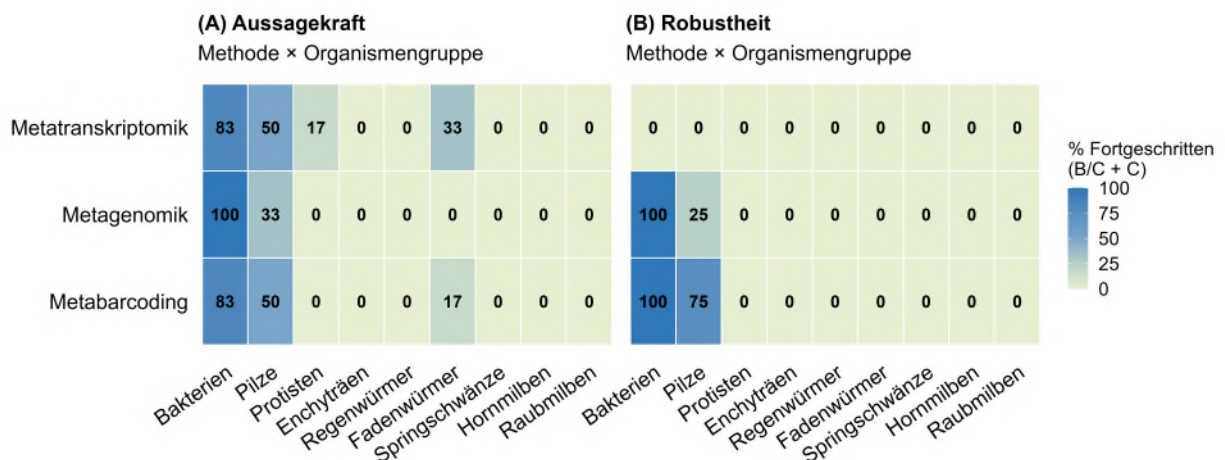


Abb. 4 Einsatzreife der molekularbiologischen Methoden basierend auf der Auswertung von 175 als relevant eingestuft und im Gutachten berücksichtigten Publikationen nach eingesetzter Methode und Organismengruppe. Die Heatmap zeigt pro Kombination (Methode × Organismengruppe) den Anteil fortgeschrittener Bewertungen (B/C + C, in %) und verdeutlicht, dass die (A) Aussagekraft der drei molekularbiologischen Methoden für Bakterien und Pilze sehr hoch bis solide ist, gefolgt von Protisten und Fadenwürmern, bei denen die Aussagekraft zwar vorhanden, aber noch limitiert ist. (B) Die Robustheit der drei Methoden hingegen ist bisher nur für Metabarcoding und Metagenomik von Bakterien etabliert. Für Pilze ist die Robustheit von Metabarcoding solide, aber für Metagenomik noch wenig etabliert. Alle anderen Organismengruppen sind nach dieser Bewertung der Robustheit im Entwicklungsstadium oder Übergangsstadium zu robust, aber noch nicht standardisiert. Farbcodierung der Entwicklungsstufen: dunkelblau = hohe Einsatzreife, hell = geringe Einsatzreife. Die Zahlen in den Kacheln geben den Prozentwert an.

2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse nach molekularbiologischer Methode

2.2.1 Metabarcoding: Stärken und Schwächen

Metabarcoding zeigt die höchste Einsatzreife unter den drei verglichenen molekularbiologischen Methoden. Besonders überzeugend ist die Methode bei der Analyse von Bakterien, für die sie eine Bewertung von überwiegend „weit fortgeschritten“ oder „einsatzbereit“ (B/C–C) erreicht. Auch Pilze schneiden mit Bewertungen von überwiegend „robust, aber nicht standardisiert“, „weit fortgeschritten“ und „einsatzbereit“ (B–B/C–C) vergleichsweise gut ab. Dies ist vor allem auf die Kombination aus gut kuratierten Referenzdatenbanken, wie zum Beispiel SILVA für Bakterien und UNITE für Pilze, sowie standardisierten PCR-Markern (16S rRNA für Bakterien, ITS für Pilze) zurückzuführen. Diese Voraussetzungen ermöglichen verlässliche qualitative und semiquantitative Ergebnisse. Ein weiterer Vorteil von Metabarcoding ist seine Kosteneffizienz, Skalierbarkeit und laborübergreifende Reproduzierbarkeit. Diese Eigenschaften machen die Methode besonders geeignet für Monitoringprogramme mit hohen Probendurchsätzen.

Die Anwendbarkeit molekularbiologischer Methoden befindet sich für Protisten, Nematoden, Enchyträen und Regenwürmern teilweise im Übergang zu einer vielversprechenden Methodik. Dies zeigt sich im Fehlen der Bewertung „einsatzbereit“ (C) aber dem großen Anteil der Bewertung „robust, aber nicht standardisiert“ (B). Für Protisten und Nematoden wird die Methode zum Teil bereits als „weit fortgeschritten“ (B/C) eingestuft. Für Enchyträen und Regenwürmer ist der Anteil der Bewertungen „Entwicklungsstadium“ relativ häufig vertreten. Für Mikroarthropoden (Springschwänze, Horn- und Raubmilben) befinden sich die

molekularbiologischen Methoden hingegen noch im „Entwicklungsstadium“ (A). Die Hauptursachen hierfür lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ▶ **Primer-Bias**, der zu einer verzerrten, beziehungsweise unvollständigen Erfassung der Zielorganismen oder der Gesamtbiodiversität führen kann.
- ▶ **Fehlende Standardisierung bei der Verwendung von Primern und Barcodes** innerhalb der jeweiligen Organismengruppen. So werden für eine Organismengruppe unterschiedliche Gene sowie verschiedene Primer für dasselbe Gen eingesetzt, wodurch die erhobenen Daten nur begrenzt vergleichbar sind.
- ▶ **Unvollständige und unzureichend kuratierte Referenzdatenbanken**, insbesondere für Protisten (PR2) sowie für Bodenfauna (BOLD, NCBI).
- ▶ **Heterogene Studienbedingungen**, da die meisten Arbeiten zur Bodenfauna aus unterschiedlichen Ländern und Lebensraumtypen stammen. Diese methodische und ökologische Vielfalt erschwert einen direkten Vergleich der Ergebnisse.

Bewertungen der Kategorien „robust“ und „robust, aber nicht standardisiert“ (A/B–B) für Springschwänze sowie Horn- und Raubmilben zeigen, dass diese Methode grundsätzlich Potenzial für diese Organismengruppen besitzt. In den untersuchten Veröffentlichungen war die Zuordnung von Artnamen anhand molekularbiologischer Daten für Mikroarthropoden jedoch kaum möglich. Für Enchyträen und Regenwürmer ist die Artzuordnung hingegen deutlich robuster (Jänsch et al. 2023; Cuartero et al. 2025a, b; Jänsch et al. 2025). Ende Januar 2025 wurde die Referenzdatenbank Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) im Rahmen des Scandinavian Barcoding Programme um zahlreiche Barcodes und Arten von Enchyträen erweitert (Erséus et al. 2023). Dies verbessert die Artklassifizierung im Metabarcoding deutlich. Die Interkalibrierbarkeit zwischen Laboren und Protokollen ist jedoch weiterhin begrenzt.

Metabarcoding führt grundsätzlich zu einer taxonomischen Selektion, da die verwendeten Primer nur bestimmte Gruppen gezielt amplifizieren, was die Aussagekraft der Methode einschränkt. Bei Mikroorganismen reicht oft ein einzelnes Primerpaar oder ein Genmarker aus, um einen Großteil der Vielfalt abzubilden. Für die Bodenfauna sind hingegen mehrere Primer oder Primer-Kombinationen erforderlich, da Marker wie 18S und COI je nach Taxon nur teilweise geeignet sind. Außerdem werden Bakterien, Archaeen, Pilze und Protisten und in der Regel auch Nematoden nicht mit Artnamen klassifiziert. Die bioinformatische Auswertung von Metabarcoding-Daten der Bodenfauna auf Artnamen ist zwar sehr informativ, jedoch in Bezug auf die gesamte Biodiversität noch nicht zuverlässig möglich.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass Metabarcoding die derzeit am weitesten entwickelte Methode für die umfassende Erfassung der Bodenbiodiversität ist. Besonders gut eignet sie sich für die Analyse von Bakterien und Pilzen. Für eukaryotische Bodenorganismen wie Protisten und Bodenfauna sind jedoch noch methodische Weiterentwicklungen und Standardisierungsmaßnahmen erforderlich. Damit ist Metabarcoding derzeit die praktikabelste Grundlage der drei untersuchten molekularbiologischen Methoden für ein behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring, allerdings mit Vorbehalten für Bodenfauna, insbesondere für Springschwänze sowie Horn- und Raubmilben.

Funktionelle Aussagen lassen sich einerseits durch den Einsatz spezifischer Primer treffen, die funktionelle Gene von Mikroorganismen wie Nitratreduktasen, Nitrogenasen oder Methanmonooxygenasen amplifizieren. Andererseits können sie durch die Erfassung

funktioneller Gruppen wie nitrifizierender Bakterien oder bakterivorer, fungivorer und omnivorer Fadenwürmer gewonnen werden. Für Mikroarthropoden, Enchyträen und Regenwürmer lassen sich funktionelle Informationen über Artnamen ableiten, wenn diese mit funktionellen Merkmalen verknüpft sind und Metabarcoding die Arten zuverlässig klassifiziert. Bei Nematoden kann die Gattungs- oder Familienebene Hinweise auf funktionelle Merkmale liefern, erfasst jedoch die Biodiversität nur oberflächlich.

2.2.2 Metagenomik: Stärken und Schwächen

Metagenomik ermöglicht die direkte Erfassung taxonomisch komplexer Lebensgemeinschaften im Boden in Kombination mit funktionellen Genen, wodurch sie eine höhere Aussagekraft hinsichtlich Biodiversität und Funktionen bietet als PCR-basierte Verfahren, wie Metabarcoding. Besonders bei Bakterien und teilweise auch bei Pilzen werden bereits hohe Datenqualität und Reproduzierbarkeit erreicht, was zur Bewertung von "robust, aber nicht standardisiert" und "weit fortgeschritten" (B–B/C) bei der Aussagekraft und Robustheit für diese Methode führte. Diese Bewertung wird durch gut verfügbare Genomdatenbanken wie NCBI RefSeq und GTDB unterstützt. Zwei wesentliche Vorteile der Metagenomik gegenüber Metabarcoding lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1 Erfassung kompletter Lebensgemeinschaften:** Im Gegensatz zu PCR-basierten Verfahren können bei der Metagenomik gesamte Lebensgemeinschaften in einer einzigen eDNA-Extraktion und mit einem Sequenzierungsschritt erfasst werden, ohne dass durch den Einsatz von Primern eine Selektion bestimmter Taxa erfolgt. Dies ermöglicht zudem eine höhere Wahrscheinlichkeit, seltene Arten zu detektieren, sofern die Sequenzierungstiefe entsprechend ausreichend ist.
- 2 Entfall von Primerentwicklung und -optimierung:** Da die komplette DNA einer Probe direkt sequenziert wird, entfallen Entwicklung, Optimierung und Standardisierung von Primern. Dies macht die Methode im Vergleich zum Metabarcoding labortechnisch weniger aufwendig und reduziert potenzielle Fehlerquellen.

Die Methode bringt auch einige Herausforderungen mit sich. Die hohe Datenkomplexität und der große Rechenaufwand stellen hohe Anforderungen an die IT-Infrastruktur für die Auswertung. Zudem fehlt es noch an einer Standardisierung der Bioinformatik-Pipelines, was die Methode in ihrer Anwendung für das behördliche Biodiversitätsmonitoring zurzeit noch einschränkt. Besonders für Protisten und Bodenfauna ist die Datenbasis bislang unzureichend, die für Metagenomik die Bewertung "Entwicklungsstadium" und "Übergangsstadium" (A–A/B) erhielten. Darüber hinaus sind die Sequenzierungskosten pro Probe im Vergleich zu Metabarcoding erheblich höher, was die Skalierbarkeit der Methode begrenzt. Ob sich der Kostenaufwand durch die umfassendere taxonomische und funktionelle Breite ausgleicht, ist noch nicht näher untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Metagenomik ein hohes Potenzial für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring zur Erfassung von Funktionen und Biodiversität bietet. Sie ist derzeit für den Routineeinsatz im Monitoring nur für Bakterien und Pilze, jedoch noch nicht für Protisten und Bodenfauna geeignet. Eine schrittweise Standardisierung und Validierung der Methodik ist notwendig, um sie mittelfristig als ergänzendes Werkzeug neben dem Metabarcoding im behördlichen Monitoring zu etablieren. Langfristig könnte Metagenomik den Standard für Bodenbiodiversitätserfassungen bilden, während Metabarcoding gezielt für

spezifische Fragestellungen eingesetzt wird, wie zum Beispiel das Screening nach Indikatorarten, invasiven Arten oder funktionellen Genen.

2.2.3 Metatranskriptomik: Stärken und Schwächen

Die Metatranskriptomik erfasst die aktuell exprimierten Gene einer Lebensgemeinschaft und ermöglicht damit im Gegensatz zur Metagenomik und zum DNA-basierten Metabarcoding eine direkte Analyse der tatsächlich aktiven Organismen und ihrer gegenwärtigen Stoffwechselprozesse. Sie liefert unmittelbare Einblicke in funktionelle Aktivitäten und ökologische Rollen komplexer Gemeinschaften. Für Bakterien liegen bereits erste reproduzierbare Studien vor, die zeigen, dass funktionale Dynamiken und Stressantworten im Bodenmikrobiom zuverlässig erfasst werden können. Die Methode wurde daher im „Übergangsstadium“ und als „robust, aber noch nicht standardisiert“ (A/B–B) eingestuft.

Im Gegensatz zu DNA-basierten Ansätzen erfasst Metatranskriptomik kein genetisches Material aus abgestorbenen Organismen oder extrazellulären DNA. Somit ermöglicht die Metatranskriptomik die Erfassung des aktiven Anteils von Bodenlebensgemeinschaften, während DNA-basierte Methoden auch inaktive Organismen und molekularbiologische Artefakte erfassen. In Kombination mit Metagenomik lassen sich so sowohl die Struktur als auch die aktuelle funktionelle Aktivität von Bodenlebensgemeinschaften untersuchen und Trends in deren Zusammensetzung erkennen. Dies eröffnet Potenzial für ein zukünftiges standardisiertes behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring, insbesondere für bakterielle Gemeinschaften, da ein erheblicher Anteil der Organismen zeitweise metabolisch inaktiv ist. Die Metatranskriptomik ist grundsätzlich auch für die Analyse der Bodenfauna anwendbar, allerdings existieren bislang kaum praktische Studien (Collins et al. 2023).

Die Methode ist technisch anspruchsvoll, da RNA deutlich instabiler als DNA ist und daher eine schnelle und sorgfältige Probenverarbeitung erfordert. Zudem ist die Bearbeitung von RNA im Labor durch die notwendige Herstellung von cDNA kostenintensiver als bei DNA-basierten Verfahren. Für Pilze, Protisten und Bodenfauna fehlen bislang standardisierte Laborprotokolle sowie ausreichend Referenztranskriptomik, was die Anwendung in diesen Gruppen stark einschränkt und zur Bewertung „Entwicklungsstadium“ (A) geführt hat.

Auch der hohe bioinformatische Aufwand, die damit verbundenen Kosten sowie die fehlende systematische Interkalibrierbarkeit zwischen Laboren begrenzen derzeit eine breitere Nutzung der Methode. Darüber hinaus sind Herkunft, Zustandsformen und Persistenz von Umwelt-RNA (environmental RNA, eRNA) bislang nur unzureichend verstanden. Studien zeigen, dass ihre Verfallsraten stark vom Molekülzustand (frei oder in Zellen beziehungsweise Vesikeln), von Schutzstrukturen sowie von Umweltfaktoren wie Temperatur, Licht, pH-Wert und mikrobieller Aktivität abhängen und daher räumlich und zeitlich stark variieren können (Cristescu, 2019). Diese Sensitivität gegenüber kurzfristigen Umwelteinflüssen kann längerfristige oder managementbedingte Effekte überlagern und erschwert damit die Interpretation von Metatranskriptomik-Daten im Rahmen eines standardisierten Bodenbiodiversitätsmonitorings.

Insgesamt befindet sich die Metatranskriptomik noch klar im Forschungsstadium. Sie liefert wertvolle Erkenntnisse zu funktioneller Aktivität und ökologischen Prozessen und wird derzeit vor allem in wissenschaftlichen Pilotstudien mit spezifischen funktionellen Fragestellungen eingesetzt. Für einen standardisierten Einsatz im behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitoring ist sie gegenwärtig noch nicht geeignet. In Kombination mit Metagenomik oder Metabarcoding

besitzt die Metatranskriptomik jedoch großes Potenzial für zukünftige funktionelle Analysen im Rahmen eines behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitorings. Dabei sollte ihr Einsatz auf direkt aus dem Boden extrahierte Umwelt-RNA (eRNA) beschränkt werden, da RNA aus zuvor isolierten Organismen (comDNA) durch Sammel- und Verarbeitungsstress die Genexpression potenziell stark verfälschen kann. Metabarcoding und Metagenomik können hingegen sowohl auf eDNA als auch auf comDNA angewendet werden.

2.3 Synthese zur Aussagekraft und Robustheit molekularbiologischer Methoden

Die Zusammenfassung der Bewertungsmatrix in einem Ampelsystem verdeutlicht die Unterschiede in der Einsatzreife der molekularbiologischen Methoden mit Bezug zu den Organismengruppen (Abbildung 5). Von den drei verglichenen molekularbiologischen Methoden weist das **Metabarcoding** derzeit die höchste Einsatzreife für das Bodenbiodiversitätsmonitoring auf. Die Methode ist kosteneffizient, reproduzierbar und besonders für Bakterien und Pilze gut etabliert, was auch durch kuratierte Referenzdatenbanken (SILVA, UNITE) und standardisierte Marker (16S rRNA, ITS) unterstützt wird. Für eukaryotische Bodenorganismen wie Protisten und Bodenfauna bestehen jedoch weiterhin methodische Defizite, insbesondere unvollständige Datenbanken und Primer-Bias, die eine Standardisierung und die taxonomische Auflösung erschweren. Die **Metagenomik** ermöglicht eine umfassendere Erfassung mikrobieller Gemeinschaften, einschließlich funktioneller Gene und bislang unbekannter Taxa. Sie vermeidet Primer-Bias und erlaubt ein tieferes Verständnis von Biodiversität und ökologischer Prozesse. Ihre Anwendung wird jedoch aktuell durch hohen Daten- und Rechenaufwand, fehlende Standardisierung bioinformatischer Auswertungen, hohe Kosten sowie noch begrenzte Referenzdatenbanken eingeschränkt. Die **Metatranskriptomik** liefert Informationen zur funktionellen Aktivität und physiologischen Dynamik aktiver Lebensgemeinschaften, ist jedoch derzeit überwiegend auf Forschungsanwendungen beschränkt. Instabile RNA, fehlende Referenztranskriptome und hoher technischer Aufwand erschweren eine standardisierte Anwendung.

Insgesamt stellt Metabarcoding derzeit die praktikabelste Methode für den Routineeinsatz im behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitoring dar, mit Vorbehalten für Protisten und Bodenfauna. Die Metagenomik kann mittelfristig als alternative Methode etabliert werden, während sich Metabarcoding für spezifische Monitoringfragen ergänzend einsetzen lässt. Die Metatranskriptomik bleibt aktuell vor allem für wissenschaftliche und funktionelle Studien relevant.

Methode	Organismengruppe	Aussagekraft	Robustheit
Metabarcoding	Bakterien	C	C
Metabarcoding	Pilze	C	C
Metabarcoding	Protisten	B	B
Metabarcoding	Enchyträen	A	A/B
Metabarcoding	Regenwürmer	A/B	A/B
Metabarcoding	Fadenwürmer	A/B	B
Metabarcoding	Springschwänze	A	A
Metabarcoding	Hornmilben	A	A
Metabarcoding	Raubmilben	A	A
Metagenomik	Bakterien	B/C	B/C
Metagenomik	Pilze	B	A
Metagenomik	Protisten	A	A
Metagenomik	Enchyträen	B	A
Metagenomik	Regenwürmer	A	A
Metagenomik	Fadenwürmer	B	A
Metagenomik	Springschwänze	A	A
Metagenomik	Hornmilben	A	A
Metagenomik	Raubmilben	A	A
Metatranskriptomik	Bakterien	B/C	A
Metatranskriptomik	Pilze	B	A
Metatranskriptomik	Protisten	B	A
Metatranskriptomik	Enchyträen	A	A
Metatranskriptomik	Regenwürmer	A	A
Metatranskriptomik	Fadenwürmer	B	A
Metatranskriptomik	Springschwänze	B	A
Metatranskriptomik	Hornmilben	A	A
Metatranskriptomik	Raubmilben	A	A

Abb. 5 Zusammenfassung der Bewertungen der Einsatzreife der drei molekularbiologischen Methoden und der Organismengruppen mit Bezug zu den Organismengruppen anhand eines Ampelsystems. Rot steht für die Bewertung A (Entwicklungsstadium) und weist darauf hin, dass sowohl die Aussagekraft als auch die Robustheit noch im Entwicklungsstadium sind. Gelb zeigt mit der Bewertung B an, dass eine robuste Aussagekraft erreicht wurde, die Methode jedoch aufgrund fehlender Standardisierung noch nicht vollständig oder nur bedingt für das behördliche Monitoring einsetzbar ist. Grün steht für die Bewertung B/C–C (weit fortgeschritten-einsatzbereit), das vor allem bei Bakterien zu finden ist, und signalisiert, dass die Methoden für die entsprechende Organismengruppe für den Einsatz im behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitoring bereit sind.

3 Identifikation von Meilensteinen zur Weiterentwicklung der molekularbiologischen Verfahren

In den folgenden Kapiteln (3–4) werden methodische Lücken auf Basis der Bewertungstabellen zur Aussagekraft und Robustheit (Anhang, Tabelle A1) der molekularbiologischen Verfahren identifiziert, um deren Einsatz im behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitoring zu ermöglichen oder entscheidend zu verbessern. Die Analyse erfolgt für Metabarcoding sowohl organismenübergreifend als auch organismenspezifisch. Dabei werden allgemeine Entwicklungsbedarfe untersucht, wie die Standardisierung von Labor- und Bioinformatikprozessen, der Umgang mit eDNA versus comDNA oder die Auswahl der Sequenzierungsplattform. Da die Methode durch den Einsatz von Primern stets auf bestimmte Organismengruppen zugeschnitten ist, werden die Punkte zur Weiterentwicklung ebenfalls organismenspezifisch betrachtet. Diese organismenspezifischen Punkte sind charakteristisch für Metabarcoding, während sie für die Metagenomik in dieser Form nicht erforderlich sind. Zentrale Lücken und Meilensteine für die Weiterentwicklung alternativer Auswerteverfahren werden in Kapitel 5 dargestellt.

Die identifizierten Lücken, Meilensteine und angestrebten Zielzustände der Methoden werden in Übersichtstabellen (Tabellen 1–4) systematisch dargestellt und zusätzlich im Text erläutert. Ein Meilenstein beschreibt dabei die notwendigen Schritte zur Erreichung eines Zielbildes, das den

konkreten zukünftigen Beitrag der jeweiligen Methode für das behördliche Monitoring definiert. Die Ergebnisse sind in drei Entwicklungsbereichen zusammengefasst:

- 1** Optimierung des Metabarcodings, einschließlich alternativer Primer und der Pflege qualitativ hochwertiger, morphologisch validierter Referenzdatenbanken (Tabellen 1 und 2).
- 2** Strategische Weiterentwicklungen in DNA-Metagenomik und Metatranskriptomik, um funktionale Informationen zu gewinnen und biomarkerbasierte Indikatoren zu entwickeln (Tabelle 3).
- 3** Ausbau alternativer Auswerteverfahren, einschließlich taxonomisch unabhängiger Ansätze und KI-gestützter Mustererkennung zur Analyse von Diversitätsmustern und funktionellen Gruppen (Tabelle 4).

Für die strategische Ausrichtung werden die identifizierten Zielbilder nach Priorität in hoch, mittel und niedrig bewertet, und die Entwicklungszeithorizonte in die Kategorien kurzfristig (1–2 Jahre), mittelfristig (3–5 Jahre) und langfristig (> 5 Jahre) eingeteilt. Diese Zeithorizonte sind grobe Einschätzungen und basieren auf eigenen Erfahrungen aus öffentlich geförderten Leitlinienentwicklungsprojekten (zum Beispiel WIPANO). Sie können von den tatsächlichen Entwicklungszeiten abweichen, da diese vom Projektdesign abhängen. Sind die Methoden bereits etabliert und erfordern hauptsächlich eine Standardisierung, richtet sich der Zeitbedarf im Wesentlichen nach dem Aufwand für Validierung und Ringversuchen, wobei ein Zeitraum von 3–5 Jahren realistisch ist.

3.1 Organismenübergreifende methodische Entwicklungsschritte

Das Metabarcoding stellt derzeit die zentrale molekularbiologische Methode zur Erfassung der Bodenbiodiversität dar. Trotz des relativ fortgeschrittenen Entwicklungsstands beschränkt sich die Anwendung bisher jedoch auf Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen und Pilze) und in geringerem Ausmaß auf Protisten und Nematoden. Für alle weiteren Organismengruppen gibt es vereinzelte Ansätze, die sich aufgrund ihres Einzelstudiencharakters nicht vergleichen lassen. Trotz der zum Teil etablierten Anwendung bestehen für das behördliche Biodiversitätsmonitoring in den folgenden Punkten noch methodische Lücken, die organismen- und methodenübergreifend relevant sind. Diese sollten strategisch adressiert werden, um ein zukunftsorientiertes, länderübergreifend standardisiertes und damit vergleichbares sowie robustes Monitoring zu ermöglichen und entsprechende Investitionen gezielt auszurichten.

3.1.1 Standardisierung durchführen

Für die Erzeugung bundesweit und europaweit vergleichbarer, verlässlicher und rechtssicherer Biodiversitätsdaten sind folgende Entwicklungsschritte erforderlich.

- 1** Die Durchführung von Ringtests, die die verbreitetsten Protokolle auf Robustheit und Konsistenz prüfen,
- 2** die Entwicklung bzw. Festlegung einer bioinformatischen Pipeline auf Basis vorhandener Erfahrungs- und Vergleichswerte,
- 3** sowie die Etablierung einer zentralen, kuratierten und regelmäßig aktualisierten Referenzdatenbank für die Zielorganismen.

Es ist zu bedenken, dass eine Referenzdatenbank für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring für jede Auswertungsphase eindeutig versioniert und zeitlich fixiert sein sollte, damit Artenlisten basierend auf molekularbiologischen Daten über die Zeit vergleichbar sind. Eine gut kuratierte, taxonomisch repräsentative Datenbank kann daher unabhängig betrieben und in definierten Abständen mit den öffentlichen Datenbanken abgeglichen und gegebenenfalls aktualisiert werden.

Die Priorität für dieses Zielbild ist hoch, da eine frühzeitige Standardisierung die effiziente und effektive Nutzung molekularbiologischer Daten wesentlich erleichtert. Die Umsetzung erscheint in einem mittelfristigen Zeitraum von etwa 3–5 Jahren realistisch.

Die Notwendigkeit der Standardisierung von Protokollen gilt für alle molekularbiologischen Verfahren (Metabarcoding, Metagenomik, Metatranskriptomik) und für alle Organismengruppen.

