

Machbarkeitsstudie

Monitoring der Biodiversität im Grundwasser

Wissensstand - Methodik - Szenarien



Dübendorf, 19.12.2025

Im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU)

Impressum

Auftraggeber: Bundesamt für Umwelt (BAFU), Abt. Hydrologie, CH-3003 Bern

Das BAFU ist ein Amt des Eidg. Departements für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation (UVEK).

Auftragnehmerin: Eawag, Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz, Abteilung Gewässerökologie, CH-8600 Dübendorf

Autoren: Dominik Kirschner¹, Mara Knüsel¹, Florian Altermatt^{1, 2}, Roman Alther^{1, 2}

¹ - Abteilung für Aquatische Ökologie, Eawag: Das Wasserforschungsinstitut des ETH-Bereichs, Überlandstrasse 133, CH-8600 Dübendorf

² - Institut für Evolutionsbiologie und Umweltwissenschaften, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich

Begleitung BAFU: Stephanie Zimmermann, Flavio Malaguerra

Hinweis: Dieser Bericht wurde im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU) verfasst. Für den Inhalt ist allein die Auftragnehmerin verantwortlich.

Zitierungsvorschlag: Kirschner et al. 2025: Machbarkeitsstudie Monitoring der Biodiversität im Grundwasser: Wissensstand – Methodik – Szenarien. Bundesamt für Umwelt BAFU, Bern, Schweiz. 117 S.

Titelbild: Flohkrebs der Gattung *Niphargus*. © Roman Alther/Eawag

Zusammenfassung

Im Vergleich zu Oberflächengewässern bestehen für das Grundwasser noch grosse Wissenslücken bezüglich dessen Biodiversität, dessen Ökosystemfunktionen und dessen ökologischem Zustand. Für die Erbringung der Ökosystemleistung (u. a. sauberes Trinkwasser) spielt die Grundwasserbiologie aber eine entscheidende Rolle. Ein Monitoring zur Erfassung der Biodiversität und zur Erstellung von Indices über den ökologischen Zustand ist daher aus Sicht eines umfassenden Grundwasserschutzes dringend angezeigt. Biologische Aufnahmen im Grundwasser sind zwar grundsätzlich anspruchsvoller als in Oberflächengewässern, es bieten sich jedoch zwei komplementäre Methoden an: Einerseits die eDNA-Probenahme zur Erfassung und Beschreibung der gesamten biologischen Vielfalt, andererseits die konventionelle Probenahme von Makroorganismen zur gezielten Ergänzung. Für beide Methoden sind in den letzten Jahren im Rahmen von diversen Forschungsprojekten wichtige Grundlagen erstellt worden. Die Probenahme und auch deren Analysen sind grösstenteils etabliert und könnten in einem grösseren Monitoring eingesetzt werden. Forschungsbedarf besteht insbesondere noch bei der Entwicklung von biologischen Indices, die eine umfangreiche Probenahme voraussetzen.

Im Rahmen dieser Machbarkeitsstudie wurden verschiedene Szenarien für die Umsetzung eines Monitorings der Biodiversität im Grundwasser geprüft und evaluiert. Es bietet sich an, das bestehende NAQUA Modul TREND für die Erfassung der Biodiversität zu nutzen. **Die Machbarkeitsstudie zeigt, dass eine sofortige Umsetzung eines auf NAQUA TREND aufbauenden Monitorings möglich ist und keiner weiteren grundlegenden Forschung bedarf.** Die Implementation kann grösstenteils anhand von bestehenden «best-practices» und Erfahrungen im Ausland umgesetzt werden. Der sofortige Beginn eines solchen Monitorings bietet die Chance, die Grundwasserbiodiversität wirksam zu erfassen und zur im Gewässerschutzgesetz geforderten Erhaltung einer naturnahen und standortgerechten Biozönose unterirdischer Gewässer beizutragen.