3.1.2 Einfluss von Relikt-DNA erörtern

Zur Erfassung der Biodiversität im Boden sind eDNA-basierte Ansätze eine gängige, effektive und effiziente Vorgehensweise. Diese sind in der Regel weniger invasiv als Verfahren, die auf zuvor von der Bodenmatrix getrennten Organismen (comDNA) beruhen. Allerdings enthält DNA, die direkt aus Boden extrahiert wurde, nicht nur genetisches Material der aktuell darin lebenden Organismen, sondern auch extern eingetragene DNA (zum Beispiel über Wind und Regen) sowie DNA von toten Organismen, Partikeln und Spuren (Schuppen, Schleimspuren, Körperteile, Kot). Die Bedeutung dieser Relikt- oder "Friedhofs-" DNA für eDNA-basierte Methoden ist bislang unzureichend untersucht, gilt aber als potenziell erheblich, da DNA im Boden vergleichsweise stabil ist und über Wochen bis Jahre nachweisbar bleibt. Diese Relikt-DNA kann die Biodiversitätsindizes und zeitliche Trends verfälschen, insbesondere in Agrarlandschaften, in denen Bewirtschaftungswechsel temporär wechselnde Artengemeinschaften hervorbringen.

Vor diesem Hintergrund wird es als essentiell und mit hoher Priorität eingestuft, den Anteil von Relikt-DNA in verschiedenen Lebensraumtypen systematisch zu erfassen, zu quantifizieren und deren Einfluss zu bewerten. Wichtige Meilensteine hierfür sind Zeitreihenstudien, idealerweise unter Einbeziehung von Mock-Communities oder Mock-DNA, die den Verbleib (zum Beispiel Halbwertszeit) von Relikt-DNA in unterschiedlichen Bodentypen untersuchen.

Die Priorität für dieses Zielbild ist hoch und die Umsetzung erscheint in einem mittelfristigen Zeitraum von etwa 3–5 Jahren realistisch.

Die Relevanz von Relikt-DNA betrifft alle eDNA-basierten Methoden (Metabarcoding, Metagenomik), ist beim Metabarcoding aufgrund des PCR-Schritts jedoch besonders kritisch, da kleine Mengen an (Relikt-) DNA disproportional amplifiziert werden können.

3.1.3 Sequenzierungsplattformen evaluieren

Für das behördliche Biodiversitätsmonitoring ist eine systematische Bewertung verschiedener Sequenzierungsplattformen sinnvoll. Etablierte Short-Read-Plattformen wie Illumina und vergleichbare Systeme gelten derzeit als Standard für Umwelt-Metabarcoding sowie zahlreiche Metagenomik-Anwendungen. Sie zeichnen sich durch vergleichsweise geringe Kosten und eine hohe Multiplexing-Kapazität aus. Die erzeugten Reads sind überwiegend kurz (typischerweise 2×150–300 bp, resultierende Amplicons ~250–500 bp), was für zahlreiche Fragestellungen und gut erschlossene Organismengruppen (zum Beispiel viele Bakterien, Teile der Pilze) in

Kombination mit gut kuratierten Referenzdatenbanken ausreichend ist. Für viele Bodenorganismengruppen mit hoher Diversität und lückenhaften Referenzen (zum Beispiel zahlreiche Protisten, Nematoden, Mikroarthropoden) ist die artspezifische Auflösung kurzer Amplicons jedoch begrenzt (Francioli et al. 2021).

Long-read Plattformen (Oxford Nanopore und PacBio) ermöglichen die Erzeugung sehr langer Reads von mehreren tausend Basenpaaren. Dies erlaubt präzisere taxonomische Zuordnungen und die vollständige Sequenzierung (Full-length) alternativer Marker wie 16S, 18S und ITS inklusive 28S. Diese Gene stellen potenziell eine geeignete Alternative zum vergleichsweise kurzen und bei Bodenorganismen oft hoch variablen COI-Marker dar. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Sequenzierungseinheiten von Oxford Nanopore mobil einsetzbar sind und sich problemlos in Standardlaboren integrieren lassen. Long-read Plattformen werden zunehmend für Full-length-Marker sowie für Referenzgenome und hochauflösende Metagenomik eingesetzt. Für Metabarcoding liegen inzwischen zahlreiche Studien vor, die zeigen, dass Long-read-Sequenzierung eine verbesserte taxonomische Auflösung und bessere Assemblierbarkeit erlaubt, insbesondere bei Protisten, Pilzen und Teilen der Bodenfauna (Runnel et al. 2022, Córdoba-Agudelo et al. 2025, Varus et al. 2025). Parallel dazu wurden Sequenzierreagenzien und bioinformatische Workflows so weiterentwickelt, dass die Fehlerraten in den Konsensussequenzen deutlich reduziert werden konnten (Bista and Lino 2025, Buetas et al. 2024).

Aus heutiger Sicht erscheint eine arbeitsteilige Nutzung der Plattformen sinnvoll. Short-reads eignen sich aufgrund der etablierten Protokolle, der guten Standardisierbarkeit und der Kostenstruktur derzeit am besten für breit angelegte, regelmäßig wiederholte Routinemessungen im Rahmen eines Bodenbiodiversitätsmonitorings. Long-Read-Plattformen sind besonders wertvoll für die Gewinnung und Verbesserung von Referenzen, darunter vollständige Marker-gene, Referenzgenome sowie metagenomisch assemblierte Genome (metagenome-assembled genomes, MAGs), und eignen sich zudem für hochauflösende oder explorative Analysen, bei denen eine möglichst hohe taxonomische Auflösung und lange Marker von Vorteil sind, wie zum Beispiel für Protisten und Mikroarthropoden.

Die Priorität für dieses Zielbild ist hoch, und die Erstellung sowie Analyse informativer Datensätze ist in einem kurzfristigen Zeitraum (1–2 Jahre) realistisch. In gezielten Pilot- und Vergleichsstudien (Illumina versus PacBio und ONT) können belastbare Datensätze erzeugt werden, um den Mehrwert langer Reads für zentrale Organismengruppen und Marker für Metabarcoding oder Metagenomik zu evaluieren. Auf dieser Grundlage lassen sich mittelfristig zwei Fragen beantworten: ob Long-Read-Technologien in ein behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring integriert werden sollten und, falls ja, wie sie ergänzend oder als Ersatz zu etablierten Short-Read-Protokollen, etwa für Referenzsequenzen, eingesetzt werden können.

Für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring ist eine systematische Betrachtung der verfügbaren Sequenzierungsplattformen sinnvoll, da die Plattformwahl sowohl Metabarcoding (Primer-/PCR-basiert) als auch Metagenomik betrifft und sich auf eDNA wie comDNA gleichermaßen auswirkt (Mittelstrass et al. 2025, Bleidorn et al. 2025, Dooresnspleet et al. 2025).

3.1.4 Sequenzierungsstrategie festlegen

Shotgun-Metagenomik bietet den Vorteil, ohne Primer und PCR auszukommen und damit potenzielle Verzerrungen durch Primerwahl (taxonspezifische Amplifikationsbias, Primermismatch) zu vermeiden. Dies vereinfacht potenziell auch die Standardisierung und

Reproduzierbarkeit der Laborprotokolle, da der kritische PCR-Schritt entfällt (Edwin et al. 2025). Allerdings erzeugt Metagenomik eigene Biases, etwa durch DNA-Fragmentierung, ungleiche Sequenziertiefen und Adapter-Ligation, was den direkten Vergleich mit Metabarcoding erschwert (Holman et al. 2025).

Empirische Vergleichsstudien zwischen Metabarcoding und Metagenomik für identische Bodenproben liegen vor allem für Bakterien vor. Sie zeigen oft konsistente Muster bei dominanten Phyla, aber teils deutliche Abweichungen bei der Erfassung seltener Taxa (Edwin et al. 2025). Für Bodeninvertebraten und komplexe Eukaryotengemeinschaften im Boden sind systematische Vergleiche hingegen unterrepräsentiert und zeigen in verwandten Systemen (zum Beispiel Sedimenten) oft nur geringe Übereinstimmungen zwischen beiden Methoden (Becker und Pushkareva 2023, Holman et al. 2025). Vor dem Hintergrund fehlender Standardisierung und komplementärer methodischer Stärken beider Verfahren ist eine vergleichende Pilotstudie im Bodenkontext als Grundlage für zukünftige Monitoringstrategien besonders zu empfehlen, zumal Metagenomik-Ansätze für Bakterien, Archaeen, Protisten und Pilze zunehmend an Bedeutung gewinnen (Edwin et al. 2025).

Eine solche vergleichende Untersuchung wird als hoch priorisiert eingestuft und ist kurzfristig (innerhalb von 1–2 Jahren) realisierbar. Sie würde eine fundierte, datenbasierte Entscheidungsgrundlage schaffen, um eine langfristige und wissenschaftlich belastbare Strategie für das behördliche DNA-basierte Bodenbiodiversitätsmonitoring zu definieren.

Eine spätere Umstellung der Methodik im laufenden Monitoring, etwa von kurzen auf lange Marker oder von PCR-basierten auf PCR-freie Verfahren, wäre mit erheblichen Brüchen in den Datenzeitreihen verbunden und methodisch äußerst aufwendig zu korrigieren. Eine frühzeitige, empirisch abgesicherte Festlegung der Sequenzierungsstrategie ist daher dringend geboten. Es ist möglich, die Evaluierung der Analyseverfahren (Metabarcoding versus Metagenomik) und der Sequenzierungsplattformen (Short- versus Long-Reads) in einem gemeinsamen Pilotprojekt zu bündeln, deren Ergebnisse unmittelbar in die Ausgestaltung des Monitorings einfließen.

Tab. 1: Organismenübergreifende Bewertung des Metabarcoding.

Organismen- gruppe	Lücke	Meilenstein	Zielbild	Priorität	Zeithorizont
Alle	Standardisierte methodische Protokolle für DNA-Extraktion, PCR und Primerwahl, Sequenzierungstiefe, bioinformatische Auswertung	Ringtests, die bestehende Protokolle für DNA-Extraktion, PCR und Primerwahl, Sequenzierungstiefe, bioinformatische Auswertung auf Robustheit testen. Etablierung einer zentralen, kuratierten und sich aktualisierenden Referenzdatenbank	Erzeugung bundesweit und international vergleichbarer, verlässlicher und rechtssicherer Biodiversitätsdaten	hoch	mittelfristig 3–5 Jahre
Alle	Relikt-DNA (Friedhofs- DNA) verfälscht Biodiversitätsschätzung (nur für eDNA relevant)	Mock-/Zeitreihen zur Quantifizierung des Anteils an Relikt-DNA in natürlichen Gemeinschaften	Erfassung der aktiven Biodiversität in Lebensraumtypen, insbesondere in Agrarflächen	hoch	mittelfristig 3–5 Jahre
Alle	Vergleich der Sequenzierungsplattformen (short-reads versus long-reads)	Vergleichende Datenerhebung basierend auf eDNA mit Illumina, PacBio, ONT und Auswertung hinsichtlich taxonomischer Auflösung, Read-Qualität, Robustheit	Strategische Entscheidung hinsichtlich der Sequenzierungsplattform für die Organismengruppen des behördlichen Biodiversitätsmonitorings	hoch	kurzfristig 1–2 Jahre
Alle	Vergleich Metabarcoding und Metagenomik (anknüpft an Vergleich der Sequenzierungsplattformen)	Vergleichende Datenerhebung basierend auf eDNA hinsichtlich taxonomischer Auflösung, Kosten, Robustheit	Strategische Entscheidung hinsichtlich langfristiger Sequenzierungstechnologie für die Organismengruppen des behördlichen Biodiversitätsmonitorings	hoch	kurzfristig 1–2 Jahre

Tabelle 1 Die identifizierten Lücken in Aussagekraft und Robustheit sowie die daraus abgeleiteten Meilensteine basieren auf den Ergebnissen der Literaturrecherche. Die definierten Zielbilder beschreiben die Voraussetzungen, um die Methode für ein standardisiertes behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring anwendbar zu machen. Jedes Zielbild ist mit einer Priorität (hoch, mittel, niedrig) versehen, die die Dringlichkeit des jeweiligen Handlungsbedarfs bewertet. Die Zeithorizonte für die Umsetzung der Meilensteine sind in kurzfristig, mittelfristig und langfristig unterteilt und als Richtwerte zu verstehen. Sie können durch technische oder methodische Anpassungen oder Ressourcenverfügbarkeiten (zum Beispiel Personal, finanzielle Mittel) beeinflusst werden. Die tatsächliche Umsetzung hängt zudem vom jeweils angestrebten Zielbild ab.

3.2 Organismenspezifische Entwicklungsschritte molekularbiologischer Methoden

Im Folgenden werden für jede Organismengruppe die Forschungslücken, erforderliche Entwicklungsmeilensteine sowie die Zielbilder mit ihrer Priorisierung und Zeithorizonten dargestellt. Während sich die Zielbilder und Meilensteine zwischen den Gruppen inhaltlich teilweise überschneiden, unterscheiden sich ihre praktische Umsetzung und Anforderungen durch gruppenspezifische Besonderheiten.

3.2.1 Mikroorganismen

Bakterien und Archaeen

Das Metabarcoding ist für die Erfassung der Biodiversität und funktionellen Gruppen von Bakterien in Böden bereits gut entwickelt. Wesentliche methodische Lücken bestehen für Bakterien und Archaeen in der Primerspezifität. Für eine quantitative Biodiversitätserfassung von Bakterien und Archaeen müssen interne Standards entwickelt werden, die eine Normierung über den gesamten Workflow (Extraktion, PCR, Sequenzierung) ermöglichen. Spike-in-DNA wird vor der Extraktion zugegeben und erlaubt die relative Quantifizierung zwischen Proben sowie systematische Verluste im Prozess, für den routinemäßigen Einsatz im Monitoring sind sie jedoch noch nicht validiert. Im Vergleich dazu kann der qPCR-Ansatz zuverlässig PCR-Inhibitoren messen und ist methodisch deutlich besser mit standardisierten Protokollen etabliert. Die Priorität für dieses Zielbild ist als mittel eingestuft, da dies eine Verbesserung der bereits etablierten Methoden darstellt, für die Umsetzung wird ein mittelfristiger Zeitraum von etwa 3–5 Jahren angenommen.

Pilze

Für ein konsistentes und robustes Monitoring von Pilzen ist eine verbindliche Harmonisierung der Primerwahl, sowie der zugrunde liegenden Referenzdatenbanken erforderlich. Im Metabarcoding von Pilzen haben sich bislang zwei Markerregionen etabliert (ITS1 und ITS2). Da Studien derzeit entweder ITS1 oder ITS2 verwenden, sind die resultierenden Datensätze jedoch nicht unmittelbar miteinander vergleichbar, weshalb eine Harmonisierung notwendig ist. Für ein standardisiertes Monitoring sollte verbindlich die UNITE-Datenbank als Referenz herangezogen werden, da diese eine von Expert*innen mit dokumentierter taxonomischer Expertise kuratierte, hochqualitative Datenbank darstellt. Auf dieser Grundlage sollte künftig ein einheitlicher Marker, entweder ITS1 oder ITS2 oder eine klar definierte Kombination beider Regionen, verbindlich festgelegt und im Monitoring standardmäßig angewendet werden. Entscheidend ist dabei nicht die Wahl einer bestimmten Region, sondern deren konsequente und langfristige einheitliche Nutzung, um die Vergleichbarkeit der Datensätze sicherzustellen. Dieses Zielbild wird als hoch priorisiert eingestuft und ist kurzfristig (1–2 Jahre) erreichbar.

Protisten

Für ein aussagekräftiges und robustes Monitoring von Protisten fehlen derzeit einheitliche methodische Ansätze, die diese hochdiverse Organismengruppe zuverlässig erfassen können. Die bestehende Referenzdatenbank (PR2) weist taxonomische Lücken auf, und die gängigen 18S-Primer decken nur einen Teil der im Boden vorkommenden Protistengruppen ab. Daher ist die Entwicklung optimierter Primer sowie die Erweiterung und Kuratierung der

Referenzdatenbanken um bodenspezifische Linien erforderlich. Angesichts der enormen taxonomischen Breite und Variabilität der Protisten stellt insbesondere der Wechsel auf längere Markerregionen (zum Beispiel Full-Length 18S) mittels Long-Read-Sequenzierung oder der Einsatz von Metagenomik eine vielversprechende Strategie dar, um die Biodiversität von Protisten repräsentativer abzubilden als mit klassischen Short-Read-Ansätzen.

Dieses Zielbild besitzt aufgrund der funktionalen Bedeutung der Protisten eine hohe Priorität. Aufgrund der großen Diversität, der methodischen Komplexität und der Notwendigkeit neuer Marker-Strategien ist die Umsetzung jedoch als langfristiges Vorhaben (> 5 Jahre) einzustufen.

3.2.2 Bodenfauna

Das Metabarcoding der Bodeninvertebraten befindet sich im Vergleich zu den pro- und eukaryotischen Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen, Pilze, Protisten) in einem früheren Entwicklungsstadium. Eine zentrale Herausforderung liegt darin, dass für identische Organismengruppen unterschiedliche Markergene und Primer verwendet werden und ein einzelnes Markergen selten die gesamte faunistische Breite abdeckt. Universelle Primer binden bei verschiedenen Taxa unterschiedlich effizient, und die genetische Variabilität ist zwischen den Gruppen stark unterschiedlich. Während hyperdiverse Taxa wie Hornmilben mittels 18S rDNA taxonomisch gut aufgelöst werden können, zeigen artenarme Gruppen wie Regenwürmer bei diesem Marker oft nur geringe genetische Distanzen (Königer et al. 2023). Diese genetischen Unterschiede korrelieren dabei nicht proportional mit der taxonomischen Diversität.

Um eine reproduzierbare Zuordnung molekularbiologischer Daten auf Art- oder Gattungsniveau zu gewährleisten, ist eine systematische Evaluation bestehender Referenzdatenbanken (vor allem BOLD, NCBI, GBOL) sowie die Identifikation der jeweils am besten geeigneten Markergene pro Organismengruppe erforderlich. Die Bewertung der Datenbanken und Markergene hängt von der taxonomischen Abdeckung der Marker in den Referenzdatenbanken ab. Die strategische Harmonisierung von Datenbanken und Markern ist essentiell für das molekularbiologische Monitoring. Dieses Zielbild hat hohe Priorität, ist jedoch insgesamt aufgrund gruppenspezifischer Unterschiede als mittel- bis langfristiges Vorhaben (3 bis > 5 Jahre) einzustufen. Für einzelne Organismengruppen (zum Beispiel nur Hornmilben, nur Springschwänze) fällt der Zeitaufwand jedoch deutlich geringer aus, hier kann die Erstellung und Auswertung informativer Datensätze bereits kurzfristig (1–2 Jahre) realisiert werden.

Die bestehenden Referenzdatenbanken sind lückenhaft und weisen oft geografische Schwerpunkte auf, die für ein bundesweites Monitoring wenig repräsentativ sind (zum Beispiel viele Mikroarthropoden-Sequenzen aus Kanada in BOLD). Angesichts der hohen intraspezifischen Variation und kryptischen Diversität der Bodenfauna ist eine geografisch passgenaue Abdeckung des Untersuchungsgebiets jedoch entscheidend. Um Leit- oder Indikatorarten auf Basis solider taxonomischer Zuordnung unabhängiger Datensätze zu erkennen, ist der Aufbau einer repräsentativen, kuratierten und morphologisch validierten Referenzdatenbank unerlässlich. Dieses Zielbild hat eine hohe Priorität und ist langfristig erreichbar (> 5 Jahre), kann aber durch die frühzeitige Festlegung von gruppenspezifischen Markern beschleunigt werden.

Um vergleichbare und konsistente Ergebnisse zur Bodenfauna für das Bodenbiodiversitätsmonitoring zu erhalten, müssen standardisierte Protokolle für den gesamten Workflow entwickelt werden. Dies umfasst alle Schritte von der Probenahme (Bodenvolumen, Replikate, Homogenisierung, Fangflüssigkeit bei comDNA) über die Laborprozesse (DNA-

Extraktion, PCR, Primerwahl) bis hin zur Sequenzierung und Bioinformatik. Dieses Zielbild ist hoch priorisiert und für die gesamte Bodenfauna mittelfristig (3–5 Jahre) realisierbar und kann zeitlich parallel bzw. ergänzend zur Harmonisierung von Datenbanken und Markern durchgeführt werden.

Die taxonomisch validierte Annotation molekularbiologischer Referenzdaten ist für das Monitoring der Bodenfauna essentiell, da traditionelle Monitoringansätze auf Artebene arbeiten. Informationen zu Arten sind notwendig, um Diversität, das Vorkommen oder Fehlen bestimmter Arten sowie Veränderungen von Indikatorarten zu erfassen. Darüber hinaus liefert die Artzuordnung ökologische Informationen, da bei der Bodenfauna eine Gattung oder Familie oft verschiedene funktionelle Gruppen umfasst. Dafür sind zwei Schritte notwendig. Erstens, eine Analyse, welches Markergen und welche bioinformatische Auswertung faunistische Gemeinschaften möglichst genau an taxonomische Bestimmungen heranzuführt. Zweitens, die Etablierung einer Datenbank, die Artnamen mit ökologischen Funktionen verknüpft. Hierzu existieren bereits Ansätze wie Edaphobase (www.eudaphobase.eu/edaphobase), Ecotaxonomy (ecotaxonomy.org) oder EnchyTraits (C. Pelosi, R. Schmelz), die Biodiversitätsdaten mit ökologischen Kennwerten verknüpfen. Diese Informationen können Indikatoren für Bodenqualität, Biodiversität und Landnutzungseffekte liefern und dienen als Grundlage, um Metabarcoding-Sequenzdaten ökologisch zu interpretieren. Sie können also ein Frühwarnsystem liefern und ermöglichen die Ableitung von Ökosystemfunktionen und die Entwicklung von zielgerichteten Managementplänen. Die funktionelle Zuordnung von Artnamen hat eine hohe Priorität und ist, abhängig von der Organismengruppe und der vorhandenen Datenlage, kurzfristig (1–2 Jahre) bis mittelfristig (3–5 Jahre) erreichbar.

Fadenwürmer

Das Metabarcoding von Fadenwürmern (Nematoda) ist im Vergleich zu anderen Bodenorganismen relativ weit fortgeschritten und weitgehend etabliert. Es gibt jedoch zwei grundlegende Einschränkungen. Erstens ist die taxonomische Auflösung auf Artniveau mit 18S-Primern, insbesondere in Kombination mit den anerkannten Referenzdatenbanken SILVA und PR2, unzureichend. Um hochauflösende und robuste Gemeinschaftsdaten von Nematoden für das behördliche Monitoring zu erhalten, ist eine gezielte Sequenzierung relevanter Taxa zur Aktualisierung und Erweiterung der Referenzdatenbanken notwendig. Dieses Ziel hat eine hohe Priorität und kann mittelfristig (3–5 Jahre) erreicht werden. Zweitens zeigt das Metabarcoding mit den derzeit verwendeten Primern und Datenbanken eine geringe Sensitivität für seltene Gruppen, sodass vorwiegend dominante Gruppen in Biodiversitätsaufnahmen erfasst werden. Um die Methode für das Bodenbiodiversitätsmonitoring robuster zu machen und sowohl dominante als auch seltene Arten zuverlässig zu erfassen, sollte untersucht werden, inwieweit eine höhere Sequenzierungstiefe, der Einsatz von Replikaten und gruppenspezifische Primer die Sensitivität der Methode gegenüber seltenen Taxa erhöhen. Diese Erkenntnisse sollten gegebenenfalls in zukünftige Standards einfließen. Da die Bedeutung seltener Gruppen für die Ökosystemfunktionen und ihre Relevanz für das behördliche Monitoring noch unklar ist, wird dieses Ziel mit mittlerer Priorität eingestuft. Aufgrund der Herausforderungen bei der Untersuchung seltener Gruppen wird der Zeithorizont für dieses Ziel auf mittel- bis langfristig (3 bis > 5 Jahre) angesetzt.

Enchyträen

Das Metabarcoding von Enchyträen (Enchytraeidae) ist für das behördliche Monitoring besonders vielversprechend. Mit etwa 150 in Deutschland beschriebenen Arten liegt die Diversität in einem Bereich, der molekularbiologisch effizient erfassbar ist, ohne methodisch zu komplex zu werden. Zudem bietet das Standardmarkergergen COI eine solide taxonomische Auflösung. Im Rahmen des „Scandinavian Barcoding of Life“-Projekts wurden morphologisch validierte Referenzdaten zu Enchyträen mit Standortangaben und der Annotation kryptischer Arten erstellt und sind seit Januar 2025 bei NCBI verfügbar (Erséus et al. 2023). Dadurch ist die molekularbiologische Referenzdatenbank für Enchyträen derzeit vergleichsweise weit fortgeschritten und gut kuratiert. Auf dieser Vorarbeit aufbauend erscheint die Erstellung einer nahezu vollständigen Referenzdatenbank für Enchyträen in Mitteleuropa gut erreichbar, denn eine systematische Erfassung der vorhandenen Arten sowie die Erweiterung der Referenzdatenbank ist im Vergleich zu anderen, artenreicheren Gruppen oder solchen mit weniger Datengrundlage einfacher. Dieses Ziel wird mit hoher Priorität eingestuft, da es einen hohen Kosten-Nutzen-Faktor bietet und mittelfristig (3–5 Jahre) umsetzbar sein sollte. Eine enge Zusammenarbeit von Taxonom*innen und molekularbiologischen Laboren ist hierbei entscheidend und wurde in der Zeitplanung berücksichtigt. Im Rahmen der Vervollständigung einer Referenzdatenbank für Enchyträen ergeben sich auch wichtige Synergien. Für ein hochauflösendes Biodiversitätsmonitoring, das eine zuverlässige Zuordnung von Sequenzen innerhalb von Artkomplexen und die Erfassung der Verbreitung kryptischer Linien ermöglicht, kann ein breit angelegtes Beprobungsprogramm mit phylogenetischen Analysen genutzt werden. Dieses Programm dient der Erfassung kryptischer Arten, ihrer Barcodegene, ihrer Verbreitungsgebiete und ihrer Ökologie. Die Priorität dieses Ziels sowie die damit verbundenen Rahmenbedingungen entsprechen dem oben genannten Zielbild und werden mit hoher Priorität und mittelfristig (3–5 Jahre) eingestuft.

Enchyträen sind als Indikatorarten für verschiedene Umweltfaktoren bekannt, denn Arten unterscheiden sich in ihren Sensibilitäten gegenüber abiotischen (zum Beispiel Temperatur, Feuchtigkeit, pH-Wert) und biotischen Faktoren (zum Beispiel Nahrungsverfügbarkeit). Das Wissen über diese Sensibilitäten und die Funktionen einzelner Arten ist in der Literatur verstreut. Eine zielgerichtete Bewertung der Bodenqualität durch funktional relevante Taxa sowie die Überwachung von Management- und Maßnahmenplanungen könnten mit Enchyträen in vielen Lebensraumtypen vermutlich gut durchgeführt werden. Um einen Überblick über die Funktionen und Indikatorarten zu erhalten, müssten die bekannten Datensätze aus der Literatur zusammengetragen und im besten Fall in einer Art-Merkmalen-Datenbank vereint werden. Einen Ansatz für eine solche Datenbank gibt es bereits (EnchyTraits, initiiert von C. Pelosi und R. Schmelz), jedoch wird sie derzeit wenig gepflegt. Dieses Zielbild ist relativ niederschwellig und einfach zu erreichen, bringt jedoch großen Informations- und möglicherweise Erkenntnisgewinn. Daher wird die Erstellung einer Funktions- und Indikator-Datenbank mit hoher Priorität eingestuft. Aufgrund der guten Datenlage ist dieses Ziel kurzfristig (1–2 Jahre) erreichbar.

Für Enchyträen ist das Bodenbiodiversitätsmonitoring mit eDNA/eRNA oder comDNA möglich. Eine grundlegende Bewertung, welche molekularbiologische Methode effektiv und robust ist, ist zu empfehlen. Möglicherweise ergeben sich entsprechende Ergebnisse aus laufenden Projekten, wie BioDive4Soil (Umweltbundesamt, FKZ 3724 NK 601 0).

Mikroarthropoden

Das Metabarcoding für Mikroarthropoden (Springschwänze, Horn- und Raubmilben) ist bisher wenig entwickelt, wobei Springschwänze noch als „die Einäugigen unter den Blinden“ gelten, während für Raubmilben fast keine Daten vorhanden sind. Für die zuverlässige Identifizierung dieser zum Teil hyperdiversen Taxa muss zunächst das bestmögliche Barcode festgelegt werden. Für Springschwänze gelten 16S rRNA und der D1- und D2-Abschnitt der 28S rRNA als informative Kombination (Schneider et al. 2011), für Hornmilben ist der D3-Abschnitt der 28S rRNA ein empfohlener Barcodeabschnitt (Lehmitz und Decker 2017). Für Raubmilben (Gamasina) gibt es derzeit keine Empfehlung. Bei der Markerwahl ist die unterschiedliche Mutationsrate der Gene zu berücksichtigen. Während die intraspezifische Varianz der 28S rRNA bei Mikroarthropoden typischerweise um 1 % liegt, ist sie beim COI-Gen mit etwa 5–10 % deutlich höher (Young et al. 2019, 2021; Le Cadre et al. 2024). Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der taxonomischen Auflösung wider. Während die 28S rRNA ein zuverlässiger Marker für Familien ist und in der Regel (aber nicht immer) auch Arten trennen kann, ist es mit COI möglich, kryptische Linien zu unterscheiden und ihre räumliche Verbreitung nachvollziehen. Die Wahl eines gemeinsamen Markergens für die zuverlässige Bestimmung der Biodiversität auf Art- oder Gattungsebene ist daher erstrebenswert, um vergleichbare Daten zwischen diesen Organismengruppen zu erhalten. Hierfür ist eine systematische Evaluierung der Referenzdatenbanken hinsichtlich der Abdeckung von Genen, Familien und Gattungen erforderlich. Die taxonomische Auflösung und Robustheit verschiedener Barcodes kann mit *in-silico* Tests mit den vorhandenen Daten untersucht werden. Die Evaluation und Selektion des besten Barcodegens haben hohe Priorität und sind kurzfristig (1–2 Jahre) erreichbar.

Aufbauend auf der Evaluation der besten Markergene (oder des besten Markergens) für Mikroarthropoden können weitere methodische Lücken bearbeitet werden. Das sind die kaum kuratierten und sehr lückenhaft bis rudimentär befüllten Referenzdatenbanken (hauptsächlich BOLD, NCBI, GBOL oder MIDORI2). Da für die Bewertung der Markergene die vorhandenen Einträge in den Referenzdatenbanken genutzt werden, kann darauf aufbauend oder parallel eine taxonomische Erhebung durchgeführt werden, die relevante taxonomische Lücken in den Datenbanken erfasst, um diese später effizient und gezielt ergänzen zu können. Für neue Referenzeinträge in den Datenbanken sollten mehrere Barcode gene genutzt werden, nicht ausschließlich COI. Zur Identifikation geeigneter Barcode gene sollten neben bereits existierenden Sequenzdatenbanken auch neu generierte Referenzgenome von Schlüsseltaxa herangezogen werden, um Barcode gene zu extrahieren. Neue Einträge müssen auf Qualität und taxonomische Korrektheit und Konsistenz überprüft werden, damit eine zuverlässige Bestimmung der Biodiversität auf Art- oder Gattungsebene beim Metabarcoding möglich ist. Dieses Zielbild ist mit hoher Priorität bewertet und kann kurzfristig (1–2 Jahre) erreicht werden.

Um die Zuverlässigkeit, Robustheit und Vergleichbarkeit von Metabarcoding-Monitoring zu gewährleisten und damit eine sachgerechte Bewertung von Trends und Umweltzuständen zu ermöglichen, sind neben hochwertigen, kuratierten Datenbanken auch für Mikroarthropoden standardisierte experimentelle Protokolle für die Trennung der Tiere von der Bodenmatrix für molekularbiologische Analysen, der DNA-Extraktion, PCR-Bedingungen und Primerwahl, Sequenzierung und bioinformatische Auswertung erforderlich. Dieses Zielbild wird hoch priorisiert und kann mittelfristig (3–5 Jahre) erreicht werden.

Eine grundsätzliche strategische Überlegung für das molekularbiologische Monitoring von Mikroarthropoden sollte berücksichtigen, dass der Gewinn von comDNA aufgrund der Probenahme und der Austreibung der Tiere aus der Bodenmatrix relativ aufwendig ist. Für diese Organismengruppe könnte ein Monitoring mittels eDNA daher eine attraktive Alternative darstellen. Bei der eDNA-Gewinnung für mikrobielle Gemeinschaften (ISO11063:2020, siehe "Verweis auf bestehende ISO-Richtlinien") wird der Boden im Vorfeld auf 2 mm gesiebt und enthält somit die Mesofauna (Mikroarthropoden sowie den Großteil der Enchyträen). Im Rahmen des Projekts „Standardisierung genetischer Verfahren zur Charakterisierung von ausgewählten Arten von Bodeninvertebraten als Voraussetzung von deren Nutzung zur Bodenqualitätsbeurteilung“ (MetaInvert), das durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz (BMWK) im Rahmen der WIPANO-Förderlinie gefördert wurde (<https://metainvert-iso.senckenberg.science/de/>), wurden bereits grundlegende Arbeiten zur Standardisierung comDNA-basierter Ansätze für Bodeninvertebraten durchgeführt. Dabei standen insbesondere die comDNA-Extraktion, Metabarcoding-Analysen sowie die Reproduzierbarkeit der Verfahren zwischen Laboren im Fokus. Ein Vorteil von comDNA-Daten ist, dass Relikt-DNA weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Eine fundierte Entscheidung über die geeignetste Methode für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring sollte auf empirischen Daten basieren.

Regenwürmer

Es wird empfohlen, den Einsatz molekularbiologischer Verfahren im behördlichen Regenwurm-Monitoring gezielt zu prüfen und ihren Mehrwert im Vergleich zu etablierten Standardmethoden zu bewerten. Drei wesentliche Nachteile des traditionellen Monitorings von Regenwürmern sind:

- ▶ der zeit- und personalaufwendige Prozess der Handauslese der Tiere,
- ▶ die Tötung der Tiere für die anschließende Bestimmung, sowie
- ▶ die Schwierigkeit der zuverlässigen morphologischen Artbestimmung juveniler Individuen.

Die Nutzung von eDNA kann den Prozess der Probenahme und Bestimmung erheblich vereinfachen und beeinträchtigt die Tiere nicht wesentlich. Allerdings kann eDNA keine Angaben zur Abundanz oder Biomasse liefern, und die Herkunft der regenwurmspezifischen DNA bleibt unklar, da sie aus sehr kleinen juvenilen Individuen, Kokons, regenwurmeigenen Zellen im Kot oder Relikt-DNA stammen kann. Da eDNA im Boden sehr stabil sein kann, könnten auch Arten detektiert werden, die nicht mehr auf der Fläche vorkommen. Der am häufigsten verwendete Regenwurmmarker (16S rRNA) produziert ein sehr kurzes Fragment (< 100 bp), was die taxonomische Zuordnung erschwert und die Detektion falscher Positiver wahrscheinlicher macht.

Das Metabarcoding von comDNA vermeidet einige Nachteile der eDNA, da nur auf der Fläche gesammelte Individuen in die Analyse eingehen. Zwar können alle Individuen, auch juvenile, ohne taxonomische Expertise hochauflösend auf Art bestimmt werden, aber die Tötung der Individuen ist obligatorisch und der aufwendige Prozess der Handauslese bleibt bestehen. Für comDNA werden meist Gewebeproben (zum Beispiel einige Schwanzsegmente) verwendet, da der Regenwurmdarm Erde enthält, die molekularbiologische Prozesse inhibiert. Auch wenn die taxonomische Bestimmung prinzipiell entfällt, bleibt hierfür ein gewisser personeller Aufwand bestehen, der jedoch die Möglichkeit eröffnet, parallel Abundanz und Biomasse auf Populationsebene zu erfassen.

Die Anwendung von Metagenomik basierend auf eDNA schließt Regenwurm-DNA automatisch mit ein. Das Sammeln und Präparieren von Individuen sowie labortechnische Verfahren wie PCR mit regenwurmspezifischen Primern entfallen. Allerdings ist noch nicht klar, in welchem Ausmaß Relikt-DNA oder Regenwurm-DNA die Biodiversität der Ergebnisse bestimmen. Größere Individuen fehlen beispielsweise in der eDNA, da Bodenproben in der Regel auf 2 mm gesiebt werden, sie können jedoch über DNA-Spuren dennoch im Datensatz erscheinen. Abundanz und Biomasse können auf diese Weise jedoch nicht erfasst werden. Molekularbiologische Verfahren auf Basis von eRNA (RNA-Metabarcoding, Metatranskriptomik) können den Anteil an Relikt-DNA Signalen verringern, müssen aber in vergleichenden Studien mit Mock Communities validiert werden, um ihre Zuverlässigkeit bei der Erfassung der Regenwurm-Diversität und den Mehrwert für Ökosystemfunktionen zu bestimmen.

Metabarcoding wurde für Regenwürmer (Lumbricidae) bereits in mehreren Studien erfolgreich eingesetzt. Die Interpretation der Ergebnisse ist jedoch nicht immer eindeutig. Taxa können molekularbiologisch nachgewiesen werden, die in parallel erhobenen morphologischen Vergleichsproben nicht auftreten. Der Ursprung dieser DNA bleibt unklar (Relikt-DNA oder nicht erfasste Organismen). Im Rahmen von Monitoringprojekten, die bereits mehrere Organismengruppen (zum Beispiel Bakterien, Archaeen, Pilze oder Protisten) mithilfe von Metagenomik erfassen, sollte geprüft werden, ob die Erfassung von Regenwürmern ergänzend integriert werden kann. Dies könnte die Effizienz steigern und Synergien nutzen.

Aufgrund der Vor- und Nachteile der traditionellen und molekularbiologischen Methoden (eDNA/eRNA und comDNA, Metabarcoding, Metagenomik/Metatranskriptomik) muss die Kosten-Nutzen-Abwägung strategisch bedacht werden. Eine sorgfältige Bewertung der methodischen, praktischen und finanziellen Vorteile sowie des Mehrwerts molekularbiologischer Verfahren in Bezug auf den Umfang des Monitorings von Regenwürmern ist grundlegend empfohlen. Dieses Zielbild hat hohe Priorität und kann kurzfristig (1–2 Jahre) erarbeitet werden.

Für ein zukunftsfähiges, standardisiertes und methodisch validiertes Monitoring von Regenwürmern, das molekularbiologische und traditionelle Ansätze effektiv kombiniert und die Tiere effizient, vergleichbar und vollständig erfasst, ist es erforderlich, Labor-, Sequenzierungs- und bioinformatische Analyseprotokolle zu standardisieren und ein einheitliches Markergen festzulegen. Zurzeit werden 16S rRNA und COI parallel verwendet, deren Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher taxonomischer Auflösung nicht direkt vergleichbar sind. Dieses Zielbild hat ebenfalls hohe Priorität und ist kurzfristig (1–2 Jahre) umsetzbar.

Abschließend sollte eine strategische Grundsatzentscheidung getroffen werden, ob das Regenwurmmonitoring zukünftig klassisch, molekularbiologisch oder in einer kombinierten Form erfolgen soll. Außerdem sollte geprüft werden, ob invasive Arten, zum Beispiel der Familie Megascolecidae (*Amyntas* spp. und *Metaphire* spp.) in das Monitoring aufgenommen werden sollten.

Tab. 2: Organismenspezifische Bewertung des Metabarcoding.

Organismen- gruppe	Lücke	Meilenstein	Zielbild	Priorität	Zeithorizont
Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen)	Quantifizierung (semiquantitativ) nicht standardisiert, Erfassung des Off-target Anteils wichtig	Interne Standards für absolute Quantifizierung mittels spike-in DNA und qPCR, beziehungsweise ddPCR Kalibrierung	Quantitative Biodiversitätserfassung mit vergleichbaren Häufigkeiten der Taxa	mittel	mittelfristig (3–5 Jahre)
Pilze	uneinheitliche Verwendung der ITS- Primer (ITS1, ITS2) uneinheitliche Referenzdatenbanken	Harmonisierung der Primerwahl Etablierung mit kuratierter Referenzdatenbank (empfohlen wird UNITE)	konsistentes und robustes Monitoring, international und über Zeitreihen hinweg vergleichbar, stabile taxonomische Zuweisung für unabhängige Datensätze	hoch	Kurzfristig (1–2 Jahre)
Protisten	lückenhafte Abdeckung in der PR2- Referenzdatenbank starker taxonomischer Bias mit 18S- Primern	Design alternativer 18S-Primer Erweiterung und Kuratierung der PR2 Referenzdatenbank um bodenspezifische Linien	Deutlich verbesserte Detektion zentraler Linien und robuste taxonomische Zuweisung	hoch	langfristig (> 5 Jahre)
Bodenfauna	uneinheitliche Markerwahl (18S, 28S, 16S, COI)	Vergleich und Evaluation der Referenzdatenbanken für die verschiedenen Markergene und Auswahl des am besten geeigneten Markergens für Bodenfauna, insgesamt und für die hier verwendeten Organismengruppen	Reproduzierbare Zuordnung von molekularen Daten zu Arten oder Gattungen	hoch	mittelfristig bis langfristig (3 bis > 5 Jahre)
Bodenfauna	Referenzdatenbanken sehr unvollständig	Aufbau einer Referenzdatenbank mit morphologisch validierten Sequenzen	Erkennung von Leitarten aufgrund solider taxonomischer Zuordnung unabhängiger Datensätze (historische eDNA-Proben, internationale Datensätze)	hoch	langfristig (> 5 Jahre)

Bodenfauna	fehlende Standardisierung, uneinheitliche Extraktions- und PCR-Protokolle, fehlende Ringtests	Evaluierung durch Ringtests und Festlegung von Standards für PCR-Protokolle, Primer, Sequenzierungstiefe, bioinformatische Analysetools	Vergleichbare, reproduzierbare und konsistente Ergebnisse für Bodenbiodiversitätsmonitoring	hoch	mittelfristig (3–5 Jahre)
Bodenfauna	funktionelle Zuordnung	Datenbank, die Artnamen mit Funktionen verbindet	Zielgerichtete Bodenbewertung, Frühwarnsystem, Ableitung von Ökosystemfunktionen als Grundlage für die Entwicklung von zielgerichteten Managementplänen.	hoch	je nach Organismengruppe* kurzfristig oder mittelfristig
Fadenwürmer	taxonomische Auflösung mit 18S-Primern in SILVA und PR2 auf unzureichendem Artniveau	gezielte Sequenzierung von relevanten Taxa zur Aktualisierung und Erweiterung der Referenzdatenbanken	hochauflösende, robuste Referenzdatenbank	hoch	Mittelfristig (3–5 Jahre)
Fadenwürmer	geringe Sensitivität für seltene Gruppen	Verbesserung der Erfassung seltener Taxa durch höhere Sequenzierungstiefe, Einsatz von Replikaten und gruppenspezifischen Primern	robuste Methode für Bodenmonitoring, die dominante und seltene Arten zuverlässig erfasst	mittel	mittel- bis langfristig (3 bis > 5Jahre)
Enchyträen	Datenbank (NCBI) hat sich deutlich verbessert aufgrund des Scandinavian Barcode of Life Projektes, weiterer Aufbau für Deutschland notwendig	Sequenzierung morphologisch validierter Arten	nahezu vollständige Referenzdatenbank	hoch	mittelfristig (3–5 Jahre)
Enchyträen	kryptische Arten vorhanden, aber Dimension unbekannt, Festlegung eines Standardgens für Monitoring (Erséus et al. 2023)	breit angelegtes Sampling-Programm mit phylogenetischen Analysen zur Erfassung kryptischer Arten, ihrer Barcode gene, ihrem Verbreitungsgebiet und ihrer Ökologie	hochauflösendes Biodiversitätsmonitoring von Enchyträen, mit zuverlässiger Zuordnung der Sequenzen innerhalb von Artkomplexen	hoch	mittelfristig (3–5 Jahre)

Enchyträen	Übersicht über Funktionen und Indikatorarten	Zusammentragen von bekannten Datensätze (Literatur), inklusive einer Art-Merkmalen-Datenbank (wie EnchyTraits von Celine Pelosi, Rüdiger Schmelz)	zielgerichtete Bewertung der Bodenqualität durch funktional relevante Taxa und zielgerichtete Management- und Maßnahmenplanung	hoch	Kurzfristig (1–2 Jahre)
Mikroarthropoden (Springschwänze, Horn- und Raubmilben)	kein geeigneter Barcode als Alternative für das zum Teil hochvariable COI-Gen vorhanden	in-silico-Tests, die taxonomische Auflösung und Robustheit verschiedener Barcodes untersuchen	Identifizierung und Festlegung des bestmöglichen Barcodegens für zum Teil hyperdiverse Taxa	hoch	kurzfristig (1–2 Jahre)
Mikroarthropoden (Springschwänze, Horn- und Raubmilben)	schlecht kuratierte und sehr unvollständige bis rudimentäre Referenzdatenbank (BOLD, NCBI)	Datenbankenevaluation nach Genen, Familien und Gattungen und Kuratierung, um zu erfassen, welche Taxa fehlen	Erfassung der Möglichkeiten für eine zuverlässige Bestimmung der Biodiversität auf Art- oder Gattungsebene	hoch	kurzfristig (1–2 Jahre)
Mikroarthropoden (Springschwänze, Horn- und Raubmilben)	uneinheitliche Methodik, und daher nicht vergleichbare Datensätze, zum Beispiel aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Primer für dasselbe Markergen	Standardisierung der Protokolle für DNA-Extraktion und PCR, der Sequenzierungstiefe und der bioinformatischen Auswertung. Festlegung des/der Barcodes für verschiedene Gruppen.	Verbesserung der Zuverlässigkeit, Robustheit und Vergleichbarkeit von Monitoringergebnissen, die die Genauigkeit, Aussagekraft und Bewertung von Trends und Umweltzuständen erlauben	hoch	mittelfristig (3–5 Jahre)
Regenwürmer	Der Mehrwert der molekularen Methoden für Regenwürmer ist unklar. Regenwürmer bieten hohe funktionelle Auflösung über die Artnamen und das Monitoring ist am Besten etabliert, allerdings:	Evaluierung der methodischen, praktischen und finanziellen Vorteile der molekularen Methoden mit Entscheidung für die Strategie des zukünftigen Regenwurmmonitorings.	Ein zukunftsfähiges, standardisiertes und methodisch validiertes Monitoring, das molekulare und traditionelle Ansätze effektiv kombiniert, um Regenwürmer effizient, vergleichbar und vollständig zu erfassen. Dies ermöglicht zudem eine fundierte Zustandsbewertung der Böden sowie die Nachverfolgung ihrer Entwicklung im Zuge von Verbesserungsmaßnahmen.	hoch	kurzfristig (1–2 Jahre)

Regenwürmer	kann comDNA kryptische Arten und Juvenile bestimmen, aber die Sammlung ist sehr aufwendig	einheitliches Markergen (16S oder COI), deutliche Verbesserung der Referenzdatenbanken notwendig	hoch	kurzfristig (1–2 Jahre)
Regenwürmer	kann eDNA nicht quantifizieren oder Biomasse bestimmen, und der Einfluss von Relikt-DNA ist unbekannt, aber Datenaufnahme ist deutlich weniger invasiv und zeitsparender als bei traditionellen Methoden oder comDNA	Standardisierung der DNA-Extraktions- und PCR-Protokolle und der bioinformatischen Analysen. Evaluation der Relikt-DNA notwendig über Mock- und Zeitreihenanalysen.	hoch	mittelfristig (3–5 Jahre)

Tabelle 2 Die identifizierten Lücken in Aussagekraft und Robustheit sowie die daraus abgeleiteten Meilensteine basieren auf den Ergebnissen der Literaturrecherche und umfassen vor allem Primer/Marker, Referenzdatenbanken und die Validierung der Methode. Die definierten Zielbilder beschreiben die Voraussetzungen, um die Methode für ein standardisiertes behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring anwendbar zu machen. Jedes Zielbild ist mit einer Priorität (hoch, mittel, niedrig) versehen, die die Dringlichkeit des jeweiligen Handlungsbedarfs bewertet. Die Zeithorizonte für die Umsetzung der Meilensteine sind in kurzfristig, mittelfristig und langfristig unterteilt und als Richtwerte zu verstehen. Sie können durch technische oder methodische Anpassungen oder Ressourcenverfügbarkeiten (zum Beispiel Personal, finanzielle Mittel) beeinflusst werden. Die tatsächliche Umsetzung hängt zudem vom jeweils angestrebten Zielbild ab. * Bodenfauna: die Entwicklungsdauer unterscheidet sich zwischen den Organismengruppen und reicht von kurzfristig (zum Beispiel 1–2 Jahre für Fadenwürmer, Enchyträen, Regenwürmer) bis mittelfristig (3–5 Jahre, zum Beispiel für Mikroarthropoden, Fadenwürmer).

4 Entwicklungsschritte genombasierter Analysemethoden

Metagenomik und Metatranskriptomik sind etablierte Methoden im Forschungsbereich von Bakterien, Archaeen, Protisten und Pilzen, werden aber im Biodiversitätsmonitoring allgemein nicht systematisch eingesetzt. Es zeichnet sich in der Literatur eine Tendenz ab, dass sie langfristig PCR-basierte Verfahren wie das Metabarcoding ergänzen oder ersetzen könnten. Für die Bodenfauna wurden diese Methoden jedoch bislang nur eingeschränkt angewendet. Pilotstudien konzentrierten sich überwiegend auf mitochondriale Genome (Arribas et al. 2016, 2021, Andújar et al. 2015) und schöpften somit das Potential der Metagenomik (genomische Vollständigkeit) nicht aus, was daher nur begrenzte Aussagen zur Leistungsfähigkeit dieser Methode für die Bodenfauna erlaubt. Für die Metatranskriptomik existieren bislang nur vereinzelte Studien die Bodeninvertebraten untersuchten (Collins et al. 2023). Der geringere Einsatz der genombasierten Methoden im Vergleich zum Metabarcoding lässt sich darauf zurückführen, dass diese Techniken methodisch noch relativ jung sind, sowohl hinsichtlich der Sequenzierungstechnologie als auch in der Entwicklung der bioinformatischen Datenauswertung. Da Metagenomik und Metatranskriptomik ohne Primer auskommen, werden ihre notwendigen Entwicklungsschritte methodisch und nicht organismenspezifisch bewertet. Für Pilze wird im Kontext von Metagenomik und Metatranskriptomik keine Bewertung vorgenommen, da aus der Literaturrecherche im Rahmen dieses Gutachtens kein klarer Mehrwert gegenüber Metabarcoding abzuleiten war.

Genombasierte Verfahren haben im Vergleich zum Metabarcoding mehrere wesentliche Vorteile. Erstens sind sie PCR-freie Verfahren, was bedeutet, dass es keine Selektion oder Überrepräsentation von Organismen aufgrund der Primerwahl oder stochastischer Effekte während der Amplifikation gibt. Zweitens, einer der deutlichsten Vorteile der PCR-freien Ansätze liegt in der direkten Sequenzierung der DNA aus den Proben, was die Anzahl der technischen Schritte im Labor erheblich reduziert. Dies minimiert sowohl systemische als auch laborspezifische Fehler und verringert die Anzahl der zu standardisierenden technischen Schritte. Drittens entfällt die Entwicklung von Primern für Markergene und Organismengruppen, was ein sehr zeitintensiver Prozess sein kann. Viertens entfällt die Notwendigkeit, eine Auswahl an Markergenen zu treffen, da durch die Genomsequenzierung alle gängigen Marker vorhanden sind, was wiederum den labortechnischen Aufwand erheblich reduziert. Fünftens wird mit einem einzigen Sequenzierungslauf die gesamte Lebensgemeinschaft der Probe organismenübergreifend sequenziert und anschließend ausgewertet. Auch dies reduziert die Anzahl der labortechnischen Schritte im Vergleich zum Metabarcoding erheblich, da nicht für jede Organismengruppe von Interesse ein oder mehrere PCRs notwendig sind. Sechstens korreliert die Anzahl der sequenzierten Reads in der Metagenomik grundsätzlich besser mit der Biomasse der Organismen, da der PCR-basierte Vervielfältigungsschritt entfällt. Allerdings sind noch umfassende und belastbare empirische Validierungen erforderlich (Schmidt et al. 2022).

Das Erreichen dieser Zielbilder (Standardisierung, Referenzdatenbank) zu genombasierten Methoden ist mit der Priorität mittel bewertet, da die Bedeutung der Metagenomik für das behördliche Biodiversitätsmonitoring noch unklar ist. Der Zeithorizont ist insgesamt als langfristig (> 5 Jahre) eingestuft, kann aber für einzelne Organismengruppen kurz- (1–2 Jahre) oder mittelfristig (3–5 Jahre) erreicht werden.

4.1 Aufbau von Referenzgenomen

Ein noch grundlegender Nachteil der genombasierten Verfahren, im Vergleich zum Metabarcoding, ist die vergleichsweise geringe Anzahl an Referenzgenomen. Dies liegt zum einen daran, dass Genomsequenzierungen für Referenzdatenbanken aufwendiger und kostenintensiver sind als einzelne Barcode-Sequenzen, und zum anderen, dass die Methoden noch nicht so lange etabliert sind wie die Sequenzierung einzelner Markergene (DNA-Barcodes). Da sowohl Metabarcoding als auch genombasierte Methoden für die Bodenfauna bisher wenig angewendet werden, sollte strategisch abgewogen werden, ob künftig in eine barcode-basierte oder eine genombasierte Referenzdatenbank investiert wird. Barcode-basierte Referenzdatenbanken können mittelfristig schneller und kostengünstiger aufgebaut werden, während genombasierte Referenzdaten länger brauchen, um generiert zu werden, aber langfristig einen umfassenderen und nachhaltigen Ansatz darstellen könnten, da sie pro Referenz eine Vielzahl an Barcode-Genen enthalten.

Im Rahmen dieser Entscheidung sollte berücksichtigt werden, für welche Organismengruppen Investitionen in Metagenomik und damit in den Aufbau einer Referenzdatenbank langfristig den größten Nutzen bringen, während für andere Gruppen Metabarcoding ausreichend bleibt. Dabei ist unter anderem die Qualität der vorhandenen Referenzgenome zu berücksichtigen. Viele der derzeit in Referenzdatenbanken verfügbaren Genome sind unvollständig oder unzureichend annotiert, was funktionelle Analysen einschränkt. Zudem unterscheiden sich die hinterlegten Genome stark von ihrer Qualität. Welche Auswirkungen Referenzgenome minderer Qualität auf die taxonomische Annotation für Metagenomikdaten haben, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Für jede ausgewählte Organismengruppe sollte daher geprüft werden, welche zusätzlichen Referenzgenome benötigt werden und welche Mindeststandards für Qualität und Annotation gelten, um Metagenomik zuverlässig im Monitoring einzusetzen.

Ein vielversprechender Schwerpunkt für genombasierte Verfahren ist die Organismengruppe der Protisten. Diese zeichnen sich durch eine außergewöhnlich hohe genetische und phylogenetische Diversität aus, sodass bislang kein einzelnes Markergene die Gruppe zuverlässig und vollständig erfasst. Aufgrund der großen Diversität innerhalb von Alveolata, Rhizaria, Stramenopila und Excavata führen Metabarcoding-Primer dazu, dass bestimmte Linien bevorzugt oder andere vollständig verfehlt werden. Metabarcoding bleibt für Protisten daher selektiv und lückenhaft. Trotz der Tatsache, dass viele Protisten nicht kultivierbar sind, existieren mittlerweile praktikable Strategien, um Referenzdatenbanken kontinuierlich zu erweitern (Seeleuthner et al. 2018; Schoenle et al. 2025). Metagenomik bietet daher einen vielversprechenden Ansatz, um diese Organismengruppe repräsentativer zu erfassen.

Auch für Mikroarthropoden (Springschwänze sowie Horn- und Raubmilben) könnten genombasierte Verfahren strategisch vorteilhaft sein. Für diese Gruppen existiert bislang kein einzelner Barcode-Marker, der eine taxonomische Zuordnung aller Arten zuverlässig ermöglicht. Metagenomische Ansätze können aufgrund der größeren Menge genetischer Information potenziell umfassendere und genauere Klassifikationen liefern. Zudem besitzen Mikroarthropoden häufig relativ kleine Genome mit wenigen repetitiven Regionen, was Sequenzierung und Genom Assemblierung erleichtert und genombasierte Verfahren aus praktischer und wirtschaftlicher Sicht umsetzbar erscheinen lässt. Im Gegensatz dazu verfügen einige andere Organismen, wie der Regenwurm *Lumbricus terrestris* (Blaxter et al. 2023), über sehr große und komplexe Genome, was die Erstellung von Referenzgenomen und -transkriptomen aufwendig und

kostenintensiv macht. Für solche Gruppen sind genombasierte Verfahren derzeit weniger empfehlenswert.