Basierend auf den evaluierten Szenarien, **empfehlen wir einen möglichst baldigen Start eines nationalen, eDNA basierten Grundwassermonitorings, das hier als «NAQUA TREND – BIO» detailliert umschrieben wird.** Dieses Szenario kann mit überschaubarem finanziellen sowie personellen Aufwand umgesetzt werden. Es kann in das bestehende Monitoringprogramm integriert werden und die gesammelten ersten Erfahrungen zur Grundwasserbiodiversität bilden eine starke Grundlage für eine Erhebung eines ersten Referenzzustandes der Biodiversität im Schweizer Grundwasser. Zudem besteht aktuell ein grosses Synergiepotential mit dem NFP 82 Projekt *FutureProof*, um im Rahmen von einer Testphase ein Monitoring aufzugleisen, um die Proben zu analysieren und biologische Indices zu entwickeln. Im internationalen Vergleich ist dieses Szenario vergleichbar mit Anstrengungen in Baden-

Württemberg, welches seit 2006 an ähnlich vielen Messstellen die Fauna im Grundwasser erhebt, sowie mit Bemühungen in Österreich, in denen eDNA bereits erfolgreich getestet wurde.

In einem ersten Schritt sollte dieses Grundwassermonitoring mit Forschungsprojekten begleitet werden, um Referenzdaten zu schaffen, die Methoden und Analysen zu evaluieren, und um Indices zur Güte der Ökosysteme im Grundwasser zu etablieren. Das NFP 82 Projekt *FutureProof* sowie Expertise in der Arbeitsgruppe von Prof. Florian Altermatt würde Synergien und Grundlagen für ein solches eDNA Monitoring anbieten. Mittelfristig sollte das Monitoring im nationalen NAQUA-Monitoring integriert und unabhängig von Forschungsinstituten wie der Eawag umgesetzt werden können. Die Machbarkeitsstudie zeigt auf, dass als mittelfristiges Ziel eine Umsetzung des Szenario 2 «NAQUA TREND – BIO+» angestrebt werden sollte, da mit gezielten weiteren Messstellen deutlich breitere und repräsentativere Aussagen möglich sind.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 – Ausgangslage	2
2 – Grundlagen	4
2.1 – Biodiversität im Grundwasser	6
2.2 – Aktueller Wissensstand und Monitoring.....	16
2.3 – Biodiversität und anthropogene Einflüsse.....	27
3 – Methodik & Analytik	29
3.1 – Konventionelle Methoden	31
3.2 – eDNA-Methode: Beprobung und Analyse.....	36
3.3 – Übersicht über die Nutzung von konventionellen und eDNA-Methoden zum Monitoring der Biodiversität im Grundwasser	44
4 – Szenarien für ein Monitoring der Biodiversität im Grundwasser	48
4.1 – Szenarien.....	49
4.2 – Verantwortlichkeiten und Aufgabenverteilung.....	64
4.3 – Stand der Referenzdaten, Qualitätssicherung und Datenarchivierung der eDNA-Methode.....	65
4.4 – Entwicklungs- und Harmonisierungspotential	72
4.5 – Horizon Scanning über Entwicklungen der eDNA-Methode.....	78
5 – Schlussfolgerung und Empfehlung	81
6 – Literaturverzeichnis	82
Appendix	104

1 – Ausgangslage

Das Gewässerschutzgesetz (GSchG) Art 1 bezweckt, die Gewässer vor nachteiligen Einwirkungen zu schützen und als natürliche Lebensräume für einheimische Organismen zu erhalten. Die Gewässerschutzverordnung (GSchV) fordert entsprechend, dass «die Biozönose unterirdischer Gewässer naturnah und standortgerecht» und «typisch für nicht oder nur schwach belastete Gewässer» sein soll. Während diese Aspekte in Oberflächengewässern (mit teilweiser Ausnahme der Seen) schon gut implementiert sind und durch verschiedene nationale und kantonale Monitoringprogramme erfasst werden, ist die Ausgangslage im Grundwasser deutlich datenärmer. Es fehlen sowohl Methoden für die routinierte und standardisierte Überwachung wie auch allgemeine Daten zum Zustand und möglichen Veränderungen der Biodiversität im Grundwasser.

Aus chemisch-physikalischer Sicht wird das Grundwasser in der Schweiz im Rahmen der Nationalen Grundwasserbeobachtung NAQUA beobachtet (BAFU, 2019b). NAQUA liefert ein landesweit repräsentatives Bild über Zustand und Entwicklung der schweizerischen Grundwasserressourcen, sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht. Die Biodiversität ist bisher nicht Teil des Langzeitmonitorings, und es bestehen mit Ausnahme von kleineren Pilotstudien an einzelnen NAQUA Messstellen kaum Daten zum Zustand und möglicher Veränderung der Biodiversität im Grundwasser (BAFU, 2019b). Ebenso wird die Biodiversität im Grundwasser in aktuellen Biodiversitätssynthesen kaum berücksichtigt (BAFU, 2022; Gattlen & Klaus, 2023; Klaus et al., 2023).

Die Interpellation Candan Hasan (24.4555: Biodiversität auch im Grundwasser erfassen; Dezember 2024) fordert eine Abklärung, ob im Rahmen des NAQUA Monitoringnetzwerks neben chemisch-physikalischen Messungen auch eine Erfassung und Berücksichtigung der Biodiversität möglich ist, und ob und wie NAQUA mit einem Modul zur Beurteilung der Biodiversität ergänzt werden könnte und wenn ja, ab wann dies möglich wäre.

Im Rahmen dieser Machbarkeitsstudie wird abgeklärt, ob und wie ein angemessenes und umfassendes Langzeitmonitoring der Biodiversität im Grundwasser mit dem heutigen Stand der Technik möglich wäre. Im Vordergrund steht dabei die Umsetzbarkeit der Methode, eine Abschätzung der berücksichtigten Organismengruppen (Mikroben, diverse Wirbellose und spezialisierte Grundwasserfauna), sowie eine Entwicklung möglicher Szenarien der Implementierbarkeit eines Moduls «Biodiversität» im Rahmen des NAQUA Monitoringnetzwerks.

Ziele dieses Berichts

Dieser Bericht fasst den aktuellen Wissensstand bezüglich des Grundwassermonitorings in der Schweiz und den Nachbarländern zusammen, gibt einen Überblick über die Organismengruppen, Funktionen der Grundwasserbiodiversität sowie gängige Methoden zu deren Erfassung. Basierend auf schon bestehenden Ergebnissen aus Pilotstudien der Eawag wird die Eignung moderner Umwelt-DNA (eDNA) Methoden für ein regelmässiges Biodiversitätsmonitoring des Grundwassers in der Schweiz erörtert.

2 – Grundlagen

Grundwasser macht rund 30 % des globalen Süsswassers aus und ist damit die grösste nicht gefrorene Süsswasserreserve der Erde. Es kommt in durchlässigen Gesteinsschichten weltweit vor und spielt eine zentrale Rolle im Wasserkreislauf. Als wichtigste Trinkwasserquelle ist es unverzichtbar für Bevölkerung, Landwirtschaft und Energiegewinnung. In der Schweiz stammen rund 80 % des Trink- und Brauchwassers aus dem Grundwasser. Neben seiner Versorgungsfunktion puffert Grundwasser zudem auch den Wasserstand von Flüssen, Seen und Feuchtgebieten. Zunehmend gerät es jedoch unter Druck: Schadstoffe wie Nitrat, Pestizide oder PFAS, sowie thermische Eingriffe beeinträchtigen Qualität und Funktion. Da Mikro- und Makroorganismen wesentlich zur natürlichen Reinigung beitragen, ist das Verständnis des Grundwasserökosystems entscheidend für die nachhaltige Sicherung dieser lebenswichtigen Ressource. In den letzten Jahren wurden seitens Wissenschaft verschiedene Methoden zur Erfassung der Biodiversität im Grundwasser entwickelt; bisher fehlen jedoch eine Etablierung und Integration eines Routinemonitorings der Biodiversität im Grundwasser.

Mit einem Anteil von etwa 30 % am globalen Süsswasservolumen ist Grundwasser die grösste nicht gefrorene Süsswasserreserve der Erde (Ferguson et al., 2021; Gleeson et al., 2016) und spielt eine essentielle Rolle im globalen Wasserkreislauf (Danielopol et al., 2003). Grundwasser wird von Hydrologen traditionell als «Wasser, welches gesättigt im Untergrund vorkommt und sich dort frei bewegen kann» definiert (Pfannkuch, 1969). In neueren Definitionen, vor allem von Mikrobiologen und Ökologen, wird diese Definition etwas aufgelockert, da diese auch Wasser in ungesättigten Schichten, beispielsweise Höhlen, als Lebensraum mit einschliessen (Madsen et al., 1993). Es kommt weltweit in wasserdurchlässigen (permeablen) geologischen Formationen, sogenannten Grundwasserleitern vor (Arndt, 2012; Robertson et al., 2023). Neben homogenen Grundwasserleitern im lockeren, porösen Untergrund (Porengrundwasser, Lockergesteins-Grundwasser) gibt es Karst-Grundwasser in hauptsächlich kalkhaltigen Grundgesteinen und Kluft-Grundwasser in anderen Grundgesteinen wie Granit oder Gneis. Diese Grundwasserleiter sind ein wichtiges Habitat für Organismen, das durch das Aufkommen und die Erkenntnisse der Grundwasserökologie mehr Beachtung findet (Orghidan, 1959).