Um die Priorisierung und Umsetzung genombasierter Methoden fundiert zu beurteilen, ist eine Bestandsaufnahme der bereits verfügbaren Genome in Referenzdatenbanken wie NCBI RefSeq, Ensembl oder Genome Warehouse sinnvoll. Ergänzend sollte in-silico untersucht werden, welchen Effekt die Genomqualität auf die taxonomische Annotation für Metagenomik hat. Auf dieser Grundlage lässt sich bewerten, für welche Organismengruppen weitere Referenzgenome benötigt werden und welche Mindestqualität diese erfüllen sollten. Eine solche Evaluation wird als hoch priorisiert eingestuft, da sie die Grundlage für das behördliche Monitoring mit molekularbiologischen Verfahren bildet und die Vor- und Nachteile von PCR- und genombasierten Methoden für die jeweiligen Gruppen klären kann. Für Mikroarthropoden kann eine entsprechende Evaluation relativ kurzfristig (1–2 Jahre) durchgeführt werden, eine umfassende Analyse aller relevanten Organismengruppen erfordert einen mittelfristigen Zeitraum (3 bis > 5 Jahre).

4.2 Standardisierung durchführen

Für genombasierte Verfahren (Metagenomik und Metatranskriptomik), genauso wie für das PCR-basierte Metabarcoding, ist die Entwicklung und Standardisierung von Laborprotokollen und bioinformatischer Pipelines für alle Organismengruppen unerlässlich, um vergleichbare und Biodiversitäts- und Funktionsprofile mit reproduzierbarer Datenqualität zu erzeugen. Im Gegensatz zum Metabarcoding erfordern genombasierte Verfahren einen deutlich höheren Bedarf an bioinformatischer Expertise sowie den Einsatz leistungsfähiger Rechenressourcen (High-Performance-Computing, HPC). Dies ist auf die erheblich größeren Datenmengen sowie den noch nicht vollständig etablierten Entwicklungsstand der Analysepipelines zurückzuführen.

Die bioinformatische Auswertung von Metagenomik- und Metatranskriptomik-Daten umfasst mehrere Schritte. Zuerst erfolgen die Qualitätskontrolle, das Trimmen und Filtern der Rohdaten. Anschließend (optional) werden redundante Reads entfernt und die Reads zu einer Referenzdatenbank oder an einem Genom ausgerichtet (mapping). Darauf folgt die Assembly, also das Zusammenfügen der Reads zu kontinuierlichen Sequenzen (contigs). Nach der Assembly werden die Contigs taxonomisch annotiert. Für diese Schritte steht eine Vielzahl an Softwarelösungen zur Verfügung, verbreitete Werkzeuge sind unter anderem Kraken2 oder QIIME, daneben kommen auch Programme wie DIAMOND (proteinbasierte Klassifizierung) oder MGS-Fast (schnelle metagenomische Klassifizierung) zum Einsatz. Für ein konsistentes Monitoring sollte jedoch ein einheitliches, validiertes Analysewerkzeug verwendet werden, um standardisierte und damit vergleichbare Ergebnisse sicherzustellen. Nach der taxonomischen Annotation kann eine funktionale Annotation erfolgen, bei der Gene und deren Funktionen identifiziert und kategorisiert werden. Die Komplexität dieser Schritte hängt von Fragestellung, Zielsetzung und verfügbaren Ressourcen ab. Häufig werden Standardparameter genutzt, die jedoch je nach Organismengruppe unterschiedlich geeignet sein können. Wie beim Metabarcoding existieren auch für genombasierte Verfahren bislang keine etablierten oder standardisierten bioinformatischen Pipelines. Die Entwicklung einer an die jeweiligen Organismengruppen angepassten, standardisierten Auswertungspipeline ist daher als langfristig sinnvoll einzuschätzen, da sie die Grundlage für reproduzierbare und belastbare Monitoringdaten bildet.

Für die Validierung und Standardisierung der Methoden sind Ringversuche mit Mock-Gemeinschaften sowie genomischer DNA beziehungsweise RNA, die aus definierten Gemeinschaften extrahiert wurde, erforderlich. Außerdem sollte die optimale Sequenzierungstiefe ermittelt werden, die erforderlich ist, um alle relevanten Organismengruppen in natürlichen Gemeinschaften ausreichend abzudecken. Da sich genombasierte Verfahren noch im Entwicklungsstadium befinden und ihr konkreter Mehrwert für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring erst noch nachgewiesen werden muss, wird die Priorität dieses komplexen Zielbilds, das alle Organismengruppen einschließt, als mittel eingestuft und ein langfristiger Zeithorizont (> 5 Jahre) Zeithorizont angesetzt ist.

4.3 Metatranskriptomikspezifische Entwicklungsschritte

Im Allgemeinen kann aus Boden entnommene RNA entweder ohne gezielte PCR-Amplifikation direkt sequenziert werden („shotgun“, oder PCR-freie Metatranskriptomik, analog zur Metagenomik) oder, wie beim Metabarcoding, gezielt über Primer bestimmte Markergene aus der cDNA amplifiziert und sequenziert werden (RNA-basiertes Metabarcoding). In diesem Gutachten wird unter „Metatranskriptomik“ ausschließlich die PCR-freie Sequenzierung der Gesamtheit der im Boden vorliegenden RNA betrachtet.

Der grundlegende Unterschied zu DNA-basierten Methoden besteht darin, dass RNA-Moleküle die zum Zeitpunkt der Probenahme aktiv exprimierten Gene wiedergeben und damit direkte Einblicke in Biosynthese-, Abbau- und Stressreaktionswege der Gemeinschaft liefern können. DNA-basierte Ansätze erfassen dagegen primär die potenzielle genetische Kapazität und Biodiversität einer Gemeinschaft, wobei Signale durch Relikt-DNA verzerrt werden können. Dagegen hat die RNA-Fraktion im Boden, insbesondere mRNA, deutlich kürzere Halbwertszeiten als DNA, wodurch dieser Bias potenziell reduziert wird. In welchem Ausmaß dies tatsächlich zu einer geringeren Relevanz von Relikt-Signalen führt, ist jedoch für verschiedene Bodentypen und Nutzungskontexte noch nicht systematisch untersucht (Cristescu 2019).

Mehrere Reviews zeigen das große Potenzial der Metatranskriptomik, um Ökosystemfunktionen zu erfassen. RNA-basierte Community-Profile korrelieren in Studien enger mit Umweltvariablen als DNA-basierte Profile (Meyer-Dombard et al. 2020; Franzosa et al. 2015; Laroche et al. 2016; Cristescu 2019). Experimentelle Arbeiten zu Abbaukurven weisen darauf hin, dass RNA eine feinere zeitliche Auflösung als DNA bietet (Qian et al. 2024; Scriver et al. 2023; Che-Pelecier et al. 2025; Morgado-Gamero et al. 2025). Die Kombination von eDNA und eRNA stellt daher einen vielversprechenden Ansatz für das Biomonitoring dar, ist jedoch mit zeitlichen und finanziellen Kosten verbunden und erfordert entsprechende Expertise zur Auswertung der Daten (Laroche et al. 2017). Trotz des vielversprechenden Erkenntnisgewinns durch die Kombination von eDNA und eRNA im Biomonitoring, ist es wichtig, strategisch zu überlegen, in welchem Rahmen der Einsatz von eRNA tatsächlich sinnvoll ist. Für ein flächendeckendes Biodiversitätsmonitoring ohne funktionellen Bezug oder bei geringerer räumlicher und zeitlicher Auflösung sollte der Nutzen von eRNA hinterfragt werden.

Ein weiterer Vorteil der Metatranskriptomik gegenüber der Metagenomik besteht darin, dass eine geringere und damit potenziell kostengünstigere Sequenzierungstiefe erforderlich ist. Da bei der RNA-Analyse große nicht-kodierende Genombereiche vieler Eukaryoten (zum Beispiel Introns oder repetitive Elemente) sowie DNA inaktiver Organismen nicht erfasst werden, ist die Informationsdichte pro Read höher. Ein RNA-Fragment repräsentiert daher mit hoher

Wahrscheinlichkeit ein funktionelles Gen eines aktiven Organismus. Dieser Vorteil setzt jedoch voraus, dass dominante ribosomale RNA effizient entfernt oder eukaryotische mRNA gezielt angereichert wird (zum Beispiel Poly-A-Selektion).

Für den praktischen Einsatz im Bodenmonitoring besteht weiterhin erheblicher Entwicklungsbedarf sowohl im Labor als auch in der Datenanalyse. Erforderlich sind standardisierte Protokolle für RNA-Extraktion, Probenkonservierung im Feld (zum Beispiel mit RNAlater) sowie Verfahren, die die hohe Instabilität von RNA und bodenspezifische Parameter wie pH-Wert oder Tongehalt berücksichtigen. Parallel dazu müssen robuste bioinformatische Workflows mit geeigneten Qualitätsmetriken und effizienter rRNA-Depletion entwickelt werden, um die Vergleichbarkeit von Daten zwischen Laboren und über Zeitreihen hinweg zu gewährleisten. Zudem ist die optimale Sequenzierungstiefe zu bestimmen, um alle relevanten Organismengruppen in natürlichen Gemeinschaften zuverlässig zu erfassen. Da eine methodisch robuste Grundlage Voraussetzung für jedes RNA-basierte Monitoring ist, wird dieser Entwicklungsschritt mit hoher Priorität bewertet und erscheint mittelfristig (3–5 Jahre) erreichbar. Diese Anforderungen gelten gleichermaßen für RNA-basiertes Metabarcoding und Metatranskriptomik.

Ein vielversprechender strategischer Ansatz zur effizienteren Datenauswertung ist der Aufbau standortspezifischer Referenzmetatranskriptome. Dabei wird zunächst ein umfassender Katalog der an einer Dauerbeobachtungsfläche vorkommenden Transkripte erstellt, auf den zukünftige Zeitreihendaten direkt kartiert werden können. Dies ermöglicht eine kosteneffiziente Analyse von Veränderungen in Abundanz und Aktivität, auch für Organismen, die taxonomisch noch nicht beschrieben sind („Unknowns“), aber funktionelle Rollen im lokalen Ökosystem erfüllen. In Pilotstudien sollte geprüft werden, ob dieser Ansatz unter realen Feldbedingungen robust ist und für welche Fragestellungen er DNA-basierten Methoden überlegen sein kann. Da zunächst methodische Grundlagen, insbesondere die Gewinnung und Aufbereitung von RNA, im Vordergrund stehen, wird dieses Zielbild mit mittlerer Priorität bewertet. Seine Umsetzung erscheint mittel- bis langfristig (3 bis > 5 Jahre) realistisch, abhängig davon, wie viele Referenzflächen einbezogen werden.

Langfristig kann Metatranskriptomik darüber hinaus gezielt eingesetzt werden, um funktionelle Marker für spezifische Fragestellungen zu erfassen, etwa Prozesse im Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Phosphorkreislauf oder Reaktionen auf Schadstoffbelastungen. Damit lassen sich aktive Stoffwechselwege funktioneller Gruppen sowie ökologische Reaktionen von Organismengemeinschaften direkt untersuchen. Voraussetzung hierfür ist eine klare thematische Definition der Einsatzbereiche RNA-basierter Methoden für unterschiedliche Organismengruppen sowie eine strategische Abwägung ihres Mehrwerts gegenüber DNA-basierten Ansätzen. Für eine evidenzbasierte Bewertung von Ökosystemfunktionen sind zudem hochauflösende Zeitreihen erforderlich, die Veränderungen in Abhängigkeit von Umweltfaktoren erfassen. Die Entwicklung entsprechender Ansätze wird als mittelfristiges Ziel (3–5 Jahre) mit mittlerer Priorität bewertet.

Tab. 3: Entwicklungsschritte für genombasierte Verfahren.

Organismen- gruppe	Lücke	Meilenstein	Zielbild	Priorität	Zeithorizont
Metagenomik (DNA basiert)					
Alle	uneinheitliche, wenig entwickelte Bioinformatik-Workflows	Entwicklung standardisierter bioinformatischer Pipelines für verschiedene Organismengruppen mit Definition zentraler Prozessschritte (Qualitätsfilter, Assembly, Annotation)	Vergleichbare Funktions- und Taxaprofile mit reproduzierbarer Datenqualität	mittel	langfristig (> 5 Jahre)
Alle	fehlende Vergleichbarkeit	Ringtests mit Mock Communities und genomischer DNA/RNA von definierten Gemeinschaften	Vergleichbare Funktions- und Taxaprofile mit reproduzierbarer Datenqualität	mittel	langfristig (> 5 Jahre)
Protisten	Anzahl an Referenzgenomen gering, unvollständige oder fehlende funktionelle Annotation von den meisten im Boden lebenden Protisten.	Annotation der vorhandenen Genome. Long-read-Sequenzierung könnte sich als bessere Strategie anbieten, weil sie auch nicht kultivierbare Protisten ausreichend informativ erfassen könnten, im Gegensatz zu den zu kurzen Reads des gängigen Metabarcodings.	Verbesserte taxonomische Zuordnung und Identifikation, sowie Etablierung validierter funktioneller Marker zur zuverlässigen Erfassung von Zersetzer- und Pathogensignaturen und relevanter funktioneller Gene.	hoch	Langfristig (> 5 Jahre)
Bodenfauna	Unvollständige oder fehlende funktionelle Annotation	Annotation der vorhandenen Genome	Aufbau einer hochwertigen, umfassenden Referenzgenom-Datenbank mit funktioneller	hoch	langfristig (> 5 Jahre)
Fadenwürmer, Enchyträen, Mikro- arthropoden, Regenwürmer	Anzahl an Referenzgenomen gering	Qualitätskontrolle und Zusammenführen vorhandener Genome (NCBI RefSeq, Ensembl, Genome Warehouse) in einer Datenbank	Annotation, die eine reproduzierbare und zuverlässige Zuordnung molekularer Daten zu Arten, Gattungen und Funktionen ermöglicht.	hoch	kurzfristig (1–2 Jahre)
		Genomsequenzierung von wichtigen, aber fehlenden Gruppen		hoch	langfristig (> 5 Jahre)
Metatranskriptomik (RNA basiert)					

Alle	RNA-Gewinnung aus Böden noch nicht auf Reproduzierbarkeit und Robustheit getestet	Validierte Protokolle für verschiedene Bodentypen mit standardisierten Mock Gemeinschaften zur Qualitätskontrolle	reproduzierbare Metatranskriptom-Daten mit dokumentierter rRNA/gDNA-Entfernungseffizienz und Qualitätsmetriken die zwischen Laboren vergleichbar sind	hoch	mittelfristig (3–5 Jahre)
Alle	Referenz-Transkriptom fehlen	Erstellung standortspezifischer Referenzmetatranskriptome	taxonomische und funktionelle Erfassung der aktiven Bodenorganismen	mittel	mittel- bis langfristig (3 bis > 5 Jahre)
Alle	Sequenzierung: Einfluss der Sequenzierungsmethode auf Reproduzierbarkeit noch unbekannt (Library Erstellung, Sequenzierungsplattform und Sequenzierungstiefe)	Sättigungskurven-Analyse zur Bestimmung optimaler Read-Zahlen pro Probe und Methode	Beurteilung der Vergleichbarkeit der Sequenzierungsmethoden für RNA-Proben	hoch	kurzfristig (1–2 Jahre)
Alle	Bioinformatik: Heterogene Ergebnisse je nach bioinformatischer Pipeline	Identifizierung /Entwicklung von robustem Workflow als Basis für Standardisierung	Vergleichbarkeit von Ergebnissen (interkalibrierbar)	hoch	mittelfristig (3–5 Jahre)
Alle	Thematische Definition: Metatranskriptomik benötigt konkrete Zielvorgaben: welche Expression soll bezüglich welcher Umweltparametern gemessen oder analysiert werden.	thematische Definition für den Einsatz von Metatranskriptomik für die verschiedenen Organismengruppen	Kategorisierung der Metatranskriptomik-Marker mit Bezug zu Fragestellungen (Nahrungsnetz, CNP-Kreislauf, Belastungen mit Schadstoffen) ermöglicht die Erfassung aktiver Stoffwechselwege, funktioneller Gruppen und ökologischer Reaktionen von Organismengemeinschaften.	hoch	mittelfristig (3–5 Jahre)
Alle	Informationen über kurzfristige Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren fehlen	hochauflösende, langfristige Zeitreihe (Labor oder Freiland) in Abhängigkeit von Umweltfaktoren	verbesserte Bewertung von Ökosystemfunktionen im Monitoring	mittel	mittelfristig (3–5 Jahre)

Tabelle 3 Die identifizierten Lücken in Aussagekraft und Robustheit sowie die daraus abgeleiteten Meilensteine basieren auf den Ergebnissen der Literaturrecherche. Die definierten Zielbilder beschreiben die Voraussetzungen, um die Methode für ein standardisiertes behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring anwendbar zu machen. Jedes Zielbild ist mit einer Priorität (hoch, mittel, niedrig) versehen, die die Dringlichkeit des jeweiligen Handlungsbedarfs bewertet. Die Zeithorizonte für die Umsetzung der Meilensteine sind in kurzfristig, mittelfristig und langfristig unterteilt und als Richtwerte zu verstehen. Sie können durch technische oder methodische Anpassungen oder Ressourcenverfügbarkeiten (zum Beispiel Personal, finanzielle Mittel) beeinflusst werden. Die tatsächliche Umsetzung hängt zudem vom jeweils angestrebten Zielbild ab.

5 Identifikation von Meilensteinen zur Entwicklung innovativer Auswerteverfahren von Bodenbiodiversitätsdaten

Die große Biodiversität und Abundanz von Bodenorganismen, gepaart mit ihrer hohen räumlichen Heterogenität und sehr geringen Körpergröße, stellt das behördliche Biodiversitätsmonitoring von Boden vor erhebliche taxonomische Herausforderungen. Das Sammeln und Bestimmen von Arten ist aufwendig, und molekularbiologische Verfahren zeigen spezifische Limitationen. Basierend auf genetischen Barcodes wird die kryptische Diversität von Organismen sichtbar, oder, je nach Wahl des Markers, wird die Anzahl morphologischer Arten unterschätzt, wenn die taxonomische Auflösung zu gering ist. Methodische Artefakte wie Relikt-DNA verzerren Biodiversitätsindizes und taxonomische Zuordnungen können nur das identifizieren, was in Referenzdatenbanken vorliegt. Die Erfassung der Biodiversität ist also abhängig von der Vollständigkeit der Referenzdatenbanken, aber auch von der Sequenzierungstiefe, um Arten mit geringer Häufigkeit und Biomasse ebenfalls zu erfassen. Klassisch-taxonomische und molekularbiologische Verfahren bilden folglich jeweils einen bestimmten Teil der Biodiversität ab. Daher ist es sinnvoll, alternative Auswerteverfahren ergänzend in Betracht zu ziehen, um die Aussagekraft des behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitorings zu erweitern und methodische Verzerrungen besser abfangen zu können.

5.1 Aussagekraft taxonomiefreier Ansätze evaluieren

Taxonomiefreie Ansätze, die auf molekularbiologischen Daten wie ASVs (Amplicon Sequence Variants: Sequenzen, die sich in nur einer Nukleotidposition unterscheiden) und k-mers (kurze Sequenzfragmente aus k Nukleotiden) basieren, können Diversitätsmuster ohne Referenzdatenbanken beschreiben und erscheinen als attraktive Alternative. Für robuste, taxonomiefreie Diversitätsindikatoren, die Biodiversitätstrends und den Gesundheitszustand des Bodens verlässlich abbilden sollen, sind jedoch umfangreiche und vergleichende Analysen erforderlich, um deren Aussagekraft und Mehrwert für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring zu erfassen. Zunächst ist die allgemeine Vergleichbarkeit dieser taxonomiefreien Indizes unklar. Vergleichende Analysen von umfangreichen Metabarcoding-Datensätzen aus gut charakterisierten Standorten (inklusive morphologischer Artenlisten) sind notwendig, um Muster zu identifizieren und die taxonomiefreien Indizes belastbar zu validieren. Da diese umfangreichen Daten von gut charakterisierten Standorten noch nicht vorliegen, wird diesem Zielbild die Priorität mittel zugeordnet und ein langfristiger (> 5 Jahre) Zeithorizont für die Umsetzung veranschlagt. Darüber hinaus ist die Bedeutung eines reinen Biodiversitätsindex für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring ohne funktionelle Aussage oder Identifizierung von Indikatorarten noch unklar. Bodengemeinschaften bestehen aus einer Vielzahl funktioneller Gruppen. Ohne Artzuweisung wird diese Information durch rein nukleotidbasierte Indizes nicht ausreichend erfasst. Die Analyse von Metatranskriptom-Datensätzen aus charakterisierten Standorten kann evidenzbasierte Hinweise liefern, ob der taxonomiefreie Ansatz genügend Informationen für das Bodenbiodiversitätsmonitoring bereitstellt. Da auch hierfür entsprechende Daten derzeit nicht existieren, wird die Priorität ebenfalls als mittel und der Zeithorizont als langfristig (> 5 Jahre) eingestuft.

5.2 Evaluation der Analyse funktioneller Gruppen und Merkmale

Ein vielversprechender Weg, die Aussagekraft des Monitorings zu erhöhen, ist die Auswertung funktioneller Gruppen. Ziel ist es, funktionelle Kompositionsindizes zu entwickeln, die Trends in ökologischen Prozessen (zum Beispiel Kohlenstoffumsatz, Nährstoffkreisläufe) abzubilden. Die Erfassung und Auswertung von funktionellen Gruppen und Merkmalen (Traits) sowie deren Umwandlung in funktionelle Kompositions-Indizes, die Trends in ökologischen Prozessen (zum Beispiel Zersetzung als Proxy für den Kohlenstoffkreislauf) abbilden, ist ein vielversprechender Ansatz. Solche Indizes ermöglichen ein systemisches Verständnis eines Standorts und liefern wertvolle Erkenntnisse über Ökosystemfunktionen. Aufgrund der funktionellen Redundanz von vielen bodenlebenden Organismen ist ein funktions- oder merkmalsbasierter Index zudem grundsätzlich robuster als Biodiversitätsindizes, die ausschließlich auf Artenzahlen basieren. Für die Umsetzung sind zwei komplementäre Wege denkbar. Methodisch lassen sich hierbei zwei Strategien verfolgen.

Der erste Ansatz (Weg 1) basiert auf der Zuweisung von Merkmalen (Traits) zu identifizierten Arten. Hierfür müssen morphologische oder ökologische Eigenschaften (zum Beispiel Zersetzer, Prädator, anözisch) in Datenbanken mit Artnamen und genetischen Profilen (Barcodes) verknüpft werden. Aus der Artenliste lässt sich so die funktionale Diversität und im Boden potentiell vorkommende Funktionen erfassen. Die Erstellung solcher Arten-Merkmalstabellen ist kurzfristig (1–2 Jahre) auf Basis von Literaturdaten möglich. Dieser Weg eignet sich besonders für gut beschriebene Gruppen wie Regenwürmer oder Enchyträen, da sie in Deutschland eine mittlere bis geringe Diversität aufweisen und funktionelle Merkmale für die meisten Arten gut beschrieben sind.

Der zweite Ansatz (Weg 2) umgeht die taxonomischen Artnamen und erfasst Funktionen direkt auf molekularbiologischer Ebene. Hierbei spielt die Metatranskriptomik eine Schlüsselrolle, da exprimierte Gene sequenziert werden, die potentiell für bestimmte Prozesse (zum Beispiel CNP-Kreisläufe, Stressreaktion) kodieren. Die Metatranskriptomik erfasst somit reale metabolische Aktivität der Gemeinschaft, unabhängig davon, welcher Organismus diese Funktion gerade ausführt. Die Validierung beider Ansätze an gut charakterisierten Standorten ist mittel- bis langfristig (3 bis > 5 Jahre) erforderlich. Der direkte funktionelle Ansatz (Weg 2) mittels Metatranskriptomik könnte langfristig eine Option für ein stärker prozessorientiertes, taxonomiefreies Monitoring darstellen, dessen Umsetzbarkeit noch zu evaluieren ist.

5.3 Automatisierte Bildauswertung zur Anwendungsreife entwickeln

Näherliegender als taxonomiefreie Indizes sind KI-basierte Verfahren der automatisierten Bildauswertung, die eine unmittelbare Unterstützung der klassischen Taxonomie und molekularbiologischen Methoden bieten (zum Beispiel DiversityScan, Wühl et al. 2021; CollembolaAI, Sys et al. 2022; EntoSieve, Ascenzi et al. 2025). Eine semiautomatisierte Bestimmung und Vorsortierung von Meso- und Teilen der Makrofauna (Larven, juvenile) auf Familien- oder Gattungsebene und bei charakteristischen Taxa sogar auf Artebene stellt ein realistisches und informatives Zielbild dar. Solche Systeme müssen trainiert werden, um Taxa zu sortieren, ihre Biomasse zu bestimmen und können in Kombination mit Metabarcoding oder Metagenomik-basierten Diversitätsbestimmungen informative Analysen unterstützen. Die KI-gestützte Bildanalyse ist nur für comDNA-basierte Verfahren relevant und kann traditionelle Methoden

ebenfalls sinnvoll ergänzen, indem sie Proben nach Körpergröße oder Taxa vorsortieren, Biomasse quantifizieren und Individuen zählen. Aufgrund bereits bestehender Entwicklungen im Insektenmonitoring und der hohen Relevanz für molekularbiologische Verfahren wird dieser Ansatz als hoch priorisiert und kann in einem mittleren Zeitraum (3–5 Jahre) erste richtungsweisende Ergebnisse liefern.

5.4 Kompetenz im Umgang mit KI-Daten stärken

Die Stärkung der Kompetenz im Umgang mit KI wurde ebenfalls als Zielbild formuliert. Dabei ist insbesondere die Fähigkeit entscheidend, die Aussagekraft, Stärken und Grenzen KI-gestützter Analysen auf Basis komplexer Datensätze sachgerecht zu bewerten und die Ergebnisse fachlich fundiert zu interpretieren. Dafür sind Workshops, Weiterbildungen und gegebenenfalls die Einrichtung einer Stelle für einen KI-Spezialisten als Meilenstein identifiziert. Der kompetente Umgang mit KI erfordert grundlegendes Verständnis über Datenqualität, sowie Grenzen und Unsicherheiten von Modellen. Dieses Zielbild wird aufgrund des frühen Entwicklungsstands des Bodenbiodiversitätsmonitorings und der begrenzten Erfahrung mit KI-basierten ökologischen Analysen als niedrig priorisiert, sollte jedoch langfristig (> 5 Jahre) in das behördliche Biodiversitätsmonitoring integriert werden

Tab. 4: Entwicklungsschritte alternative Auswerteverfahren von Bodenbiodiversitätsdaten.