Grundwassersysteme findet man auf jedem Kontinent, sie sind bedeutende Trinkwasserreserven, wichtig für die landwirtschaftliche Bewässerung und werden auch für Geothermie bzw. als Wärmespeicher genutzt. Schätzungen gehen davon aus, dass 50 % der Weltbevölkerung direkt von Grundwasser abhängig ist (Kretschmer et al., 2023; UNESCO World Water Assessment Programme, 2022). Aktuelle Modelle gehen von einem Gesamtvolumen des Grundwassers von 43,9 Millionen km³ aus, wobei dies die obersten

10 km der globalen Kruste umfasst. Ein Teil des Grundwassers ist Salin, und Süßwasser kommt meist nur in den ersten Kilometern unter der Oberfläche vor, was immerhin noch einem Volumen von 15,9 km³ entspricht (Ferguson et al., 2021).

In der Schweiz stellt Grundwasser die mengenmässig grösste Ressource an Wasser dar, und hat eine sehr grosse Bedeutung als Trink- und Brauchwasserquelle: Rund 80 % des Trink- und Brauchwassers werden in der Schweiz aus Grundwasser geschöpft (Quelle: BAFU). Neben der Bedeutung als Nutz- und Brauchwasserquellen dienen Aquifere auch als Puffer oder Quelle für Seen, Flüsse oder Feuchtgebiete und versorgen diese direkt mit Frischwasser während niederschlagsarmen Zeiten (Danielopol et al., 2003). Für die Schweizer Wasserwirtschaft am relevantesten sind die oberflächennahen lockeren, porösen Aquifere der grossen Flusstäler sowie die Karstgebiete des Jura. Tiefere Grundwässer rücken durch die mögliche thermische Nutzung aber zunehmend ebenfalls in den Fokus (Loepfe & Meier, 2023).

Trotz seiner zentralen Bedeutung für die Trinkwasserversorgung und den Wasserhaushalt steht das Grundwasser in der Schweiz zunehmend unter Druck. Besonders relevante Herausforderungen für die Zukunft sind die zunehmende Belastung durch langlebige Schadstoffe wie PFAS ("Ewigkeitschemikalien"), die anhaltend hohen Nitratkonzentrationen aus der landwirtschaftlichen Nutzung, sowie die Auswirkungen thermischer Eingriffe (BAFU, 2019b), die die Temperaturverhältnisse im Untergrund verändern. Vor allem die Nitratbelastung im Schweizer Untergrund ist problematisch. So wurden in 15 % der Grundwassermessstellen, sowie 50 % der Messstellen in Ackerbaugebieten die gesetzlichen Grenzwerte von >25 mg/l Nitrat überschritten (<https://www.bafu.admin.ch/bafu/de/home/themen/wasser/grundwasser/grundwasser-qualitaet/nitrat-im-grundwasser.htm>). Diese Entwicklungen Messstellen ein noch schwer abschätzbares Risiko für Grundwassersysteme dar, sowohl was den Status als Ökosystem betrifft, als auch für die aktuelle und zukünftige Nutzung als Trink- und Brauchwasser.

Grundwasser entsteht hauptsächlich durch die Versickerung von Niederschlags- und Oberflächenwasser, das langsam durch die ungesättigte Bodenzone in tiefere Erdschichten gelangt. Auf diesem Weg durchläuft es verschiedene Filter- und Reinigungsprozesse, die wesentlich zur Qualität des Grundwassers beitragen. Neben physikalischen und chemischen Vorgängen spielen dabei auch biologische Prozesse eine Rolle. Mikroorganismen und Makroorganismen im Boden und im Aquifer bilden komplexe funktionelle Netzwerke und bauen organische Substanzen und bestimmte Schadstoffe aktiv ab (Aquilina et al., 2023). Diese Selbstreinigungsfunktion verleiht dem Grundwasser Stabilität, vorausgesetzt, die eintragenden Belastungen übersteigen nicht die Aufnahme- und Abbaukapazitäten des Systems. Ein Verständnis der Grundwasserökosysteme und der darin lebenden Artgemeinschaften ist daher entscheidend, um die Reinigungsleistung und die Widerstandsfähigkeit dieses empfindlichen Systems langfristig zu sichern.