Ansatz	Lücke	Meilenstein	Zielbild	Priorität	Zeithorizont
Taxonomie- freie Indizes (ASVs/K-mer)	allgemeine Vergleichbarkeit unklar	Analyse umfangreicher Metabarcoding-Datensätze aus gut charakterisierten Standorten, um Muster zu identifizieren und taxonomiefreie Indizes belastbar zu validieren.	Entwicklung robuster, taxonomiefreier Diversitätsindikatoren, die als universelle Marker Trends und den Gesundheitszustand des Bodens verlässlich abbilden	mittel	langfristig (> 5 Jahre)
	Bedeutung eines reinen Biodiversitätsindex für Monitoring ohne funktionelle Aussage oder Indikatoren nicht klar, vorallem bei Mikroarthropoden und Enchyträen	Analyse von Metatranskriptom-Datensätze aus gut charakterisierten Standorten, um taxonomiefreie Funktionen zu identifizieren und zu validieren.		mittel	langfristig (> 5 Jahre)
Funktionelle Gruppen /Traits	Unvollständige funktionelle Zuordnung von Artnamen und Transkriptomen	Zusammenstellung gruppenspezifischer Art-Trait-Tabellen (Zersetzer, Räuber, bakterivor, herbivor) und Verknüpfung mit genetischen Profilen und Analyse von gut charakterisierten Standorten.	Entwicklung funktioneller Komposition-Indizes für ökologische Prozesse (zum Beispiel Zersetzung). Erhalt eines systemischen Verständnisses eines Standortes (hoher Erkenntnisgewinn über Ökosystemfunktionen)	hoch	Erstellung der Tabellen mit Literaturdaten: kurzfristig (1–2 Jahre) Auswertung: langfristig (> 5 Jahre)
KI-gestützte Musterer- kennung	Bildauswertung: KI gestützte Auswertung der Fauna (zum Beispiel DiversityScan, KIT, CollembolAI, SMNG)	Sortierung der Taxa, Biomassebestimmung, Diversitätsbestimmung in Kombination mit Metabarcoding/Metagenomik (nur für comDNA relevant)	Semiautomatisierte Auswertung von Lebensgemeinschaften, informative Unterstützung der molekularen Methode	hoch	mittelfristig (3–5 Jahre)
	Kompetenz zur rechtlichen und inhaltlichen Einordnung von KI-	Workshops, Weiterbildung, Stelle für KI-Spezialisten und/oder Beschäftigung mit KI um	Erfassung der Möglichkeiten und Aussagekraft von KI Vertrauen/Beurteilungsfähigkeit für KI-	niedrig	langfristig (> 5 Jahre)

Daten und -Ergebnissen. Für Auswerteverfahren sind ausreichende und qualitätsgesicherte Daten erforderlich.

Expertise zu erlangen

Ergebnisse schaffen. Bereitstellung, Qualitätsprüfung und Verknüpfung von verschiedenen Datentypen (molekular, taxonomisch, geophysisch) für KI-Training

Tabelle 4 Für alternative Auswerteverfahren wurden drei wesentliche Bereiche mit Entwicklungsbedarf identifiziert: Taxonomiefreie Indizes, Funktionellen Gruppen oder Traits, um funktionelle Informationen zu gewinnen und die Nutzung von Künstlicher Intelligenz (KI) zur Mustererkennung. Die definierten Zielbilder beschreiben die Voraussetzungen, um die Methode für ein standardisiertes behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring anwendbar zu machen. Jedes Zielbild ist mit einer Priorität (hoch, mittel, niedrig) versehen, die die Dringlichkeit des jeweiligen Handlungsbedarfs bewertet. Die Zeithorizonte für die Umsetzung der Meilensteine sind in kurzfristig, mittelfristig und langfristig unterteilt und als Richtwerte zu verstehen. Sie können durch technische oder methodische Anpassungen oder Ressourcenverfügbarkeiten (zum Beispiel Personal, finanzielle Mittel) beeinflusst werden. Die tatsächliche Umsetzung hängt zudem vom jeweils angestrebten Zielbild ab.

6 Entwicklungsdauer und Kostenschätzung für Fördermaßnahmen zur Anwendbarkeit von molekularbiologischen Methoden und innovativen Auswertungsansätzen im Bodenbiodiversitätsmonitoring

Die im Folgenden dargestellten Angaben zur Entwicklungsdauer und zur Kostenschätzung der vorgeschlagenen Förderstrategien stellen bewusst grobe Orientierungswerte dar. Eine präzise Kostenermittlung ist derzeit nicht möglich, da Sequenzierungskosten weder pro Sequenz noch pro Organismus kalkuliert werden, sondern auf der Anzahl der erzeugten Basen (beziehungsweise Megabasen) beruhen. Zudem haben sich die Kosten in den vergangenen zwei Jahrzehnten nicht linear, sondern stark technologieabhängig entwickelt und unterliegen weiterhin erheblichen Schwankungen (Abbildung 6). Der aktuelle Stand der Technik verändert sich sehr dynamisch, insbesondere im Bereich der Long-Read-Sequenzierung. Diese raschen technologischen Fortschritte erschweren belastbare Prognosen sowohl zu zukünftigen Sequenzierkosten als auch zu realistischen Entwicklungszeiträumen. Die nachfolgend dargestellten Werte basieren daher auf dem derzeit verfügbaren Kenntnisstand und Erfahrungswerten aus vergleichbaren Projekten sowie auf fachlicher Einschätzung und dienen primär einer Einordnung.

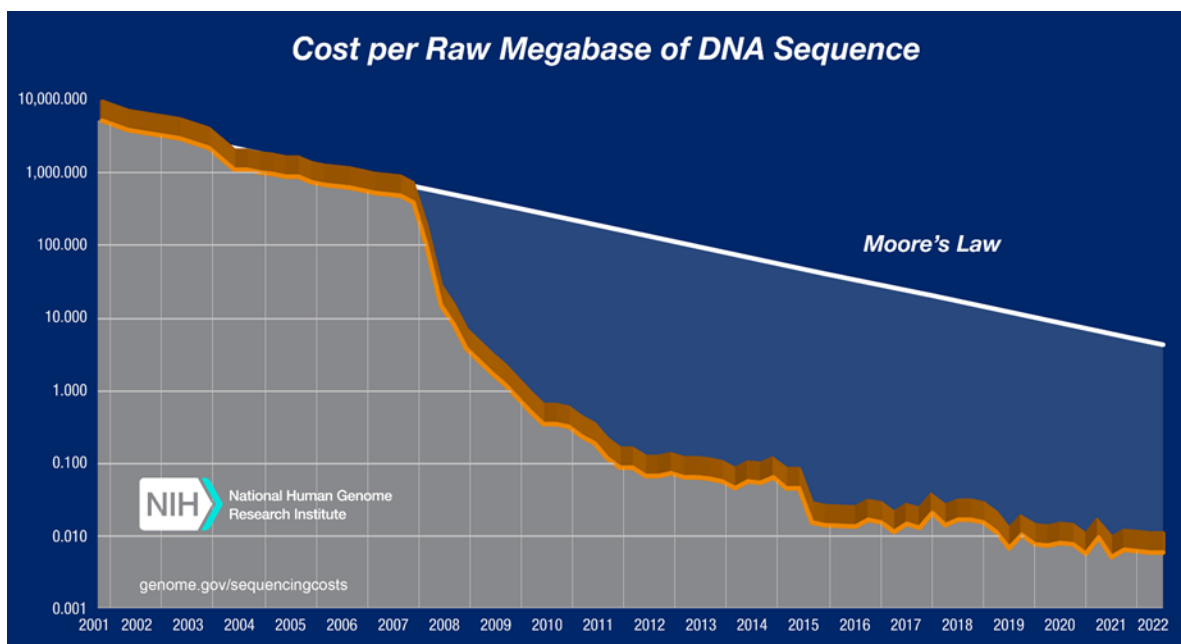


Abb. 6 Entwicklung der Sequenzierungskosten pro Megabasenpaar von 2001 bis 2022. Zu beachten ist die logarithmische Skalierung der Preise (in US-Dollar) auf der Y-Achse sowie der deutliche Einbruch der Sequenzierungskosten ab 2008, als der Übergang von der traditionellen Sanger-Sequenzierung (Dideoxy-Kettenabbruchsequenzierung) zu den „Next-Generation“- bzw. „Second-Generation“-DNA-Sequenzierungstechnologien begann. Die Kostenentwicklung unterliegt bis 2022 weiterhin Schwankungen. Quelle: www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data.

Personalkosten können nicht pauschal angegeben werden, da sie wesentlich von der konkreten Ausgestaltung des Projekts, dem ausführenden Akteur (zum Beispiel Universität, angewandte Forschungs- und Entwicklungsdienstleister, Bundesforschungsinstitute) sowie vom Qualifikationsniveau des eingesetzten Personals (zum Beispiel Technische Assistenz, Master- oder PhD-Niveau) abhängen. Sie sind daher nicht in den genannten Kostenschätzungen enthalten. Es

wird jedoch jeweils angegeben, in welchem ungefähren Verhältnis sich eine Fördermaßnahme aus Material- und Personalkosten zusammensetzt. Sofern eine Förderstrategie überwiegend personalkostengetrieben ist, etwa bei bioinformatischen Auswertungen oder Recherchearbeiten, wird dies ausdrücklich hervorgehoben.

Die Angaben zur Entwicklungsdauer basieren auf Erfahrungswerten und stellen unverbindliche, aber fachlich vertretbare Schätzungen dar. Wie die Kosten, so hängen auch die Entwicklungszeiten stark von der vorhandenen Expertise, Erfahrung und Infrastruktur der durchführenden Institution ab. Das angegebene Budget bezieht sich ausschließlich auf Materialkosten; Personalkosten sind nicht enthalten. Prozentangaben zu Personal und Material (zum Beispiel „Kosten: Personal 50 %, Material 50 %“) dienen nicht der konkreten Budgetplanung, sondern zeigen den relativen Ressourcenaufwand: ob eine Maßnahme überwiegend personal- oder materialintensiv ist. Bei Ringtests ist der personelle Aufwand für Logistik, Organisation und Datenanalyse hoch, der Materialbedarf jedoch ebenfalls relevant. Materialkosten fallen als absolute Größen jedoch typischerweise geringer aus als Personalkosten, was Einfluss auf das Gesamtbudget hat.

Für bioinformatische Leistungen wird der Aufbau der Infrastruktur ebenfalls nicht eingerechnet, die Budgetschätzung geht von vorhandenen Ressourcen (High-Performance Cluster, Serverleistung) für die Entwicklung der Anwendung und Auswertung aus. Die angegebenen Kosten und Entwicklungszeiten basieren auf Erfahrungswerten und Angaben aus vergleichbaren Projekten (zum Beispiel WIPANO 03TN0054D, MetaInvert 03TN0054A).

Für den Aufbau eines zukunftsfähigen behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitorings mit molekularbiologischen Verfahren werden eine Reihe von Entwicklungs-, Standardisierungs- und Bewertungsmaßnahmen vorgeschlagen, die organisatorisch in kurz-, mittel- und langfristige Arbeitspakete gegliedert und mit unterschiedlichen Budgetrahmen hinterlegt sind. Die Kosten liegen je nach Projekt unter 250.000 € (niedrig) und 250.000–800.000 € (mittel). Die Zeithorizonte variieren, kurzfristige Aufgaben benötigen etwa 1–2 Jahre, mittelfristige 2–5 Jahre, langfristige über 5 Jahre. Das angegebene Budget und Entwicklungszeit sind unverbindliche Einschätzungen und sind stark abhängig von der Gestaltung des Projektes, der Projektdauer, der vorhandenen Infrastruktur, Erfahrung und Personal des Auftragnehmers.

6.1 Organismenübergreifende Fördermaßnahmen molekularbiologischer Methoden

Im Folgenden werden drei Schritte zur Optimierung des behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitorings vorgestellt. Zunächst erfolgt ein Vergleich von Short- und Long-Read-Sequenzierungstechnologien hinsichtlich Datenqualität, taxonomischer Auflösung, Replizierbarkeit und Kosten. Darauf aufbauend werden Maßnahmen zur Standardisierung von Metabarcoding- und Metagenomikverfahren diskutiert, einschließlich strategischer Entscheidungen zur langfristigen Nutzung für verschiedene Organismengruppen. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung des Einflusses von Relikt-DNA auf molekularbiologische Biodiversitätsprofile und auf Ansätzen, ihre Wirkung zu begrenzen oder quantitativ abzuschätzen.

6.1.1 Vergleich und Validierung von Sequenzierungstechnologien

Ein erster Schwerpunkt liegt auf dem Vergleich verschiedener Sequenzieretechnologien, insbesondere von Short- und Long-Read-Verfahren. Dabei sollten die taxonomische Auflösung, die

Datenqualität sowie die Replizierbarkeit der Ergebnisse (Robustheit) und ein Kostenvergleich zwischen den Long-Read-Plattformen wie PacBio und ONT untereinander, und mit Short-Read-Technologien wie Illumina bewertet werden. Dies ist mittelfristig (2–3 Jahre) umsetzbar und liegt im niedrigen Kostenbereich (< 250.000 €). Der Vergleich beinhaltet umfangreiche Laborarbeiten und Sequenzierungen, da zahlreiche Replikate benötigt werden. Eine Auswahl an Primern, die lange Fragmente für verschiedene Organismengruppen amplifizieren, sollte in den Vergleich einbezogen werden. Ziel ist es, für alle Organismengruppen eine belastbare Einschätzung der taxonomischen Auflösung und Datenqualität der verschiedenen Technologien basierend auf eDNA Metabarcoding zu erhalten. Die Ergebnisse lassen sich auf comDNA übertragen.

6.1.2 Empfohlene Fördermaßnahmen zur Standardisierung

Aufbauend auf den Ergebnissen von 6.1.1 ist die Standardisierung von Metabarcoding- und Metagenomikverfahren für eDNA mittels Ringtests wichtig. Grundlage hierfür sind strategische Überlegungen zur zukünftigen Ausrichtung des behördlichen Biodiversitätsmonitorings, insbesondere dazu, für welche Organismengruppen langfristig Metabarcoding oder Metagenomik eingesetzt werden soll. Während Metabarcoding für bestimmte Gruppen (zum Beispiel Pilze, Enchyträen) sehr effektiv sein kann, liefert die Metagenomik je nach Zielsetzung für andere Gruppen, wie Bakterien, Protisten oder Mikroarthropoden, umfassendere Informationen. Im Rahmen dieser strategischen Überlegungen ist zudem zu berücksichtigen, dass Bakterien, Archaeen, Pilze und Protisten ausschließlich über eDNA erfasst werden können, während für die Fauna sowohl eDNA- als auch comDNA-basierte Standards etabliert werden können. Für die Standardisierung von eDNA- oder comDNA-Protokollen, sowohl für Metabarcoding als auch für Metagenomik, sollte zuvor eine strategische Abwägung erfolgen, welche Organismengruppen im behördlichen Biodiversitätsmonitoring künftig über eDNA, beziehungsweise comDNA erfasst werden sollen.

Die Standardisierung umfasst labortechnische Schritte, wie DNA-Extraktionsprotokolle, PCR-Protokolle und eine Auswahl an taxonomisch informativen Primerpaaren für Metabarcoding, sowie Sequenzierstrategien (Sequenzierungstiefe), die mit einer einheitlichen bioinformatischen Auswertungs-Pipeline entweder für Metabarcoding oder für Metagenomik ausgewertet werden können. Die Primerwahl für Metabarcoding kann auf den Ergebnissen von 6.1.1 basieren. Da die Anzahl der zu standardisierenden Primer Material- und Personalkosten erhöhen, wurde in Tabelle 5 die Kostenschätzung für bis zu fünf Primerpaaren angegeben. Arbeiten betreffen alle Organismengruppen. Die Standardisierung der Laborarbeiten ist kurz- bis mittelfristig (1–5 Jahre) angelegt und kann pro Organismengruppe mit < 250.000 € umgesetzt werden. Da die Durchführung und Koordination von Ringtests personalintensiv ist, stellt sie einen wesentlichen Kostenfaktor dar. Eine gemeinsame Durchführung von Ringtests für mehrere Organismengruppen erhöht zwar den Material- und Logistikaufwand, kann jedoch die Kosten pro Organismengruppe insgesamt reduzieren und damit die Ressourceneffizienz steigern.

Desweiteren ist die bioinformatische Standardisierung notwendig, also die Entwicklung bioinformatischer Pipelines, die für Organismengruppen und Markergene optimiert wurden, um langfristig eine einheitliche und vergleichbare Datenanalyse zu gewährleisten. Die Arbeiten dafür erfordern einen mittelfristigen Zeitrahmen (2–3 Jahre) und liegen im mittleren Budgetrahmen (250.000–800.000 €). Materialkosten sind hierfür sehr gering, wenn die notwendige Hard- und Softwareinfrastruktur, sowie ausreichende Datensätze gegeben sind, zum Beispiel aus den

Ringtests zur Standardisierung der labortechnischen Schritte. In diesem Fall setzt sich das angegebene Budget im Wesentlichen aus Personalkosten zusammen. Eine Optimierung des Budgets und der Entwicklungszeit durch Kombination mehrerer Organismengruppen ist möglich.

6.1.3 Relikt-DNA

Ein weiterer Schwerpunkt ist die Untersuchung des Beitrags von Relikt-DNA zu molekularbiologischen Bodenbiodiversitätserfassungen. Das Problem der Relikt-DNA im Boden bleibt eine große Herausforderung. Einige Ansätze, wie die Kombination von Mock-Gemeinschaften mit Zeitreihen oder die Anwendung von PMA-Behandlungen (Propidium-Monoazid, ein Farbstoff der in Zellen mit geschädigter oder lysierter Membran eindringt und die Amplifizierung hemmt; Wagner et al. 2008), sowie die Entfernung von extrazellulärer DNA aus Boden (Nagler et al. 2022) können eine grobe Abschätzung der Relikt-DNA ermöglichen, aber das Problem der Relikt-DNA ist bei Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen besonders kritisch, da sie eng mit Bodenpartikeln verbunden sind, aber häufig in ruhenden Stadien wie Sporen auf (dormant cells) auftreten, wodurch eine Trennung lebender und toter Zellen vor der DNA-Extraktion praktisch unmöglich ist. Bei Bodenorganismen, wie Nematoden oder Mikroarthropoden, kann das Problem der Relikt-DNA umgangen werden, indem lebende Individuen physisch separiert werden (community DNA metabarcoding). Die Methode ist beispielsweise nicht für die Gewinnung parasitischer Nematoden geeignet, und sehr kleine, trockenheitssensible Mikroarthropoden können während des Separationsprozesses absterben, sodass sie der Erfassung entgehen.

Um zu verstehen, in welchem Ausmaß DNA von toten Organismen Biodiversitätsergebnisse verfälschen kann, können gezielt Mock-Gemeinschaften sowie Zeitreihen eingesetzt werden, um sowohl den Anteil als auch die taxonomische Identität der Relikt-DNA in natürlichen Gemeinschaften zu quantifizieren. Diese Arbeiten können mittelfristig (2–3 Jahre) umgesetzt werden und liegen im mittleren Kostenbereich (250.000–800.000 €), da sowohl Laborarbeit als auch bioinformatische Entwicklung nötig ist.

6.2 Organismenspezifische Fördermaßnahmen zur Anwendbarkeit molekularbiologischer Methoden

Im Folgenden werden drei Maßnahmen zur Verbesserung molekularbiologischer Methoden zur Erfassung von Bodenorganismen vorgestellt. Zunächst geht es um die Optimierung der Quantifizierung von Mikroorganismen wie Bakterien und Archaeen durch interne Standards, um die Aussagekraft von Metabarcoding- und Metagenomikdaten zu erhöhen. Anschließend werden Methoden zur Harmonisierung und Anwendbarkeit des Metabarcodings für Pilze, Protisten und weitere Gruppen behandelt. Abschließend werden gezielte Schritte zum Aufbau und zur Erweiterung von Referenzdatenbanken für unterschiedliche Bodenorganismengruppen vorgeschlagen.

6.2.1 Fördermaßnahmen zur Quantifizierung von Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen)

Zur Verbesserung der quantitativen Aussagekraft molekularbiologischer Daten (Metabarcoding oder Metagenomik) von Mikroorganismen (Bakterien und Archaeen) sollten interne Standards (Spike-ins, qPCR oder ddPCR-Kalibrierungen) entwickelt werden. Desweiteren ist die Erfassung des

Off-Target Anteils bei dieser Organismengruppe wichtig, um die Primer-Spezifität zu erkennen, die effektive Sequenziertiefe für Zielorganismen zu sichern und Verzerrungen in Diversitätsmustern zu vermeiden. Dies betrifft insbesondere Bakterien und Archaeen. Die Arbeiten sind mittelfristig (2–3 Jahre) umsetzbar und fallen in den mittleren Budgetbereich (250.000–800.000 €). Kosten entstehen hauptsächlich durch Laborarbeit und bioinformatische Auswertungen.

6.2.2 Fördermaßnahmen zur Anwendbarkeit des Metabarcodings

Für Pilze ist eine Harmonisierung der verwendeten Primer notwendig. Die Leistungen umfassen eine Datenbankrecherche, die die Einträge von ITS1 und ITS2 in Referenzdatenbanken erfasst und abgleicht, sowie eine in-silico-Auswertung der beiden Marker nach taxonomischer Vollständigkeit und Auflösung, gefolgt von einem Abgleich der Datenbanken mit der UNITE-Referenzdatenbank. Die Arbeiten sind kurzfristig (1–2 Jahre) und im niedrigen Kostenbereich (< 250.000 €) erreichbar.

Für Protisten umfasst diese Maßnahme sowohl das Design geeigneter Primer als auch die Erstellung weiterer Referenzsequenzen für eDNA-Metabarcoding, um die taxonomische Erfassung dieser Organismengruppe zu verbessern. Hierbei kann der Einsatz von Long-Read-Sequenzierungstechnologien sinnvoll sein, um vollständige oder nahezu vollständige Markergene zu erhalten und damit die Qualität der Referenzdaten zu erhöhen. Der hierfür erforderliche Ressourcenbedarf ist überwiegend personalgetrieben. Ein großer Teil des Aufwands entfällt auf Laborarbeiten, die methodische Entwicklung sowie die bioinformatische Analyse und Auswertung durch TA-, PhD- oder Postdoc-Personal. Diese Tätigkeiten machen insgesamt etwa 70 % des Gesamtaufwands aus. Die verbleibenden rund 30 % betreffen Material- und Sequenzierungskosten, die im Vergleich zwar geringer ausfallen, aber dennoch einen relevanten Anteil an der Gesamtmaßnahme darstellen. Diese Arbeiten benötigen einen mittel- bis langfristigen Zeithorizont von mindestens 3 Jahren und liegen im mittleren (250.000–800.000 €) Budgetrahmen.

6.2.3 Fördermaßnahmen zur Anwendbarkeit von Metabarcoding / Metagenomik

Besonders wichtig ist der Abgleich von Referenzdatenbanken von Bodenfauna für Metabarcoding und Metagenomik, die für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring relevant sind. Dafür werden zunächst Datenbankrecherchen durchgeführt, um eine taxonomische Übersicht der vorhandenen Referenzsequenzen zu erstellen, einschließlich Replikaten und Angaben zum Verbreitungsgebiet. Darauf aufbauend erfolgt eine analytische Bewertung der Daten, bei der insbesondere taxonomische Lücken sowie die Auflösung und Robustheit der Markergene geprüft werden. Auf Grundlage dieser Analysen werden Empfehlungen für geeignete Markergene, wie 18S, 28S, 16S oder COI für zukünftige Metabarcoding-Studien ausgesprochen. Als Ergebnis der Maßnahme werden fehlende, aber bodenrelevante Taxa identifiziert und eine kuratierte, lokale, versionierte Datenbank für die jeweilige Organismengruppe erstellt (siehe Kapitel 3.1.1).

Diese Arbeiten sind zentral für Metabarcoding und Metagenomik, da sie die Eignung einzelner Marker für die notwendige taxonomische Auflösung im behördlichen Monitoring klären. Falls mehrere Markergene notwendig sind, wird eine strategische Abwägung empfohlen, ob ein multigenes Metabarcoding oder der Einsatz metagenomischer Ansätze methodisch und organisatorisch geeigneter ist.

Die identifizierten taxonomischen Lücken in den Referenzdatenbanken (bezogen auf den geographischen Einsatzbereich) helfen zudem, die Kosten für die Erstellung neuer Referenzsequenzen beziehungsweise Referenzgenome abzuschätzen. Diese Arbeiten richten sich an unterschiedliche Organismengruppen. Für Nematoden, sowie Enchyträen und Regenwürmer, ist ein mittelfristiger Zeithorizont (2–3 Jahre) bei niedrigem Budget (< 250.000 €) vorgesehen. Für Mikroarthropoden (Springschwänze, Horn- und Raubmilben) erstreckt sich die Maßnahme mittelfristig (2–4 Jahre) mit einem niedrigen Budget (< 250.000 €). Da die Arbeiten primär aus Datenbankrecherchen und Datenanalysen bestehen, werden die dafür erforderlichen Kosten im Wesentlichen durch Personalkosten abgedeckt.

Eine weitere Maßnahme im Bereich Metabarcoding und Metagenomik/Metatranskriptomik betrifft den gezielten Aufbau und die Erweiterung von Referenzdatenbanken für bodenrelevante Organismengruppen, um eine verlässliche Grundlage für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring zu schaffen. Auf Grundlage der oben genannten Datenbankrecherchen werden relevante, morphologisch validierte Taxa gezielt gesammelt und sequenziert. Dabei kann DNA-Barcoding oder, abhängig von Genomgröße und Komplexität, auch Genomsequenzierung (whole genome sequencing) zum Einsatz kommen. Das Ergebnis sind zusätzliche Referenzsequenzen oder -genome für die jeweiligen Organismengruppen. Die angegebenen Budgetkosten beziehen sich nur auf Material- und Sequenzierungskosten, der personelle Ressourcenaufwand ist allerdings verhältnismäßig hoch und hängt von der gewählten Methode ab. Beim DNA-Barcoding entfallen rund 70 % des Aufwands auf Personal, wobei 60 % auf taxonomische Arbeiten und 40 % auf molekularbiologische, analytische und logistische Tätigkeiten entfallen, die Materialkosten machen etwa 30 % aus. Bei der Metagenomik liegt der Personalanteil bei etwa 60 %, wobei die taxonomische Arbeit etwas weniger zeitintensiv ist, da vorerst in der Regel ein Referenzgenom pro Art ausreicht. Im Gegensatz dazu müssen beim DNA-Barcoding mehrere Individuen gesammelt, identifiziert und sequenziert werden, um die intraspezifische Varianz zu erfassen. Für Referenzgenome ist dies aufgrund des höheren Aufwands bei der Erstellung und der Vielzahl der generierten Markergene weniger relevant. Die Materialkosten bei der Metagenomik machen etwa 40 % des Gesamtaufwandes aus.

Die Maßnahme richtet sich an verschiedene Organismengruppen. Für Nematoden ist, abhängig von Genomgröße und Komplexität der Arten, teilweise nur DNA-Barcoding und keine Genomsequenzierung sinnvoll. Für den Aufbau der Referenzdatenbank wird ein mittelfristiger Zeitrahmen (3–5 Jahre) mit mittlerem Budget (250.000–800.000 €) veranschlagt. Für Mikroarthropoden (Springschwänze, Horn- und Raubmilben) kann die Genomsequenzierung eine sinnvolle Strategie darstellen, da die Genome mit 300–500 Mb vergleichsweise klein und somit relativ kostengünstig sind, und DNA-Barcodes für Metabarcoding aus Referenzgenomen herausgefiltert werden können. Im Gegensatz dazu gelingt die Amplifikation von DNA-Barcodes selbst mit etablierten DNA-Barcode-Primer oft nur eingeschränkt, wodurch Wiederholungen und methodische Anpassungen notwendig werden, die die Kosten unvorhersehbar erhöhen. Für die Erstellung von Referenzen für Mikroarthropoden ist ein mittelfristiger Zeitraum (3–4 Jahre), ebenfalls bei mittlerem Budgetrahmen (250.000–800.000 €), vorgesehen. Da die Referenzdatenbanken für Enchyträen bereits von vielen Arten umfassende Barcodes enthalten, ist für diese Organismengruppe ein mittelfristiger Zeitraum (2–3 Jahre) und ein niedriges Budget von (< 250.000 €) veranschlagt. Für Regenwürmer wird aufgrund ihrer vergleichsweise großen Genome empfohlen, DNA-Barcoding von ausgewählten Markergenen einzusetzen. Aufgrund der

relativ geringen Diversität kann dies mittelfristig (2–3 Jahre) und bei niedrigen Kosten von (< 250.000 €) umgesetzt werden.