2.1 – Biodiversität im Grundwasser

Woraus besteht die Biodiversität im Grundwasser?

Die Biodiversität im Grundwasser umfasst sowohl Mikroorganismen als auch vielzellige Tiere. Mikroorganismen, darunter Bakterien, Archaeen, Viren und Protozoen, bilden die Basis des Nahrungsnetzes, während Invertebraten (Wirbellose) wie Würmer, Schnecken und Krebstiere die höheren trophischen Ebenen besetzen. Letztere bestehen aus spezialisierten stygobionter Arten, welche ausschliesslich im Grundwasser vorkommen (wie zum Beispiel Grundwasserflohkrebse). Zudem finden sich in oberflächennahen Aquiferen auch Invertebraten mit Bezug zu terrestrischen und aquatischen Oberflächenökosystemen.

Welche Aussagen sind bereits jetzt über den Zustand des Grundwassers möglich?

International gibt es bereits Indices, welche Aussagen über den biologischen Zustand eines Aquifers zulassen, beispielsweise mehrstufige Indices in Deutschland oder Australien. Weitere werden aktuell erforscht und erarbeitet. In der Schweiz gibt es bisher noch keinen Referenzzustand der Biodiversität im Grundwasser. Erste Schweizer Studien konnten jedoch zeigen, dass die oberirdische Landnutzung (Landwirtschaft oder Wald) in oberflächennahen Grundwasserleitern einen Einfluss auf das Vorkommen von Makrofauna als auch auf die Vielfalt und Zusammensetzung der Mikrobiologie hat. Aus diesen ist ableitbar, dass ein Zusammenhang zwischen Landnutzung und Biodiversität im Grundwasser besteht. Eine Ausarbeitung eines spezifischen Index zur Ausgestaltung und Funktionalität von Grundwasserökosystemen ist aus dieser Forschung in einem 2–3-jährigen Horizont realistisch.

Grundwasser als Ökosystem

Grundwasser ist nicht nur das grösste zusammenhängende Süsswassersystem der Erde, es ist auch gleichzeitig das grösste Süsswasserbiom (Griebler et al., 2014a). Das heisst, es ist ein Lebensraum für eine grosse Zahl von Arten. Auch wenn viele davon für die Wissenschaft noch unbekannt sind, können die bekannten Arten, resp. auch Artgruppen als Ganzes für die Bewertung von Grundwasser genutzt werden. In den letzten Jahrzehnten wurde insbesondere die Bedeutung von Grundwasser als wichtigem Ökosystem intensiver untersucht (Koch, Blum, Korbel, et al., 2024; Saccò et al., 2024), unter anderem auch, weil menschliche Aktivitäten (Klimawandel und Erwärmung, Thermische Nutzung, Verschmutzung, Übernutzung der Wasserreserven, siehe Abschnitt 2.2) das Grundwasser verstärkt beeinträchtigen. Grundsätzlich sind die abiotischen Bedingungen im Grundwasser geprägt von Extremen: Komplette

Dunkelheit, hoher Druck, enge räumliche Verhältnisse und geringe Nährstoffverfügbarkeit, wobei die genauen Strukturen und Bedingungen abhängig vom Typ des Grundwasserleiters sind. Durch die langsame Erneuerung der Wasserreserven im Grundwasser (Wochen — Jahrzehnte) sind die abiotischen Bedingungen in Aquiferen im Vergleich zu Oberflächengewässern, beispielsweise die Temperaturen oder der Sauerstoffgehalt, recht konstant, vor allem auch über lange, evolutionär relevante, Zeiträume. Neben stabilen chemischen Parametern und generell eher tiefen Nährstoffverfügbarkeit, ist die Struktur des Lebensraums vor allem durch geringe Porengrösse und geringe Schwankungen der Umweltparameter über den Jahresverlauf gekennzeichnet, und ein wichtiger Faktor für die vorkommende Biodiversität. Während in Karst- und Kluft-Grundwasserleitern mit Wasser gefüllte Hohlräume und Klüfte vorkommen, die freischwimmenden Organismen Platz bieten können, bieten unkonsolidierte Lockergesteinsaquifere einen viel feiner strukturierten Lebensraum in dem die Porengrösse über die Eignung als Lebensraum für höhere Organismen bestimmt (Aquilina et al., 2023; Humphreys, 2009). All diese Faktoren führen zu einer evolutionär sehr spezifisch an diese konstanten Bedingungen angepassten Grundwasserbiozönose.

Weiter unterscheiden sich Grundwassersysteme von Oberflächengewässern durch die dort auftretenden Nahrungsnetzwerke und Energieflüsse. Grundwassersysteme sind normalerweise stark oligotroph (nährstoffarm), und aufgrund der vorherrschenden Dunkelheit fehlen photoautotrophe Mikroorganismen komplett. Deren ökologische Rolle wird jedoch in manchen Systemen von chemolithoautotrophen Mikroorganismen (Verwendung von anorganischen Verbindungen zur Energiegewinnung), vor allem Bakterien und Archaea, übernommen (Hutchins et al., 2016; Fillinger et al., 2023). Ebenso fehlen jegliche Pflanzen (Algen oder höhere Pflanzen). Das heisst, die gesamte Primärproduktion (mit Ausnahme von chemolithoautotrophen Organismen) fehlt, und das Nahrungsnetz ist auf aus Oberflächenökosystemen eingetragenen organischen Material angewiesen. Aufgrund dieser komplexen Zusammenhänge sollte Biodiversität nicht nur beschränkt auf einzelne Gruppen, sondern über alle Organisationsgruppen und trophischen Level, angefangen bei Bakterien als wichtige Grundlage, hinweg untersucht werden (Venarsky et al., 2023; Abbildung 1).