6.3 Metagenomik

Für die Metagenomik wird eine Annotation und Qualitätsbewertung der vorhandenen Referenzgenome empfohlen, weil sie die Anwendung von Metagenomik im behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitoring erheblich stärken kann. Durch eine Qualitätsbewertung und die Festlegung von Mindeststandards für vorhandene Referenzgenome kann die Biodiversitätserfassung, also die taxonomische Klassifizierung der Reads, deutlich zuverlässiger erfolgen als beim Metabarcoding, da Metagenomik eine wesentlich größere Menge genetischer Information liefert und somit mehr Markergene gleichzeitig ausgewertet werden können. Ein weiterer wesentlicher Gewinn besteht darin, dass gut annotierte Referenzgenome es ermöglichen, neben der taxonomischen Identifikation auch funktionelle Gene zu erfassen, was prinzipiell Aussagen zum funktionellen Potenzial der untersuchten Lebensgemeinschaft ermöglicht, aber bislang wenig untersucht oder angewendet wurde (Muelbaier et al. 2023). Diese Maßnahme kann für bodenlebende Invertebraten kurzfristig (1–2 Jahre) umgesetzt werden, für Bakterien, Pilze und Protisten ist hingegen ein längerer Zeitrahmen erforderlich (> 3 Jahre). Das Budget umfasst im Wesentlichen Personalkosten, da frei verfügbare Daten genutzt werden. Insgesamt ist für jede Organismengruppe ein niedriges Budget (< 250.000 €) vorgesehen. Die gemeinsame Bearbeitung mehrerer Organismengruppen kann die Gesamtkosten insgesamt verringern.

6.4 Metatranskriptomik

Im Folgenden bezieht sich der Begriff Metatranskriptomik ausschließlich auf den PCR-freien Ansatz, bei dem das vollständige transkribierte RNA-Spektrum einer Umweltprobe sequenziert wird und somit alle Organismengruppen erfasst werden. RNA-Metabarcoding, das analog zum DNA-Metabarcoding auf der Amplifikation einzelner Marker basiert, wird in diesem Kontext nicht berücksichtigt. Da RNA direkt aus der ursprünglichen Umweltmatrix extrahiert und sofort stabilisiert wird, liefert sie damit ein Momentbild des in der Umwelt aktiven Transkriptoms und erlaubt Rückschlüsse darauf, welche Organismen und Stoffwechselwege zum Zeitpunkt der Probenahme tatsächlich aktiv sind.

RNA-basierte Methoden befinden sich derzeit überwiegend im Forschungsstadium. Im Vergleich zu etablierten DNA-basierten Verfahren sind sie methodisch weniger standardisiert, technisch anspruchsvoller und bislang nicht in behördliche Monitoringprogramme integriert. Für eine zukünftige Anwendung im Bodenbiodiversitätsmonitoring besteht daher ein erheblicher Bedarf an grundlegender methodischer Entwicklung, Validierung und entsprechend langfristiger Förderung.

Trotz ihres experimentellen Charakters weist Metatranskriptomik mehrere wesentliche Vorteile auf. Da vollständige Transkriptome analysiert werden, stehen deutlich umfangreichere genetische Informationen zur Verfügung als bei Metabarcoding und funktional aussagekräftigere Signale als bei Metagenomik. Dies erlaubt nicht nur eine gute taxonomische Klassifizierung, sondern auch eine direkte Erfassung der funktionellen Aktivität der Lebensgemeinschaft zum Zeitpunkt der Probenahme. Da RNA sehr schnell degradiert und damit kurzfristige ökologische Dynamiken widerspiegelt, korrelieren metatranskriptomische Muster oftmals stärker mit aktuellen Umweltbedingungen als DNA-basierte Signaturen. Besonders wertvoll ist dies für

Zeitreihenanalysen, da Veränderungen in der aktiven Gemeinschaft zeitnah erfasst werden können. Vor diesem Hintergrund erscheint perspektivisch insbesondere die Kombination von eRNA- und eDNA-basierten Ansätzen vielversprechend. Durch die Ergänzung des metatranskriptomischen Signals aktiver Organismen mit dem metagenomischen oder metabarcoding-basierten Nachweis der gesamten Lebensgemeinschaft lässt sich der Anteil der aktuell aktiven Taxa innerhalb der gesamten Vielfalt bestimmen. Dies kann entscheidende Erkenntnisse zu Biodiversitätsmustern und Ökosystemfunktionen liefern und hat daher grundsätzlich das Potenzial, eine für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring relevante Methodenkombination darzustellen.

6.4.1 Standardisierung

Für die Etablierung metatranskriptomischer Verfahren im behördlichen Biodiversitätsmonitoring ist eine umfassende methodische Standardisierung erforderlich. Dazu gehören die Validierung der Protokolle zur Probenahme, RNA-Extraktion, zum Enrichment, der Library-Erstellung und zur Wahl geeigneter Sequenzierungsstrategien. Diese Validierung sollte für verschiedene Bodentypen erfolgen und auf standardisierten Mock-Gemeinschaften basieren, um eine reproduzierbare Qualitätskontrolle zu gewährleisten. Ergänzend ist eine Sättigungskurven-Analyse notwendig, um die optimale Anzahl an Reads pro Probe und Methode zu bestimmen und damit sowohl die analytische Sensitivität als auch die Kosteneffizienz der Verfahren zu optimieren. Auf dieser Grundlage kann ein robuster und standardisierbarer Workflow entwickelt werden, der als technische Basis für die Anwendung von Metatranskriptomik im behördlichen Kontext dient.

Ein zentraler Schritt zur Qualitätssicherung ist anschließend die Durchführung eines Ringtests, der eine unabhängige Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Verfahren unter realistischen Bedingungen der Routineanalytik ermöglicht. Der Aufwand verteilt sich dabei zu etwa 60 % auf Personal und zu 40 % auf Material. Die Personalkosten umfassen Labor- und Logistkarbeiten sowie die bioinformatische und statistische Auswertung zu gleichen Teilen. Ringtests können grundsätzlich für alle relevanten Organismengruppen durchgeführt werden, für Bakterien und Pilze wurden entsprechende Ansätze bereits erprobt und in wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht. Für jede Organismengruppe ist ein mittelfristiger Zeitraum (3–5 Jahre) erforderlich und liegt im mittleren Budgetbereich (250.000–800.000 €).

6.4.2 Referenzdaten

Eine weitere Maßnahme umfasst die Erstellung von de novo Metatranskriptomen mit zeitlicher Auflösung für ausgewählte Referenzstandorte, das festgelegte Mindestqualitätsstandards erfüllt. Dafür werden lokale Referenztranskriptomite mit hoher Sequenzierungstiefe von gut beschriebenen Referenzstandorten erzeugt. Dies ermöglicht eine umfassende bioinformatische Auswertung, bei der möglichst vollständig transkribierte Gene für die funktionelle Annotation eines Standortes erfasst und daraus funktionelle sowie optional taxonomische Informationen über die lokale Lebensgemeinschaft abgeleitet werden. Die Maßnahme ist für alle relevanten Organismengruppen vorgesehen und erfordert aufgrund des experimentellen Charakters und der hohen Sequenzierungsintensität einen mittelfristigen Zeitraum (3–5 Jahre). Der Ressourcenbedarf verteilt sich zu etwa gleichen Teilen auf Personal (50 %) sowie Material- und Sequenzierungskosten (50%). Insgesamt ein mittleres Budget von 250.000–800.000 € veranschlagt.

6.4.3 Thematische Definition

Der Nutzen von Metatranskriptomik ist stark kontextabhängig und wird maßgeblich durch die spezifische Fragestellung bestimmt. Für den behördlichen Einsatz im Bodenbiodiversitätsmonitoring ist daher eine thematische Definition erforderlich, die den Einsatz der Methode für die Organismengruppen konkretisiert. Auf Basis von Literatur- und Datenbankrecherchen sowie einer Evaluation existierender, qualitativ hochwertiger Daten von gut beschriebenen Standorten können geeignete Ansatzpunkte identifiziert werden. Es ist zu bemerken, dass entsprechende Daten derzeit noch nicht vorliegen. Basierend auf dieser Recherche kann eine Kategorisierung der Metatranskriptom-Marker in Bezug auf die Fragestellung, beispielsweise in Bezug auf C-, N- und P-Kreisläufe oder auf Belastungen durch Schadstoffe entwickelt, und aktive Stoffwechselwege, funktionelle Gruppen und ökologische Reaktionen oder Resilienz der Organismengemeinschaften erfasst werden.

Die Maßnahme ist für alle relevanten Organismengruppen vorgesehen, kann mittelfristig (3–5 Jahre) mit einem niedrigen Budget (< 250.000 €) umgesetzt werden. Die Kosten entfallen dabei überwiegend auf Personal, insbesondere wenn die notwendige bioinformatische Infrastruktur bereits vorhanden ist. Gegebenenfalls können Daten aus Abschnitt 6.4.2 für die Analyse einbezogen werden.

6.4.4 Bewertung von Ökosystemfunktionen

Ein Alleinstellungsmerkmal der Metatranskriptomik ist die Möglichkeit, nicht nur die taxonomische Zusammensetzung, sondern auch die funktionellen Aktivitäten der Organismengemeinschaften zu erfassen. Dadurch können potentiell Ökosystemfunktionen im behördlichen Biodiversitätsmonitoring bewertet werden. Dafür sind vorerst Analysen hochauflösender, langfristiger Zeitreihen, im Labor und im Freiland notwendig, um Veränderungen der aktiven Organismen in Abhängigkeit von Umweltfaktoren nachzuvollziehen. Die Maßnahme richtet sich an alle Organismengruppen, ist mittelfristig (3–5 Jahre) mit einem mittleren Budget (250.000–800.000 €) umsetzbar, wobei die Kosten gleichmäßig auf Personal sowie Material und Sequenzierung verteilt sind.

6.5 Auswerteverfahren

Alternative Auswerteverfahren könnten das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring sinnvoll ergänzen, wenn sie methodische Limitationen bestehender Ansätze kompensieren und die Aussagekraft der Ergebnisse erhöhen. Gleichzeitig besteht bei diesen Verfahren noch erheblicher Entwicklungsbedarf, da die praktische Umsetzbarkeit und die Aussagekraft der unterschiedlichen Ansätze für die potentiellen Einsichten bisher unklar sind. Grundsätzlich ermöglichen alternative Auswerteverfahren unterschiedliche Perspektiven. Taxonomiefreie Indizes können grundsätzlich als molekularbiologische Biodiversitätsindizes dienen, was möglicherweise Hinweise auf ökologische Zustände und Entwicklungen ermöglicht, oder sie könnten als Indikatoren, beziehungsweise Prädiktoren dienen. Funktionelle Gruppen und Traits erlauben Rückschlüsse auf Ökosystemleistungen, und KI-gestützte Verfahren unterstützen sowohl die automatisierte taxonomische Bestimmung und können ergänzend zu Metabarcoding oder Metagenomik eingesetzt werden. Die Auswertung komplexer, multidimensionaler Datensätze erfordert allerdings fachliche Expertise, um KI-generierte Analysen fundiert bewerten zu können. Die Entwicklung und

Validierung dieser Verfahren sind daher notwendig, um ihre Einsatzfähigkeit im behördlichen Monitoring zuverlässig beurteilen und nutzen zu können.

6.5.1 Taxonomiefreie Indizes

Die Evaluation taxonomiefreier Ansätze basiert auf Datensätzen aus Metabarcoding, Metagenomik oder Metatranskriptomik und bezieht sich somit auf eDNA, comDNA, oder eRNA. Die Analysen sollten sich auf molekulare Datensätze auf gut charakterisierten Standorten stützen, gegebenenfalls sollten ergänzend neue Datensätze erhoben werden, um vollständig vergleichbare Auswertungen zu gewährleisten. Durch vergleichende Analysen von ASV- oder k-mer basierte Daten mit morphologiebasierten Datensätzen kann der Mehrwert von taxonomiefreien Ansätzen für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring im Prinzip bewertet werden. Die Maßnahme richtet sich an alle relevanten Organismengruppen und kann kurzfristig (2–3 Jahren) mit einem niedrigen Budget (< 250.000 €) pro Organismengruppe umgesetzt werden. Der Leistungsaufwand ist allerdings von der Methode, der Diversität der Organismengruppe und der Verfügbarkeit vorhandener Daten abhängig. Eine kombinierte Analyse mehrerer Organismengruppen in einem Projekt kann die Kosten effizienter gestalten, eine gleichzeitige Bearbeitung aller Gruppen ist jedoch nicht empfehlenswert, da die Komplexität der Daten sonst die Interpretation erschwert.

6.5.2 Funktionelle Gruppen/Traits

Im Rahmen der Evaluation funktioneller Kompositionsindizes wird untersucht, wie sich aus Artenlisten ökologische Prozesse ableiten lassen, etwa die Zersetzung organischer Substanz. Funktionelle Komposition-Indizes fassen somit die Eigenschaften von Organismen zu Kennzahlen zusammen, die Aussagen über Ökosystemfunktionen ermöglichen. Dafür müssen organismengruppenspezifische Art-Funktion- oder Art-Trait- Tabellen erstellt werden, in denen die ökologischen Rollen und Lebensstrategien einzelner Arten festgehalten werden, beispielsweise ob sie Zersetzer, Räuber, Parasiten, bakterienfressend (bakterivor) oder pflanzenfressend (herbivor) sind, sowie ihre bevorzugten Lebensräume (zum Beispiel epigäisch, endogäisch) oder ökologische Strategien (zum Beispiel r-Strategie, acidophil). Dieser Ansatz ist für alle relevanten Organismengruppen anwendbar und kann ergänzend zu traditionell morphologischen oder molekularbiologisch erfassten Lebensgemeinschaften genutzt werden. Die Aussagekraft solcher funktionellen Indizes ist allerdings noch unbekannt. Daher müssen diese Art-Funktion- oder Art-Trait- Tabellen mit Artenlisten von gut charakterisierten Standorten verknüpft und analysiert werden, um Zusammenhänge zwischen der Zusammensetzung der Arten, ihren funktionellen Eigenschaften und ökologischen Prozessen zu bewerten. Diese Maßnahme kann kurzfristig (2–3 Jahre) für ausgewählte Organismengruppen von besonderem Interesse für das behördliche Monitoring mit einem niedrigen Budget (< 250.000 €) durchgeführt werden. Eine Bearbeitung aller Organismengruppen in einem Projekt erhöht den Zeithorizont und damit die Kosten.

6.5.3 KI-gestützte taxonomische Bestimmung

Der Einsatz von Künstlicher Intelligenz (KI) mittels Bilderkennung kann taxonomische Auswertungen von comDNA-Proben gezielt unterstützen. Automatisierte Erfassung von Familien, Gattungen und gegebenenfalls Arten sowie die Bestimmung ihrer Abundanz und Biomasse mittels bildbasierter Verfahren kann die Arbeit von Taxonom*innen sinnvoll unterstützen, aber nicht ersetzen. In Kombination mit Metabarcoding können die ermittelten Abundanz- und

Biomassenwerte eine sinnvolle quantitative Ergänzung darstellen. Die KI-basierte Bildererkennung kommt bereits bei der Auswertung von Malaise-Traps zum Einsatz (zum Beispiel Wühl et al. 2022) und kann auf mittlere bis große Mesofauna (zum Beispiel Springschwänze, Raub- und Hornmilben) und kleine Makrofauna (Insekten, Spinnen) erweitert werden. Dafür ist zunächst die Sammlung von Daten erforderlich, um die KI zu trainieren. Die Trainingsdaten können sowohl aus Freilandproben als auch aus einer möglichst großen Anzahl digitaler Bilder der Zielorganismen stammen. Die KI-generierten Daten müssen anschließend mit comDNA verknüpft und ausgewertet werden, um den Mehrwert der kombinierten Methoden zu evaluieren. Die Maßnahme ist mittelfristig angelegt (3–5 Jahre) und erfordert ein vergleichsweise niedriges Budget (< 250.000 €). Der größte Teil des Aufwands entfällt auf Personal für das KI-Training, die Verknüpfung der KI-Daten mit molekularbiologischen Daten (zum Beispiel Metabarcoding) sowie die anschließende Datenanalyse.

6.5.4 KI-Auswertung und Expertise

Die Auswertung komplexer Daten im behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitoring kann durch KI- und Machine-Learning-Modelle unterstützt werden. Gleichzeitig sind diese Modelle bioinformatisch hochkomplex. Für sachlich korrekte Nutzung der Ergebnisse ist Fachwissen in diesem Bereich unbedingt erforderlich. Um die Möglichkeiten, Grenzen und potenziellen Ungenauigkeiten von KI-basierten Auswertungen im behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitoring einschätzen zu können, ist der Erwerb entsprechender Expertise notwendig. Dies kann durch gezielte Weiterbildung, Workshops oder die Einrichtung einer Personalstelle für eine*n KI-Spezialist*in erfolgen. Die Maßnahme ist langfristig und kontinuierlich angelegt. Das Budget wird als niedrig eingeschätzt (< 250.000 €) und sollte dauerhaft zur Verfügung stehen.

Tab. 5: Entwicklungsdauer und Kostenschätzung identifizierter Zielbilder.

Organismengruppe	Lücke	Meilenstein	Zielbild	Priorität
6.1.1 - eDNA/comDNA Vergleich der taxonomischen Auflösung, Datenqualität und Robustheit von short- und long-read Sequenzierungstechnologien (Illumina, PacBio, ONT)	Alle	mittelfristig 2–3 Jahre	niedrig < 250.000 €	Laborarbeit, Sequenzierung und bioinformatische Auswertung Material- und Sequenzierungskosten sind relativ hoch (40 %), da viele Replikate notwendig sind. Hoher Anteil an Personalkosten (60 %) aufgrund intensiver Laborarbeit und Datenauswertung.
6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung PCR-Laborprotokolle und Sequenzierung (bis zu 5 Primerpaaren (siehe zum Beispiel MetaInvert 03TN0054A)), Auswertung mit einer bioinformatischen Standardpipeline	Bakterien, Archaeen, Pilze (eDNA)	kurzfristig 1–2 Jahre	niedrig < 250.000 €	Ringtests (Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle) Personalkosten aufgrund der Logistik und aufwendiger Auswertung hoch. Kosten: Personal 50 %, Material 50 % Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 % Synergien möglich, indem mehrere Organismengruppen gleichzeitig standardisiert werden, erhöht allerdings Material- und Personalkosten.
6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung PCR-Laborprotokolle und Sequenzierung (bis zu 5 Primerpaaren (siehe zum Beispiel MetaInvert 03TN0054A)), Auswertung mit einer bioinformatischen Standardpipeline	Protisten (eDNA)	kurzfristig 1–2 Jahre	niedrig < 250.000 €	Ringtests (Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle) Personalkosten aufgrund der Logistik und aufwendiger Auswertung hoch. Kosten: Personal 50 %, Material 50 % Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 % Synergien möglich, indem mehrere Organismengruppen gleichzeitig standardisiert werden, erhöht allerdings Material- und Personalkosten

6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung PCR-Laborprotokolle und Sequenzierung (bis zu 5 Primerpaaren (siehe zum Beispiel MetaInvert 03TN0054A)), Auswertung mit einer bioinformatischen Standardpipeline	Nematoden (eDNA oder comDNA)	mittelfristig 3–5 Jahre	niedrig < 250.000 €	Ringtests (Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle) Personalkosten aufgrund der Logistik und aufwendiger Auswertung hoch. Kosten: Personal 50 %, Material 50 % Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 % Synergien möglich, indem mehrere Organismengruppen gleichzeitig standardisiert werden, erhöht allerdings Material- und Personalkosten
6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung PCR-Laborprotokolle und Sequenzierung (bis zu 5 Primerpaaren (siehe zum Beispiel MetaInvert 03TN0054A)), Auswertung mit einer bioinformatischen Standardpipeline	Mikroarthropoden (eDNA oder comDNA)	mittelfristig 3–5 Jahre	niedrig < 250.000 €	Ringtests (Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle) Personalkosten aufgrund der Logistik und aufwendiger Auswertung hoch. Kosten: Personal 50 %, Material 50 % Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 % Synergien möglich, indem mehrere Organismengruppen gleichzeitig standardisiert werden, erhöht allerdings Material- und Personalkosten
6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung PCR-Laborprotokolle und Sequenzierung (bis zu 5 Primerpaaren (siehe zum Beispiel MetaInvert 03TN0054A)), Auswertung mit einer bioinformatischen Standardpipeline	Enchyträen, Regenwürmer (eDNA oder comDNA)	kurzfristig 1–2 Jahre	niedrig < 250.000 €	Ringtests (Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle) Personalkosten aufgrund der Logistik und aufwendiger Auswertung hoch. Kosten: Personal 50 %, Material 50 % Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 % Synergien möglich, indem mehrere Organismengruppen gleichzeitig standardisiert werden, erhöht allerdings Material- und Personalkosten
6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung bioinformatische Pipeline, Optimierung für Organismengruppen und Markergen(en)	Bakterien, Archaeen, Pilze (eDNA)	mittelfristig 2–3 Jahre	mittel 250.00–800.000 €	bioinformatische Entwicklung im Wesentlichen nur Personalkosten (PhD und/oder Postdoc), wenn Infrastruktur (Serverleistung, HPC-Cluster) vorhanden ist. Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das erhöht die Projektzeit und damit die Personalkosten.

6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung bioinformatische Pipeline, Optimierung für Organismengruppen und Markergen(en)	Protisten (eDNA)	mittelfristig 2–3 Jahre	mittel 250.00–800.000 €	bioinformatische Entwicklung im Wesentlichen nur Personalkosten (PhD und/oder Postdoc), wenn Infrastruktur (Serverleistung, HPC-Cluster) vorhanden ist. Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das erhöht die Projektzeit und damit die Personalkosten.
6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung bioinformatische Pipeline, Optimierung für Organismengruppen und Markergen(en)	Nematoden (eDNA oder comDNA)	mittelfristig 2–3 Jahre	mittel 250.00–800.000 €	bioinformatische Entwicklung im Wesentlichen nur Personalkosten (PhD und/oder Postdoc), wenn Infrastruktur (Serverleistung, HPC-Cluster) vorhanden ist. Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das erhöht die Projektzeit und damit die Personalkosten.
6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung bioinformatische Pipeline, Optimierung für Organismengruppen und Markergen(en)	Mikroarthropoden (eDNA oder comDNA)	mittelfristig, 2–3 Jahre	mittel 250.00–800.000 €	bioinformatische Entwicklung im Wesentlichen nur Personalkosten (PhD und/oder Postdoc), wenn Infrastruktur (Serverleistung, HPC-Cluster) vorhanden ist. Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das erhöht die Projektzeit und damit die Personalkosten.
6.1.2 - eDNA/comDNA Metabarcoding/Metagenomik Standardisierung bioinformatische Pipeline, Optimierung für Organismengruppen und Markergen(en)	Enchyträen, Regenwürmer (eDNA oder comDNA)	mittelfristig 2–3 Jahre	mittel 250.00–800.000 €	bioinformatische Entwicklung im Wesentlichen nur Personalkosten (PhD und/oder Postdoc), wenn Infrastruktur (Serverleistung, HPC-Cluster) vorhanden ist. Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das erhöht die Projektzeit und damit die Personalkosten.

<p>6.1.3 - eDNA</p> <p>Metabarcoding/Metagenomik</p> <p>Beitrag von Relikt-DNA zur Bodenbiodiversität</p> <p>Mock- und Zeitreihen zur Bewertung und des Anteils und der Identität der Relikt-DNA in natürlichen Gemeinschaften, also zu bestimmen, welche Organismengruppe in welchem Ausmaß als Relikt-DNA vertreten ist.</p>	<p>Bakterien, Archaeen, Pilze</p>	<p>mittelfristig</p> <p>2–3 Jahre</p>	<p>mittel</p> <p>250.00–800.000 €</p>	<p>Ringtests</p> <p>(Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle)</p> <p>inklusive Auswahl von Protokollen, die auf Vergleichbarkeit getestet werden</p> <p>Kosten: Personal 60%, Material 40 %</p> <p>Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 %</p> <p>bioinformatische Entwicklung</p> <p>PhD und/oder Postdoc bei vorhandener Infrastruktur. Für Metagenomik höhere Personalkosten (60 %).</p> <p>Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das beeinflusst allerdings die Projektzeit und damit die Personalkosten.</p>
<p>6.1.3 - eDNA</p> <p>Metabarcoding/Metagenomik</p> <p>Beitrag von Relikt-DNA zur Bodenbiodiversität</p> <p>Mock- und Zeitreihen zur Bewertung und des Anteils und der Identität der Relikt-DNA in natürlichen Gemeinschaften, also zu bestimmen, welche Organismengruppe in welchem Ausmaß als Relikt-DNA vertreten ist.</p>	<p>Protisten</p>	<p>mittelfristig</p> <p>2–3 Jahre</p>	<p>mittel</p> <p>250.00–800.000 €</p>	<p>Ringtests</p> <p>(Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle)</p> <p>inklusive Auswahl von Protokollen, die auf Vergleichbarkeit getestet werden</p> <p>Kosten: Personal 60%, Material 40 %</p> <p>Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 %</p> <p>bioinformatische Entwicklung</p> <p>PhD und/oder Postdoc bei vorhandener Infrastruktur. Für Metagenomik höhere Personalkosten (60 %).</p> <p>Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das beeinflusst allerdings die Projektzeit und damit die Personalkosten.</p>

<p>6.1.3 - eDNA</p> <p>Metabarcoding/Metagenomik</p> <p>Beitrag von Relikt-DNA zur Bodenbiodiversität</p> <p>Mock- und Zeitreihen zur Bewertung und des Anteils und der Identität der Relikt-DNA in natürlichen Gemeinschaften, also zu bestimmen, welche Organismengruppe in welchem Ausmaß als Relikt-DNA vertreten ist.</p>	<p>Nematoden</p>	<p>mittelfristig</p> <p>2–3 Jahre</p>	<p>mittel</p> <p>250.00–800.000 €</p>	<p>Ringtests</p> <p>(Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle)</p> <p>inklusive Auswahl von Protokollen, die auf Vergleichbarkeit getestet werden</p> <p>Kosten: Personal 60%, Material 40 %</p> <p>Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 %</p> <p>bioinformatische Entwicklung</p> <p>PhD und/oder Postdoc bei vorhandener Infrastruktur. Für Metagenomik höhere Personalkosten (60 %).</p> <p>Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das beeinflusst allerdings die Projektzeit und damit die Personalkosten.</p>
<p>6.1.3 - eDNA</p> <p>Metabarcoding/Metagenomik</p> <p>Beitrag von Relikt-DNA zur Bodenbiodiversität</p> <p>Mock- und Zeitreihen zur Bewertung und des Anteils und der Identität der Relikt-DNA in natürlichen Gemeinschaften, also zu bestimmen, welche Organismengruppe in welchem Ausmaß als Relikt-DNA vertreten ist.</p>	<p>Mikroarthropoden</p>	<p>mittelfristig</p> <p>2–3 Jahre</p>	<p>mittel</p> <p>250.00–800.000 €</p>	<p>Ringtests</p> <p>(Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle)</p> <p>inklusive Auswahl von Protokollen, die auf Vergleichbarkeit getestet werden</p> <p>Kosten: Personal 60 %, Material 40 %</p> <p>Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 %</p> <p>bioinformatische Entwicklung</p> <p>PhD und/oder Postdoc bei vorhandener Infrastruktur. Für Metagenomik höhere Personalkosten (60 %).</p> <p>Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das beeinflusst allerdings die Projektzeit und damit die Personalkosten.</p>

6.1.3 - eDNA Metabarcoding/Metagenomik Beitrag von Relikt-DNA zur Bodenbiodiversität Mock- und Zeitreihen zur Bewertung und des Anteils und der Identität der Relikt- DNA in natürlichen Gemeinschaften, also zu bestimmen, welche Organismengruppe in welchem Ausmaß als Relikt-DNA vertreten ist.	Enchyträen, Regenwürmer	mittelfristig 2–3 Jahre	mittel 250.00–800.000 €	<p>Ringtests</p> <p>(Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle) inklusive Auswahl von Protokollen, die auf Vergleichbarkeit getestet werden Kosten: Personal 60 %, Material 40 % Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 60 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 40 %</p> <p>bioinformatische Entwicklung</p> <p>PhD und/oder Postdoc bei vorhandener Infrastruktur. Für Metagenomik höhere Personalkosten (60 %).</p> <p>Synergien möglich, indem mehrere (oder alle) Organismengruppen in einem Projekt standardisiert werden. Das beeinflusst allerdings die Projektzeit und damit die Personalkosten.</p>
7.2.1 - eDNA Standards für Quantifizierung und Off- Target Erfassung	Bakterien, Archaeen	mittelfristig 2–3 Jahre	mittel 250.00–800.000 €	<p>Laborarbeit</p> <p>für <i>spike-in</i> / qPCR / ddPCR Tests. Kostenanteil: TA / PhD (40 %), Material inklusive Sequenzierung (35 %)</p> <p>bioinformatische Auswertung zur Off-Target Quantifizierung (PhD / Postdoc, 25 %)</p>
6.2.2 - Metabarcoding Harmonisierung der Primerwahl	Pilze (eDNA)	kurzfristig 1–2 Jahre	niedrig < 250.000 €	<p>Datenbankrecherche</p> <p><i>in-silico</i> Auswertung von vorhandenen Daten in Referenzdatenbanken (ITS1 und ITS2), Abgleich mit UNITE-Referenzdatenbank</p>
6.2.2 - Metabarcoding Harmonisierung der Primerwahl	Protisten (eDNA)	mittel- bis langfristig mindestens 3 Jahre	mittel 250.000–800.000 €	<p>Entwicklung alternativer 18S-Primer</p> <p>(möglicherweise basierend auf long-reads)</p> <p>Primerdesign und Erstellung weiterer Referenzsequenzen. Kosten: Personal 70 %, Material und Sequenzierung 30 %. Personalkosten (TA/PhD/PostDoc): Labor 70 %, Entwicklung und Analyse 30 %</p>

6.2.3 - Metabarcoding / Metagenomik Abgleich der Referenzdatenbanken	Nematoden	mittelfristig 2–3 Jahre	niedrig < 250.000 €	<p>Datenbankrecherche</p> <p>Erstellung einer taxonomischen Übersicht (inklusive Replikate und Verbreitungsgebiet) der vorhandenen Referenzsequenzen für bodenrelevante Taxa.</p> <p>Analysen - taxonomische Auflösung und Robustheit</p> <p>Empfehlung welches Gen (zum Beispiel 18S, 28S, 16S, COI) für Metabarcoding genutzt wird.</p> <p>Ergebnis</p> <p>Identifizierung welche bodenrelevanten Taxa fehlen. Kuratierte, lokale Datenbank für die entsprechende Organismengruppe.</p>
6.2.3 - Metabarcoding / Metagenomik Abgleich der Referenzdatenbanken	Mikroarthropoden (Springschwänze, Horn- und Raubmilben)	mittelfristig 2–4 Jahre	niedrig < 250.000 €	<p>Datenbankrecherche</p> <p>Erstellung einer taxonomischen Übersicht (inklusive Replikate und Verbreitungsgebiet) der vorhandenen Referenzsequenzen für bodenrelevante Taxa.</p> <p>Analysen - taxonomische Auflösung und Robustheit</p> <p>Empfehlung welches Gen (zum Beispiel 18S, 28S, 16S, COI) für Metabarcoding genutzt wird.</p> <p>Ergebnis</p> <p>Identifizierung welche bodenrelevanten Taxa fehlen. Kuratierte, lokale Datenbank für die entsprechende Organismengruppe.</p>
6.2.3 - Metabarcoding / Metagenomik Abgleich der Referenzdatenbanken	Enchyträen, Regenwürmer	mittelfristig 2–3 Jahre	niedrig < 250.000 €	<p>Datenbankrecherche</p> <p>Erstellung einer taxonomischen Übersicht (inklusive Replikate und Verbreitungsgebiet) der vorhandenen Referenzsequenzen für bodenrelevante Taxa.</p> <p>Analysen - taxonomische Auflösung und Robustheit</p> <p>Empfehlung welches Gen (zum Beispiel 18S, 28S, 16S, COI) für Metabarcoding genutzt wird.</p> <p>Ergebnis</p> <p>Identifizierung welche bodenrelevanten Taxa fehlen. Kuratierte, lokale Datenbank für die entsprechende Organismengruppe.</p>

6.2.3 - Metabarcoding / Metagenomik
 Verbesserung der Referenzdatenbanken

Nematoden
 (abhängig von Genomgröße und Komplexität nur DNA-Barcoding)

mittel- bis langfristig
 3–5 Jahre

mittel
 250.000–800.000 €

Sammlung von Taxa und Sequenzierung

(basierend auf Datenbankrecherche, siehe oben)

Auffüllen der Referenzdatenbanken mit Referenzsequenzen (Metabarcoding) oder Referenzgenomen (Metagenomik) von relevanten, morphologisch validierten Taxa.

Kosten für DNA-Barcoding:

Personal 70 %, Material 30 %

Personal: Taxonom 60 %, molekulare, analytische und logistische Arbeit 40 %

Kosten für Genomsequenzierung:

Personal 60 %, Material 40 %

Personal: Taxonom 50 %, molekulare, analytische und logistische Arbeit 50 %

6.2.3 - Metabarcoding / Metagenomik
 Verbesserung der Referenzdatenbanken

Mikroarthropoden
 (Springschwänze, Horn- und Raubmilben)

mittelfristig
 3–5 Jahre

mittel
 250.000–800.000 €

Sammlung von Taxa und Sequenzierung

(basierend auf Datenbankrecherche, siehe oben)

Auffüllen der Referenzdatenbanken mit Referenzsequenzen (Metabarcoding) oder Referenzgenomen (Metagenomik) von relevanten, morphologisch validierten Taxa.

Kosten für DNA-Barcoding:

Personal 70 %, Material 30 %

Personal: Taxonom 60 %, molekulare, analytische und logistische Arbeit 40 %

Kosten für Genomsequenzierung:

Personal 60 %, Material 40 %

Personal: Taxonom 50 %, molekulare, analytische und logistische Arbeit 50 %

6.2.3 - Metabarcoding / Metagenomik
 Verbesserung der Referenzdatenbanken

Enchyträen

mittelfristig

niedrig

2–3 Jahre

< 250.000 €

Sammlung von Taxa und Sequenzierung

(basierend auf Datenbankrecherche, siehe oben)

Auffüllen der Referenzdatenbanken mit Referenzsequenzen (Metabarcoding) oder Referenzgenomen (Metagenomik) von relevanten, morphologisch validierten Taxa.

Kosten für DNA-Barcoding:

Personal 70 %, Material 30 %

Personal: Taxonom 60 %, molekulare, analytische und logistische Arbeit 40 %

Kosten für Genomsequenzierung:

Personal 60 %, Material 40 %

Personal: Taxonom 50 %, molekulare, analytische und logistische Arbeit 50 %

6.2.3 - Metabarcoding / Metagenomik
 Verbesserung der Referenzdatenbanken

Regenwürmer
 (Metabarcoding)

mittelfristig

niedrig

2–3 Jahre

< 250.000 €

Sammlung von Taxa und Sequenzierung

(basierend auf Datenbankrecherche, siehe oben)

Auffüllen der Referenzdatenbanken mit Referenzsequenzen (Metabarcoding) oder Referenzgenomen (Metagenomik) von relevanten, morphologisch validierten Taxa.

Kosten für DNA-Barcoding:

Personal 70 %, Material 30 %

Personal: Taxonom 60 %, molekulare, analytische und logistische Arbeit 40 %

Kosten für Genomsequenzierung:

Personal 60 %, Material 40 %

Personal: Taxonom 50 %, molekulare, analytische und logistische Arbeit 50 %

6.3 - Metagenomik
 Verbesserung der Referenzdatenbanken

Alle

kurzfristig

niedrig

1–2 Jahre, oder
 3–5 Jahre pro
 Organismengru
 ppe

< 250.000 €
 pro Organismengruppe

Annotation und Qualitätsbewertung vorhandener Referenzgenome

6.4.1 - Metatranskriptomik, eRNA	Alle	mittelfristig	mittel	Entwicklung von Labor- und Sequenzierungsprotokollen
Validierung (Standardisierung) der Protokolle zur RNA-Extraktion, Enrichment, Library-Erstellung und Sequenzierungsstrategie für verschiedene Bodentypen mit standardisierten Mock Gemeinschaften zur Qualitätskontrolle		3–5 Jahre	250.000–800.000 € pro Organismengruppe	Sättigungskurven-Analyse zur Bestimmung optimaler Read-Zahlen pro Probe und Methode Entwicklung von robustem Workflow als Basis für Standardisierung Ringtest (Standard-Ringtest: mindestens 11 Labore, normale Qualitätskontrolle) Kosten: Personal 60 %, Material 40 % Personal: Labor, Logistik (TA/PhD/Postdoc) 50 %, Auswertung (PhD/Postdoc) 50 %
6.4.2 - Metatranskriptomik, eRNA	Alle	mittelfristig	mittel	Sequenzierung mit hoher Sequenzierungstiefe zur Erstellung lokaler Referenztranskriptomte für ausgewählte Fläche
Erstellung eines <i>de novo</i> Metatranskriptoms mit definierter Mindestqualität für Referenzstandorte mit zeitlicher Auflösung		3–5 Jahre	250.000–800.000 €	bioinformatische Auswertung mit funktioneller Annotation Kosten: Personal 50 %, Material und Sequenzierung 50 %
6.4.3 - Metatranskriptomik, eRNA	Alle	mittelfristig	niedrig	Literatur- und Datenbankrecherche,
Thematische Definition für den Einsatz von Metatranskriptomik für die verschiedenen Organismengruppen im Rahmen des behördlichen Monitorings		3–5 Jahre	< 250.000 € (hier hauptsächlich Personalkosten, wenn bioinformatische Infrastruktur vorhanden ist)	Evaluation basierend auf existierenden, hochqualitativen Daten von gut beschriebenen Standorten (entsprechende Daten sind bisher noch nicht vorhanden) Kategorisierung der Metatranskriptom- Marker mit Bezug zur Fragestellung (zum Beispiel CNP-Kreislauf, Belastungen mit Schadstoffen) Erfassung aktiver Stoffwechselwege, funktioneller Gruppen und ökologische Reaktionen von Organismengemeinschaften.
6.4.4 - Metatranskriptomik, eRNA	Alle	mittelfristig	mittel	Datenerhebung und Auswertung
Bewertung von Ökosystemfunktionen im Monitoring		3–5 Jahre	250.000–800.000 €	hochauflösende, langfristige Zeitreihe (Labor oder Freiland) in Abhängigkeit von Umweltfaktoren Kosten: Personal 50 %, Material 50 %

<p>6.5.1 - Taxonomiefreie Indizes</p> <p>Basierend auf Metabarcoding-, Metagenomik-, Metatranskriptomik-Datensätzen</p> <p>Basierend eDNA, comDNA, eRNA</p> <p>Evaluation taxonomiefreier Ansätze (ASVs, k-mer, Metatranskriptomdaten) und resultierender Diversitätsindizes für behördliches Biodiversitätsmonitoring</p>	Alle	<p>kurzfristig</p> <p>2–3 Jahre, pro Organismengruppe. Zusammenfassungen von einigen Organismengruppen ist möglich. Alle Organismengruppen gemeinsam zu erfassen, benötigt mehr Zeit und Budget.</p>	<p>niedrig</p> <p>< 250.000 €</p> <p>pro Organismengruppe, abhängig von Methode, Diversität und vorhandenen Datensätzen und Informationen</p>	<p>Analyse umfangreicher Datensätze aus gut charakterisierten Standorten.</p> <p>Gegebenenfalls Erhebung von solchen Datensätzen, um ein gemeinsames Referenzsystem für die verschiedenen Methoden zu haben.</p>
<p>6.5.2 - Funktionelle Gruppen/Traits</p> <p>Evaluation funktioneller Komposition-Indizes für ökologische Prozesse (zum Beispiel Zersetzung).</p> <p>anwendbar für alle taxonomiebasierten Biodiversitätsdaten (morphologisch oder molekular erhoben)</p>	Alle	kurzfristig	<p>niedrig</p> <p>< 250.000 €</p> <p>(hier hauptsächlich Personalkosten)</p>	<p>Erstellung gruppenspezifischer Art-Funktion/Trait-Tabellen</p> <p>Zum Beispiel Zersetzer, Räuber, parasitär, bakterivor, herbivor, epigäisch, endogäisch, r-Strategie, acidophil</p> <p>Verknüpfung der Artnamen/Tabelle mit molekularen Profilen von gut charakterisierten Standorten und Analyse</p>
<p>6.5.3 - KI-gestützte taxonomische Bestimmung mittels Bilderkennung</p> <p>Semiautomatisierte Auswertung von Lebensgemeinschaften, informative Unterstützung der qualitativen und quantitativen Biodiversitätserfassung</p> <p>anwendbar für klassische Biodiversitätserfassung, erweiterte Informationen für molekulare Biodiversitätsdaten</p>	<p>Mikroarthropoden</p> <p>(Mesofauna und Makrofauna unter ~5 cm im Allgemeinen)</p> <p>(in Kombination mit comDNA)</p>	<p>mittelfristig</p> <p>3–5 Jahre</p>	<p>niedrig</p> <p>< 250.000 €</p>	<p>Daten sammeln und Training der KI</p> <p>Sequenzierung der comDNA</p> <p>Auswertung der molekularen Daten und Verknüpfung dieser mit KI</p> <p>gegebenenfalls Proben nehmen/Daten sammeln</p>

6.5.4 – KI-Auswertung	-	langfristig, kontinuierlich	niedrig < 250.000 €	Workshops, Weiterbildung um KI-Expertise zu erwerben, möglicherweise Stelle für KI-Spezialisten
Expertise für Möglichkeiten, Grenzen und Ungenauigkeiten von KI-Daten erlangen im Bereich für behördliches Monitoring erwerben. Weiterbildung.				

Tabelle 5 Die aufgeführten Zielbilder wurden aus den vorherigen Tabellen übernommen und für die Entwicklungsdauer und Kostenschätzung neu kategorisiert. Sie umfassen die thematischen Gebiete eDNA und comDNA sowie verschiedene methodische Ansätze (Metabarcoding, Metagenomik, Metatranskriptomik und alternative Auswerteverfahren gemäß Tabelle 4). Die Ziffern in den Zielbildern verweisen auf die entsprechenden Unterkapitel, in denen sie beschrieben werden. Die Zielbilder gelten entweder für alle Organismengruppen gleichermaßen oder werden nach Organismengruppe getrennt dargestellt, sofern sich Zeithorizont oder Budget unterscheiden können oder eine getrennte Analyse sinnvoll ist. Der Zeithorizont wird den Kategorien kurzfristig, mittelfristig und langfristig zugeordnet. Das Budget ist in die Stufen niedrig (< 250.000 €) und mittel (250–800.000 €) unterteilt. Die Budgetangaben beziehen sich ausschließlich auf geschätzte Materialkosten. Personalaufwand sowie infrastrukturelle Kosten für bioinformatische Leistungen (zum Beispiel Aufbau neuer Rechenkapazitäten) sind nicht berücksichtigt und es wird von vorhandenen Ressourcen wie High-Performance-Clustern ausgegangen. Alle Angaben zu Zeithorizonten und Budgets sind Schätzwerte auf Basis von Erfahrungen aus vergleichbaren Projekten und daher unverbindlich, da sie von verfügbaren personellen und finanziellen Ressourcen sowie möglichen methodischen Herausforderungen abhängen. Unter Leistung wird zusätzlich unverbindlich angegeben, in welchem Verhältnis die erwarteten Projektkosten durch Material- oder Personalkosten bestimmt sind.

7 Abschließende Bewertung und Empfehlung

Das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring erfüllt die Aufgabe, den strategischen Rahmen mehrerer aufeinander abgestimmter Programme auf Länder-, Bundes- und EU-Ebene zu bedienen. Diese Programme basieren auf der Erkenntnis, dass intakte, artenreiche und funktional stabile Ökosysteme zentrale Voraussetzungen für Klimaschutz, Klimaanpassung und eine nachhaltige Nutzung natürlicher Ressourcen darstellen. Böden spielen dabei eine Schlüsselrolle: Sie speichern Kohlenstoff, tragen biologische Vielfalt, regulieren den Wasserhaushalt und wirken als ökologische Puffer gegenüber Klimaextremen.

Die Nationale Biodiversitätsstrategie (NBS) definiert strategische Maßnahmen wie die Entwicklung standardisierter Monitoringprotokolle, die Erfassung relevanter Organismengruppen und die kontinuierliche Auswertung von Biodiversitätsindikatoren, um Veränderungen im Zustand der Böden langfristig zu dokumentieren. Das Soil Monitoring Law (SML) bildet als verbindlicher europäischer Rahmen die rechtliche Grundlage für ein harmonisiertes, langfristiges und vergleichbares Bodenmonitoring in allen Mitgliedstaaten. Innerhalb dieses Rahmens fokussiert das Aktionsprogramm Natürlicher Klimaschutz (ANK) darauf, Veränderungen in Struktur, Funktion und Zustand der Böden zuverlässig abzubilden und die natürlichen Klimaschutzleistungen der Böden zu bewerten und zu stärken. Ergänzend legt die Deutsche Anpassungsstrategie an den Klimawandel (DAS) den Schwerpunkt auf die frühzeitige Erkennung negativer Klimafolgen, systematische Risikobewertung sowie die Entwicklung und Umsetzung von Anpassungsmaßnahmen zur Förderung von Vorsorge, Anpassung und Resilienz.

Um das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring effektiv und zukunftssicher zu gestalten, ist es strategisch sinnvoll, molekularbiologische Verfahren wie Metabarcoding, Metagenomik und perspektivisch Metatranskriptomik zu integrieren und gezielt für dessen Anforderungen weiterzuentwickeln. Sie ermöglichen eine umfassendere Erfassung biologischer Vielfalt und funktioneller Prozesse und ergänzen bestehende Programme um schwer zugängliche Organismengruppen. Sie ermöglichen eine standardisierbare, taxonomisch breite und vergleichsweise objektive Erfassung von Organismengruppen, die mit klassischen morphologischen Verfahren nur eingeschränkt oder gar nicht abbildbar sind, insbesondere Bakterien, Archaeen, Pilze und Protisten. Damit ergänzen diese Methoden die bestehenden Monitoringprogramme wirkungsvoll, indem sie biologische Vielfalt, funktionelle Prozesse und frühe Veränderungen in Böden systematisch erfassen. Je nach Organismengruppe befinden sich die Methoden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, gezielte Fördermaßnahmen können jedoch ihre Integration in das behördliche Monitoring ermöglichen und so die Umsetzung der Ziele von SML, NBS, ANK und DAS wirkungsvoll unterstützen.

Die Stärken molekularbiologischer Verfahren liegen insbesondere in der zum Teil automatisierten Erhebung von Biodiversitätsdaten aus Umweltproben sowie in ihrer hohen Skalierbarkeit. Unter Skalierbarkeit ist dabei zu verstehen, dass Bearbeitungszeit und Kosten nicht proportional mit der Anzahl der Proben steigen, sondern viele Proben gleichzeitig effizient verarbeitet werden können. Auf dieser Grundlage kann ein **Routinemonitoring** aufgebaut werden, das im Vergleich zu klassischen Methoden mehr Flächen abdeckt, oder in ausgewählten Flächen in relativ kurzen zeitlichen Abständen (einmal bis mehrmals pro Jahr) durchgeführt werden kann. Das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring lässt sich somit entsprechend der NBS und der DAS sowohl flächen- als auch zeitlich zielgerichtet gestalten. Entsprechend der Ziele des ANK können

molekularbiologische Verfahren Veränderungen in Struktur und Funktionen sowohl auf taxonomischer, als auch genetischer Ebene abbilden. Hervorzuheben ist hier die Kombination von eDNA- und eRNA-basierten Ansätzen, die sowohl die Erfassung der gesamten Biodiversität als auch die Identifikation der aktiven Organismen ermöglichen, wodurch Rückschlüsse auf funktionale Ökosystemleistungen und dynamische Prozesse in Böden gezogen werden können. Vor diesem Hintergrund können molekularbiologische Verfahren einen zentralen Baustein für ein zukunftsfähiges behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring bilden, denn funktionale Bodenökosysteme sind komplex und durch eine hohe biologische Diversität geprägt. Bislang ist nur unzureichend bekannt, welche spezifischen Organismen und Interaktionen entscheidend für die Aufrechterhaltung der ökologischen Funktionen von Böden im Sinne der Ziele von SML, NBS, ANK und DAS sind. Vor diesem Hintergrund ist es notwendig, eine Vielzahl unterschiedlicher Organismengruppen systematisch zu erfassen, um ein fundiertes Verständnis der Bodenfunktionen und ihrer Relevanz für Biodiversität, Klimaschutz und Klimaanpassung zu gewinnen.

Molekularbiologische Verfahren können Maßnahmen im Rahmen von SML, NBS, ANK und DAS unterstützen und somit zentrale Bausteine für ein zukunftsfähiges behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring bilden

- ▶ Automatisierte und standardisierte molekularbiologische Verfahren ermöglichen ein Routinemonitoring in kürzeren Intervallen als das Basismonitoring (alle zwei bis fünf Jahre) und erlauben so, Veränderungen der biologischen und funktionellen Vielfalt frühzeitig zu erfassen.

Routinemonitoring mit molekularbiologischen Verfahren erlaubt zum Beispiel:

- ▶ die Beobachtung von Trends im Rahmen von Naturschutz und Klimaanpassung,
- ▶ die Bewertung der Wirksamkeit von Naturschutz- und Klimaanpassungsmaßnahmen,
- ▶ die Erfassung der Bodenbiodiversität auf taxonomischer, genetischer und funktionaler Ebene,
- ▶ Rückschlüsse auf funktionale Ökosystemleistungen, zum Beispiel durch Kombination von eDNA- und eRNA-Analysen.

Allerdings sind molekularbiologische Verfahren für die verschiedenen Organismengruppen unterschiedlich weit entwickelt. Gleichzeitig schreitet die Sequenzierungstechnologie sehr schnell voran, sodass bestimmte Methoden für einzelne Organismengruppen bereits besser geeignet oder weiter ausgereift sind als für andere. Die nachfolgende finale Bewertung und die daraus abgeleiteten Empfehlungen ordnen die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Methoden, Entwicklungsbedarfe und Maßnahmen strategisch ein. Ziel ist es, aufzuzeigen, wie Metabarcoding, Metagenomik und Metatranskriptomik, unter Berücksichtigung ihres jeweiligen Reifegrads, ihrer Limitationen und ihres Ressourcenbedarfs, schrittweise standardisiert und zielgerichtet in bestehende Monitoringstrukturen integriert werden können, um das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring wirksam zu unterstützen.

Die im Gutachten identifizierten Entwicklungsbedarfe für den Einsatz molekularbiologischer Methoden im behördlichen Biodiversitätsmonitoring lassen sich in sechs übergeordnete

Handlungsfelder gliedern. Diese Struktur ermöglicht eine strategische Priorisierung der Maßnahmen und die schrittweise Implementierung praxistauglicher Verfahren.

7.1 Strategische Entscheidungen zur Sequenzierungstechnologie

Ein vorrangiger Handlungsbedarf für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring liegt in der systematischen Evaluierung der Sequenzierungstechnologien, also dem Vergleich von Short-Read-, Long-Read- und Metagenomik-Ansätzen. Ziel dieser Tests ist es, die taxonomische Auflösung, Datenqualität und Robustheit der Verfahren für die verschiedenen Organismengruppen belastbar zu bewerten, insbesondere für jene, die über eDNA erfasst werden sollen. Die Ergebnisse dieser Vergleichsstudien bilden die notwendige Grundlage für alle nachfolgenden Schritte im Monitoring. Sie ermöglichen die gezielte Festlegung der Sequenzierungsstrategie für die jeweiligen Organismengruppen und sichern, dass die Wahl der Markergene, die Standardisierungen, Methoden Anpassungen und der Aufbau von Referenzdatenbanken effizient und kompatibel umgesetzt werden können. Kurzfristig kann das Monitoring auf etablierten Short-Read-Plattformen wie Illumina standardisiert werden. Long-Read-Technologien (PacBio HiFi, ONT) bieten wahrscheinlich langfristig Vorteile aufgrund der taxonomischen Auflösung basierend auf Full-Length-Barcodes. Eine frühzeitige, evidenzbasierte Entscheidung verhindert spätere Inkompatibilitäten und legt die Grundlage für eine robuste und zukunftsfähige Monitoringinfrastruktur.

Festlegung der Sequenzierungsstrategie für relevante Bodenorganismen

- ▶ short-read versus long-read Technologien
- ▶ Metabarcoding versus Metagenomik
- ▶ Einfluss von Relikt-DNA

Festlegung der Probenahmestrategie für Bodenfauna

- ▶ eDNA oder comDNA
- ▶ Metabarcoding oder Metagenomik

Festlegung der Erfassung von funktionaler Diversität

- ▶ Kombination von eDNA und eRNA
- ▶ eDNA / comDNA und Taxon-Merkmalstabelle

Für die Festlegung der Sequenzierungsstrategie sollte hinzuzufügend der Beitrag von Relikt-DNA in eDNA-Proben mitgedacht werden, wobei Methoden für unterschiedliche Organismengruppen verschieden sensitiv sind. Es ist zu erwarten, dass Long-Read- und Metagenomik-Ansätze tendenziell weniger Relikt-DNA erfassen. Bei Long-Read-Verfahren ist dies darauf zurückzuführen, dass fragmentierte DNA häufig nicht über die erforderlichen Full-Length-Barcodes von mehreren hundert bis tausend Basenpaaren amplifiziert werden kann. Bei Metagenomik-Ansätzen ist der Einfluss vermutlich geringer, da hier ein Amplifizierungsschritt entfällt und fragmentierte Relikt-DNA statistisch weniger relevant zur Sequenzierung beiträgt.

Grundlegende Entscheidungen zur zukünftigen Ausrichtung des behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitorings sollten frühzeitig getroffen werden. Dazu gehört insbesondere, für welche Organismengruppen eDNA eingesetzt werden soll, etwa für Mikroorganismen oder zusätzlich für Protisten und die Bodenfauna. Für die Erfassung der gesamten Breite aller bodenlebenden Organismengruppen kann gegebenenfalls Metagenomik genutzt werden. Alternativ können einzelne Organismengruppen über comDNA erfasst werden, ein Verfahren, das Relikt-DNA vermeidet. Zur Erfassung der funktionalen Vielfalt sind verschiedene Ansätze möglich. Ein molekularbiologischer Ansatz besteht in der Kombination von eDNA und eRNA, die gegebenenfalls auf ausgewählte Referenzflächen beschränkt wird. Alternativ können Artenlisten mit Merkmalstabellen ergänzt werden, um die funktionellen Eigenschaften der Artengemeinschaft abzubilden.

Potentielle Strategien zur Kontrolle von Relikt-DNA und Off-Target Amplifizierung zur Bodenbiodiversität

- ▶ Long-read Metabarcoding oder Metagenomik
- ▶ Spike-in Kontrollen (siehe 7.4)

7.2 Standardisierung von Laborschritten und Bioinformatik

Aufbauend auf den technologischen Vergleichsstudien stellt die Standardisierung von eDNA-, bzw. comDNA-basierten Verfahren (Metabarcoding und Metagenomik) sowie perspektivisch eRNA-basierten Methoden (Metatranskriptomik und RNA-Metabarcoding) ein zentrales Handlungsfeld dar. Für ein langfristig vergleichbares und rechtssicheres behördliches Biodiversitätsmonitoring sind einheitliche Laborprotokolle, validierte Primerstrategien, definierte Sequenzertiefen sowie robuste, versionskontrollierte bioinformatische Pipelines unverzichtbar. Die Standardisierungsmaßnahmen sollten strategisch an den zukünftigen Zielen des behördlichen Bodenbiodiversitätsmonitoring ausgerichtet sein, insbesondere daran, welche Organismengruppen künftig über eDNA, comDNA, Metabarcoding oder Metagenomik erfasst werden sollen, und in welchem Umfang eRNA-basierte Verfahren genutzt werden. Zur Standardisierung bilden Ringtests ein zentrales Instrument zur Qualitätssicherung und Sicherstellung der Reproduzierbarkeit. Aufgrund des hohen Koordinationsaufwands wird empfohlen, Standardisierungen organismengruppenübergreifend zu bündeln, wo dies fachlich sinnvoll ist, um Kosten und Zeitaufwand zu reduzieren. Die bislang größte Einschränkung für ein bundesweit konsistentes Monitoring ist die fehlende Harmonisierung entlang der gesamten Prozesskette. Unterschiedliche Extraktionsmethoden, Primer, Sequenzierstrategien und bioinformatische Pipelines führen zu nicht vergleichbaren Ergebnissen. Daher wird empfohlen, kurzfristig bundesweit verbindliche SOPs für die Probenahme von Organismengruppen für molekularbiologische Anwendungen, DNA-/RNA-Extraktion, PCR-Protokolle, Sequenzierung und Qualitätskontrollen zu etablieren. Dies schließt auch die Entwicklung von Kontrollen (zum Beispiel Spike-ins) ein, die die Effizienz der Laborarbeiten erfassen können, sodass Laborschritte bewertet und die Harmonisierung der Sequenzierungsergebnisse ermöglicht wird. Die Standardisierung entlang der gesamten Prozesskette ist die grundlegende Voraussetzung für verlässliche Langzeit-Trendanalyse im behördlichen Bodenmonitoring.

Standardisierung der Laborschritte und bioinformatischen Auswertung für die festgelegte Sequenzierungsstrategie

- ▶ Optimierung des Budgets und der Entwicklungszeit für Ringtests durch Kombination mehrerer Organismengruppen

Etablierung von bundesweit verbindlichen SOPs für

- ▶ Probenahme geeignet für eDNA / comDNA (und eRNA)
- ▶ DNA-/RNA-Extraktion
- ▶ PCR-Protokolle (Metabarcoding)
- ▶ Sequenzierung und Qualitätskontrollen (Metabarcoding, Metagenomik, Metatranskriptomik)
- ▶ Short-read und Long-Read Technologien
- ▶ Metabarcoding und Metagenomik

7.3 Kuratierung und Ergänzung von Referenzdatenbanken

Die Verfügbarkeit qualitativ hochwertiger und geographisch relevanter Referenzdaten stellt einen der größten Engpässe für die molekularbiologische Biodiversitätserfassung dar. Dieses Handlungsfeld umfasst sowohl die systematische Bewertung bestehender Referenzdatenbanken als auch deren gezielten Ausbau durch DNA-Barcoding oder Genomsequenzierung. Die Analyse zeigt, dass der Nutzen von Metabarcoding und Metagenomik direkt von der Vollständigkeit und Qualität der Referenzen abhängt. Für einige Organismengruppen, etwa Enchyträen und Regenwürmer, sind die Voraussetzungen bereits vergleichsweise gut, während für Mikroarthropoden, Protisten oder Nematoden erhebliche Lücken bestehen. Empfohlen wird daher ein gestuftes Vorgehen, bei dem zunächst Datenbankanalysen zur Identifikation häufiger, aber fehlender Taxa durchgeführt werden und anschließend gezielt Referenzen unter Einbindung taxonomischer Expertise erzeugt werden. Dabei sollten qualitätsgesicherte Datenbankstrukturen mit DOI- und Versionskontrolle verwendet sowie fehlerhafte Barcodes oder Referenzgenome ausgeschlossen werden. Mittel- bis langfristig ist der Aufbau einer kuratierten und aktuell gehaltenen Referenzdatenbank durch das behördliche Monitoring notwendig, um Aktualität und Datenqualität dauerhaft zu sichern. Die Entscheidung über die Sequenzierungsstrategie und die Markergene für die jeweiligen Organismengruppen sollte unbedingt diesem Handlungsbedarf vorausgehen (Abbildung 7, Punkt 1 und 2), um die Ergänzung geeigneter Referenzen, wie Full-Length-Barcodes, festgelegte Markergene oder Referenzgenome, zielgerichtet umzusetzen.

Empfehlung für ein gestuftes Vorgehen zum Aufbau einer kuratierten, aktuell gehaltenen Referenzdatenbank

- ▶ Festlegung der Sequenzierungsstrategie (short-, long-reads Metabarcoding oder Metagenomik) und Markergene (Metabarcoding) für Organismengruppen
- ▶ Zunächst Datenbankanalyse zur Identifikation fehlender relevanter Taxa
- ▶ Anschließend gezielte Referenzgenerierung unter taxonomischer Expertise
- ▶ Nutzung qualitätsgesicherter, DOI- und versionskontrollierter Referenzdatenbanken
- ▶ Ausschluss fehlerhafter Barcodes und Referenzgenome

7.4 Quantifizierung von Bakterien, Archaeen, Pilzen

Ein weiteres zentrales Handlungsfeld betrifft die Verbesserung der quantitativen Aussagekraft molekularbiologischer Daten. Für Mikroorganismen ist die Ableitung von Abundanzen aus Sequenzdaten bislang nur eingeschränkt möglich. Die Entwicklung und Validierung interner Standards, wie Spike-ins, qPCR oder ddPCR, ist daher entscheidend. Eng damit verbunden ist die systematische Untersuchung von Relikt-DNA, die insbesondere in Böden zu Fehlinterpretationen führen kann. Ohne belastbare Kenntnisse über den Anteil von Relikt-DNA in der Biodiversitätsauswertung bleibt die ökologische Interpretation von eDNA-Daten eingeschränkt. Empfohlen wird daher, Relikt-DNA-Studien anhand von Mock-Gemeinschaften und Zeitreihen als festen Bestandteil der methodischen Weiterentwicklung zu etablieren.

Entwicklung und Validierung interner Standards für Quantifizierung von Bakterien, Archaeen und Pilzen

- ▶ Spike-in, qPCR oder ddPCR

7.5 Erweiterte Metagenomik- und Metatranskriptomik-Ansätze

Metagenomik und insbesondere Metatranskriptomik stellen strategische Erweiterungen über das klassische Metabarcoding hinaus dar. Während Metagenomik bereits mittelfristig einen Mehrwert durch höhere taxonomische und funktionelle Auflösung bietet und eine breite, primerfreie Erfassung verschiedener Organismengruppen erlaubt, befindet sich Metatranskriptomik noch überwiegend im Forschungsstadium. Die Bewertung zeigt jedoch, dass Metatranskriptomik perspektivisch ein Alleinstellungsmerkmal für die Erfassung aktiver Organismen und ökosystemarer Funktionen besitzt. Empfohlen wird ein schrittweiser, langfristig angelegter Aufbau: zunächst methodische Standardisierung und Aufbau geeigneter Referenzdatensätze an ausgewählten Standorten, anschließend eine thematische Fokussierung, zum Beispiel auf Nährstoffkreisläufe oder Stressreaktionen. Besonders vielversprechend ist dabei die Kombination von eDNA- und eRNA-Ansätzen, da sie eine differenzierte Erfassung der gesamten Biodiversität und der aktiven Organismen ermöglicht. Metabarcoding bleibt derzeit die ausgereifteste Methode für Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen), Pilze, und Nematoden, während Metagenomik und Metatranskriptomik eine breitere taxonomische und funktionelle Abdeckung erlauben. Pilotstudien in ausgewählten Ökosystemen wie Wald, Acker oder Grünland werden empfohlen, um funktionale Indikatoren über Metatranskriptomik zu erfassen. Insbesondere für Protisten und

Mikroarthropoden sind diese primerfreien, genombasierten Omic-Verfahren vielversprechend, da sie die gesamte Organismengemeinschaft in eDNA/eRNA-Proben in einem Sequenzierungsschritt erfassen, im Gegensatz zu Metabarcoding, das für jede Organismengruppe spezifische Primer benötigt. Die Effektivität, Effizienz und das Kosten-Nutzen-Verhältnis der Omic-Verfahren für das behördliche Monitoring sollte daher analog zu Handlungsbedarf 1 (Abbildung 7) evaluiert werden.

Empfehlungen für den Aufbau von Metagenomik- und Metatranskriptomik-Verfahren für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring

- ▶ Die Kombination von eDNA- und eRNA-Ansätzen ermöglicht eine differenzierte Erfassung der gesamten Biodiversität und aktiver Organismen und damit breitere taxonomische und funktionelle Abdeckung.
- ▶ Methoden müssen auf die Anforderungen von ANK und DAS und für unterschiedliche Organismengruppen mit optimalen Kosten-Nutzen-Einsatz passen.
- ▶ Metabarcoding ist derzeit ausgereift für Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen), Pilze und Nematoden.
- ▶ Komplementäre Kombination von Metabarcoding, Metagenomik und Metatranskriptomik strategisch sinnvoll, um Fragestellungen und Organismengruppen optimal zu begegnen.

7.6 Alternative Auswerteverfahren, taxonomiefreie und funktionale Indizes

Das letzte Handlungsfeld betrifft die Weiterentwicklung der Datenauswertung und den Aufbau institutioneller Expertise. Taxonomiefreie Indizes, funktionelle Traits und KI-gestützte Verfahren eröffnen neue Perspektiven für die Interpretation komplexer molekularbiologischer Datensätze, sind jedoch bislang nur unzureichend validiert. Zur Unterstützung von comDNA-basierten Daten und ergänzend für Taxonomen zeigen KI-gestützte Bildauswertungsverfahren großes Potenzial, wie erste Anwendungen im Insektenmonitoring bereits belegen, ihre Aussagekraft für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring sollte jedoch systematisch geprüft werden. Parallel dazu ist der gezielte Aufbau fachlicher Kompetenz in Bioinformatik und KI erforderlich, um die Ergebnisse sachgerecht interpretieren zu können und KI-basierte Auswerteverfahren kontinuierlich zu trainieren. Empfohlen wird daher, diese Entwicklungen begleitend und selektiv voranzutreiben und langfristig in Personalentwicklung und kontinuierliche Weiterbildung zu investieren.

Empfehlungen für alternative Auswerteverfahren

- ▶ Evaluierung der Aussagekraft von KI-gestützten Bildauswertungsverfahren, insbesondere zur Unterstützung von comDNA-Metabarcodingdaten und für Taxonomen
- ▶ Systematische Validierung taxonomiefreier Indizes und funktioneller Traits. Synergien mit Daten aus den Biodiversitätsexploratorien sind denkbar.
- ▶ Aufbau fachlicher Kompetenz und kontinuierliche Weiterbildung im Bereich KI-gestützter Auswertungen.

Gesamtbewertung

In der Gesamtschau ergibt sich ein stufenweiser Entwicklungsfahrplan für das behördliche Bodenbiodiversitätsmonitoring (Abbildung 7). Zu Beginn stehen grundlegende strategische Entscheidungen im Vordergrund, etwa welche Organismengruppen erfasst und welche Methoden dafür eingesetzt werden sollen. Kurzfristig liegt der Fokus auf methodischen Vergleichsstudien und der Umsetzung erster Standardisierungen. Mittelfristig sind der Aufbau robuster Referenzdatenbanken sowie die Etablierung von Quantifizierungsgrundlagen entscheidend. Langfristig erfolgt die Integration funktioneller Analysen und KI-gestützter Auswerteverfahren, um die Interpretation komplexer molekularbiologischer Daten zu optimieren. Durch dieses abgestufte und strategisch koordinierte Vorgehen kann ein wissenschaftlich fundiertes, vergleichbares und zukunftsfähiges behördliches Bodenbiodiversitätsmonitoring etabliert werden, das sowohl aktuelle als auch zukünftige Anforderungen an Biodiversitätsbewertung, Klimaschutz und Anpassung an den Klimawandel zuverlässig abbildet.

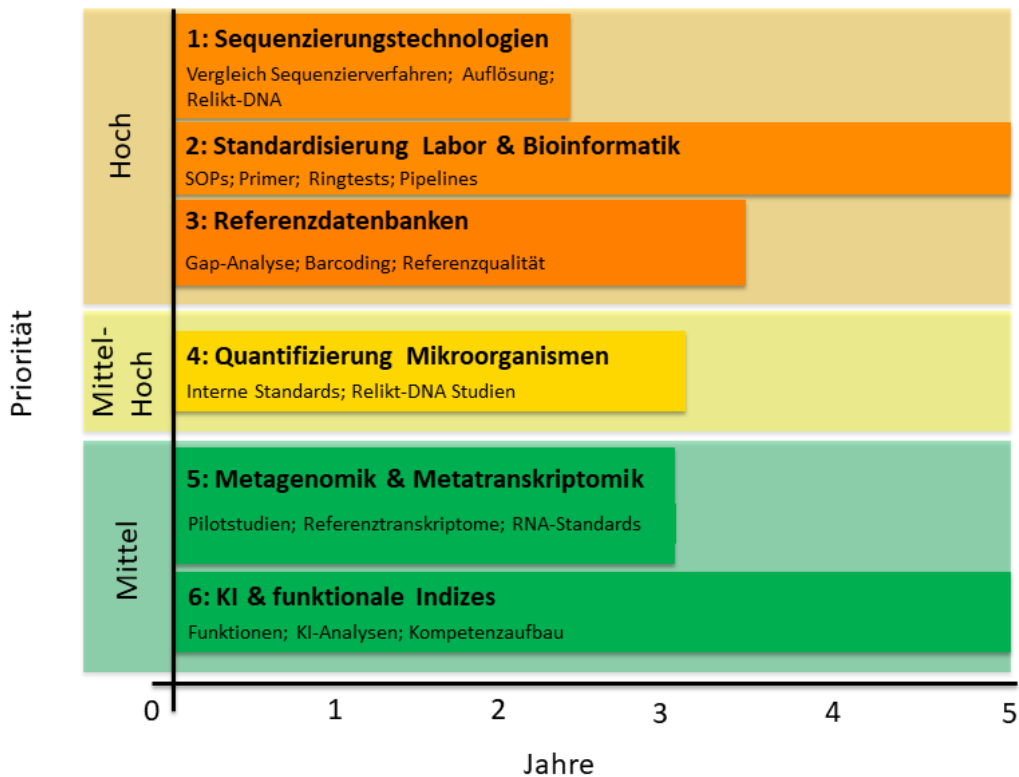


Abb. 7 Zeitlicher Rahmen und Priorisierung der sechs Handlungsfelder für die Weiterentwicklung des molekularbiologischen Bodenbiodiversitätsmonitorings.

Die Breite der Balken zeigt den geplanten Zeithorizont (in Jahren), die Farbgebung die Priorität der Umsetzung (orange = hohe Priorität, gelb = mittel-hohe Priorität, grün = mittlere Priorität). Die Beschriftungen innerhalb der Balken nennen jeweils das Handlungsfeld sowie zentrale inhaltliche Schwerpunkte.

Verweis auf bestehende ISO-Richtlinien

- ▶ ISO 11063-2020 Soil quality - Direct extraction of soil DNA
- ▶ ISO/DIS 23611-1:2025 - Sampling of soil invertebrates - Part 1: Hand-sorting and extraction of earthworms
- ▶ ISO 23611-2:2006 Soil quality — Sampling of soil invertebrates — Part 2: Sampling and extraction of micro-arthropods (Collembola and Acarina)
- ▶ ISO 23611-3:2019 Soil quality — Sampling of soil invertebrates — Part 3: Sampling and extraction of enchytraeids
- ▶ ISO 23611-4:2022 Soil quality — Sampling of soil invertebrates — Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes

Literaturverzeichnis

- Andújar C, Arribas P, Ruzicka F, Crampton-Platt A, Timmermans MJ, Vogler AP. Phylogenetic community ecology of soil biodiversity using mitochondrial metagenomics. *Molecular Ecology*. 2015. 24:3603-17. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mec.13195>
- Arribas P, Andújar C, Hopkins K, Shepherd M, Vogler AP. Metabarcoding and mitochondrial metagenomics of endogean arthropods to unveil the mesofauna of the soil. *Methods in Ecology and Evolution*. 2016. 7:1071-81. <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/2041-210X.12557>
- Arribas P, Andújar C, Salces-Castellano A, Emerson BC, Vogler AP. The limited spatial scale of dispersal in soil arthropods revealed with whole-community haplotype-level metabarcoding. *Molecular Ecology*. 2021. 30:48-61. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mec.15591>
- Ascenzi A, Wührl L, Feng V, Klug N, Pylatiuk C, Cerretti P, Meier R. EntoSieve: Automated Size-Sorting of Insect Bulk Samples to Aid Accurate Megabarcoding and Metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*. 2025. 11:e14097. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.14097>
- Becker B, Pushkareva E. Metagenomics provides a deeper assessment of the diversity of bacterial communities in polar soils than metabarcoding. *Genes*. 2023. 14:812. <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/4/812>
- Bista, I., & Lino, A. Long-read sequencing for biodiversity analyses—A comprehensive guide. *Methods in Ecology and Evolution*. 2026. 17, 650–667. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.70250>
- Blaxter ML, Spurgeon D, Kille P, of Life WS, Darwin Tree of Life Consortium. The genome sequence of the common earthworm, *Lumbricus terrestris* (Linnaeus, 1758). Wellcome open research. 2023. 8:500. <https://wellcomeopenresearch.org/articles/8-500/v1>
- Bleidorn C, Sandberg F, Martin S, Vogler AP, Podsiadlowski L. The untapped potential of short-read sequencing in biodiversity research. *Trends in Genetics*. 2025. 2:S0168-9525(25)00229-X. doi: 10.1016/j.tig.2025.09.001.
- Buetas E, Jordán-López M, López-Roldán A, D’Auria G, Martínez-Priego L, De Marco G, Carda-Diéguez M, Mira A. Full-length 16S rRNA gene sequencing by PacBio improves taxonomic resolution in human microbiome samples. *BMC genomics*. 2024. 25:310. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10213-5>
- Che-Pelicier, A., Hampton, H.G., Sabadel, A.J., Thomson Laing, G., Miller, T. and Pochon, X. Release and degradation of environmental DNA and RNA from eels in Aotearoa New Zealand. 2025. *Environmental DNA*, 7: 70128. <https://doi.org/10.1002/edn3.70128>
- Collins G, Schneider C, Boštjančić LL, Burkhardt U, Christian A, Decker P, Ebersberger I, Hohberg K, Lecompte O, Merges D, Muelbaier H. The MetalInvert soil invertebrate genome resource provides insights into below-ground biodiversity and evolution. *Communications biology*. 2023. 6:1241. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05621-4>
- Córdoba-Agudelo M, Schmidt M, Serwetnicka M, Görres C-M, Zinkernagel J, Francioli D. 16S long-read metabarcoding in field conditions uncovers compost-driven modulation of rhizosphere

- bacterial communities during Red Bell Pepper development. 2025. *Biology and Fertility of Soils*. 1-17. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7800711/v1>
- Cristescu ME. Can environmental RNA revolutionize biodiversity science? *Trends in Ecology & Evolution*. 2019. 34:694-7. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.05.003>
- Cuartero J, Briones MJ, Rast BM, Stierli B, Maurer-Troxler C, Hug AS, Widmer F, Schlaghamerský J, Frey B. Earthworm and enchytraeid indicator taxa of different land-use types identified using soil DNA metabarcoding. *Applied Soil Ecology*. 2025. 206:105891. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2025.105891>
- Cuartero J, Brunner I, Schaub M, Gwiazdowicz DJ, Skubała P, Qin J, Krogh PH, Frey B. Comparing soil microarthropod communities derived directly from soil DNA metabarcoding with those from morphological assessment in a drought-prone and irrigated pine forest. *Applied Soil Ecology*. 2025. 209:106042. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2025.106042>
- Doorenspleet K, Mailli AA, van der Hoorn BB, Beentjes KK, De Backer A, Derycke S, Murk AJ, Reiss H, Nijland R. Advancing molecular macrobenthos biodiversity monitoring: a comparison between Oxford Nanopore and Illumina based metabarcoding and metagenomics. *PeerJ*. 2025. 13:e19158. <https://doi.org/10.7717/peerj.19158>
- Edwin NR, Duff A, Deveautour C, Brennan F, Abram F, O'Sullivan O. Consistent microbial insights across sequencing methods in soil studies: the role of reference taxonomies. *mSystems*. 2025. 10:e01059-24. DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.01059-24>
- Erséus C. Etablering av bibliotek av DNA-streckkoder från svenska gördelmaskar (Annelida). Naturvårdsverket, Stockholm 2023. 978-91-620-7097-7
- Francioli D, Lentendu G, Lewin S, Kolb S. DNA metabarcoding for the characterization of terrestrial microbiota—pitfalls and solutions. *Microorganisms*. 2021. 9:361. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361>
- Franzosa, E. A., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X. C., & Huttenhower, C. Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nature Reviews Microbiology*. 2015. 13:360-372.
- Holman LE, Zampirolo G, Gyllencreutz R, Scourse J, Frøslev T, Carøe C, Gopalakrishnan S, Pedersen MW, Bohmann K. Navigating past oceans: comparing metabarcoding and metagenomics of marine ancient sediment environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*. 2025. 20:e14086. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.14086>
- Jänsch S, Alves D, Cunha L, Krogh PH, Natal-da-Luz T, Rojo V, Römbke J, Sapkota R, Scheffczyk A, Schmelz RM, Scopel L. Comparison of Morphological and DNA-Based Identification Methods to Assess Earthworm (Clitellata: Lumbricidae) Diversity at 25 Permanent Soil Monitoring Sites in Germany. *Ecology and Evolution*. 2025. 15:e71155. <https://doi.org/10.1002/ece3.71155>
- Jänsch S, Scheffczyk A, Römbke J, Rojo V, Vierna J, Vizcaíno A, da Luz TN, Alves D, Martins P, Mendes S, Scopel L. Bewertung der biologischen Vielfalt mittels DNA-Extraktion aus Bodenproben von BDF. Umweltbundesamt. FKZ 3717 74 234 0
- Königer J, Ballabio C, Panagos P, Jones A, Schmid MW, Orgiazzi A, Briones MJ. Ecosystem type drives soil eukaryotic diversity and composition in Europe. *Global change biology*. 2023. 29:5706-19. <https://doi.org/10.1111/gcb.16871>

- Laroche O, Wood SA, Tremblay LA, Ellis JI, Lejzerowicz F, Pawlowski J, Lear G, Atalah J, Pochon X. First evaluation of foraminiferal metabarcoding for monitoring environmental impact from an offshore oil drilling site. *Marine Environmental Research*. 2016. 120:225-35. DOI: 10.1016/j.marenvres.2016.08.009
- Laroche O, Wood SA, Tremblay LA, Lear G, Ellis JI, Pochon X. Metabarcoding monitoring analysis: the pros and cons of using co-extracted environmental DNA and RNA data to assess offshore oil production impacts on benthic communities. *PeerJ*. 2017. 17;5:e3347. DOI: ; DOI 10.7717/peerj.3347
- Le Cadre J, Klemp FL, Bálint M, Scheu S, Schaefer I. Applicability and perspectives for DNA barcoding of soil invertebrates. *PeerJ*. 2024. 12:e17709. <http://doi.org/10.7717/peerj.17709>
- Lehmitz R, Decker P. The nuclear 28S gene fragment D3 as species marker in oribatid mites (Acari, Oribatida) from German peatlands. *Experimental and Applied Acarology*. 2017. 71:259-76. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0126-x>
- Meyer-Dombard, D.R., Bogner, J.E. and Malas, J. A review of landfill microbiology and ecology: a call for modernization with 'next generation' technology. *Frontiers in Microbiology*. 2020. 11:1127. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01127>
- Mittelstrass J, Heinzelmann R, Eschen R, Hartmann M, Kupper Q, Schneider S, Prospero S, Franić I. Metabarcoding with Illumina and Oxford Nanopore Technologies provides complementary insights into tree seed mycobiota. *Environmental Microbiome*. 2025. 20:53. <https://doi.org/10.1186/s40793-025-00712-7>
- Morgado-Gamero, W.B., Tournayre, O. and Cristescu, M.E.. Comparative Decay Dynamics and Detectability of eDNA and eRNA in Connected and isolated freshwater mesocosms using digital PCR. *Molecular Ecology Resources*. 2025. e70028. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.70028>
- Muelbaier H, Arthen F, Collins G, Hickler T, Hohberg K, Lehmitz R, Pauchet Y, Pfenninger M, Potapov A, Romahn J, Schaefer I. Genomic evidence for the widespread presence of GH45 cellulases among soil invertebrates. *Molecular Ecology*. 2024. 33:e17351. <https://doi.org/10.1111/mec.17351>
- Nagler M., Podmirsega S. M., Ascher-Jenull J., Sint, D. & Traugott M. Why eDNA fractions need consideration in biomonitoring. *Molecular Ecology Resources*, 2022. 22: 2458-2470. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/1755-0998.13658>
- Qian T, Shan X, Wang W., Jin X. Effects of temperature on the timeliness of eDNA/eRNA: A case study of *Fenneropenaeus chinensis*. *Authorea*. 2024. DOI: 10.22541/au.170670947.79437571/v1
- Runnel K, Abarenkov K, Copot O, Mikryukov V, Kõljalg U, Saar I, Tedersoo L. DNA barcoding of fungal specimens using PacBio long-read high-throughput sequencing. *Molecular Ecology Resources*. 2022. 22:2871-9. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13663>
- Schmidt A, Schneider C, Decker P, Hohberg K, Römbke J, Lehmitz R, Bálint M. Shotgun metagenomics of soil invertebrate communities reflects taxonomy, biomass, and reference genome properties. *Ecology and Evolution*. 2022. 12:e8991. <https://doi.org/10.1002/ece3.8991>

- Schneider C, Cruaud C, D'Haese CA. Unexpected diversity in Neelipleona revealed by molecular phylogeny approach (Hexapoda, Collembola). *Soil Organisms*. 2011. 83:383-98. ISSN: 1864-6417
- Schoenle A, Francis O, Archibald JM, Burki F, de Vries J, Dumack K, Eme L, Florent I, Hehenberger E, Hoffmeyer TT, Irisarri I. Protist genomics: key to understanding eukaryotic evolution. *Trends in Genetics*. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2025.05.004>
- Scriver, M., Zaiko, A., Pochon, X. and von Ammon, U. Harnessing decay rates for coastal marine biosecurity applications: A review of environmental DNA and RNA fate. *Environmental DNA*. 2023. 5:960-972. <https://doi.org/10.1002/edn3.405>
- Seeleuthner Y, Mondy S, Lombard V, Carradec Q, Pelletier E, Wessner M, Leconte J, Mangot JF, Poulain J, Labadie K, Logares R. Single-cell genomics of multiple uncultured stramenopiles reveals underestimated functional diversity across oceans. *Nature Communications*. 2018. 9:31 <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02235-3>
- Sys S, Weißbach S, Jakob L, Gerber S, Schneider C. CollembolAI, a macrophotography and computer vision workflow to digitize and characterize samples of soil invertebrate communities preserved in fluid. *Methods in Ecology and Evolution*. 2022. 13:2729-42. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.14001>
- Varusk S, Sammet K, Ariyan M, Alwutayd KM, Anslan S. DNA metabarcoding of mites from small soil samples: limited agreement with morphological identifications but improved results from long-read sequencing. *PeerJ*. 2025. 13:e20205. <http://doi.org/10.7717/peerj.20205>
- Wagner, A. O., Malin, C., Knapp, B. A., & Illmer, P. Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. 74: 2537-2539. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.02288-07>
- Wührl L, Pylatiuk C, Giersch M, Lapp F, von Rintelen T, Balke M, Schmidt S, Cerretti P, Meier R. DiversityScanner: Robotic handling of small invertebrates with machine learning methods. *Molecular ecology resources*. 2022. 22:1626-38. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13567>
- Young MR, Proctor HC, Dewaard JR, Hebert PD. DNA barcodes expose unexpected diversity in Canadian mites. *Molecular Ecology*. 2019. 28:5347-59. <https://doi.org/10.1111/mec.15292>
- Young MR, deWaard JR, Hebert PD. DNA barcodes enable higher taxonomic assignments in the Acari. *Scientific Reports*. 2021. 11:15922. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95147-8>

Anhangsverzeichnis

Anhang Tabelle A1: Tabelle Bewertungsmatrix zur Aussagekraft und Robustheit der drei molekularbiologischen Verfahren für die untersuchten Organismengruppen.

Anhang Tabelle A2: Quellenangaben der 174 Publikationen aus der qualitativen Literaturrecherche, die in die Bewertungsmatrix (Tabelle A1) aufgenommen wurden.