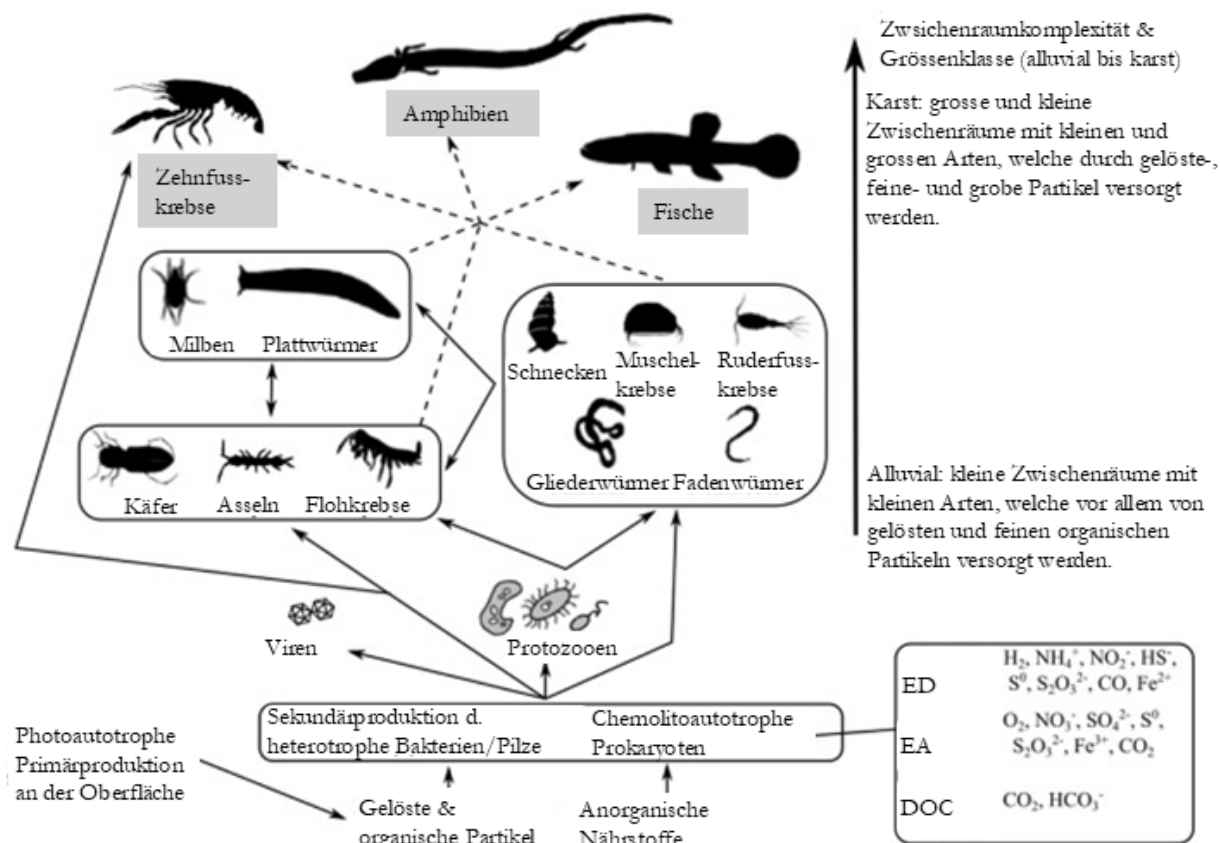


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Grundwasser-Nahrungsnetzes. Sie veranschaulicht (i) unterschiedliche Quellen basaler Energieproduktion (sekundäre Produktion durch heterotrophe Bakterien und Pilze vs. chemolithoautotrophe Prokaryoten), (ii) generelle Energieflusswege sowie (iii) den Einfluss der Hohlraumgrösse auf die Zusammensetzung der Biozönose und die Komplexität des Nahrungsnetzes. Die grau hinterlegten Organismen fehlen in Schweizer Aquiferen. ED steht für «Elektronendonator», EA für «Elektronenakzeptor» und DOC steht für «Gelösten organischen Kohlenstoff». Lizenziert, übernommen, übersetzt und adaptiert nach Venarsky et al., 2023 (©Elsevier).

Mikrobielle Biodiversität

Die mikrobielle Diversität im Grundwasser setzt sich zusammen aus allen bekannten prokaryotischen Gruppen (Fillinger et al., 2023), wie Bakterien und Viren, sowie einzelligen eukaryotischen Organismen wie Amöben oder Wimpertierchen. Die mikrobielle Diversität ist vor allem aus anthropogen belasteten oberflächennahen Grundwasserleitern bekannt, kann aber auch bis in einige Kilometer Tiefe nachgewiesen werden (REF). Die Mikroorganismen kommen dabei, je nach Beschaffenheit des Aquifers, sowohl frei im Wasser lebend (planktonisch) als auch gebunden in Biofilmen vor. Genaue Zahlen zur mikrobiellen Diversität im Grundwasser sind schwer zu erfassen, da selbst in räumlich nah zusammenliegenden Proben oft unterschiedliche Taxa gefunden werden und, im Gegensatz zu höheren

Organismen, Bakterien selten auf Artniveau identifizierbar sind. Methoden zur Erfassung der Biodiversität in Grundwassersystemen basierend auf der Biomasse oder Zellzahl sind daher eine Annäherung. Daraus resultierende Schätzungen gehen global von einer mikrobiellen Biodiversität im Untergrund von 10 Billionen. Seit dem Einsatz von molekularen Bestimmungsmethoden, vor allem dem Sequenzieren ganzer Umweltproben (Metabarcoding), wird die mikrobielle Diversität häufig als Sequenzvariation von Operationalen taxonomischen Einheiten (OTU) innerhalb höherer Klassifizierungen angegeben, was eine direktere Abschätzung der Diversität ermöglicht (Blaxter et al., 2005, Magnabosco et al., 2018).

Im Grundwasser dominieren heterotrophe Mikroorganismen, die auf die Zufuhr organischer Substanz von aussen angewiesen sind (Gibert et al., 1994). Zu den häufigsten Gruppen zählen kultivierbare heterotrophe Gruppen wie Proteobakterien, Actinobakterien, Firmicutes und Bacteroides. Aufgrund einer eingeschränkten Auflösung der Biodiversitätsdaten auf Stamm- oder Gattungsebene, nahm man lange Zeit an, dass die Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften bezüglich der vorkommenden Gruppen jener in Oberflächengewässern ähnlich ist (Griebler & Lueders, 2009). Neuere molekulare Analysen zeigen jedoch ein Vorkommen nicht kultivierbarer Gruppen wie Chloroflexi, Verrucomicrobia und Nitrospirae sowie bislang unbekannter Phyla, die auf eine massive Unterschätzung der aktuellen Diversität, sowie einer viel stärkeren Differenzierung gegenüber Oberflächengewässern hinweist (Couton et al., 2023a; Fillinger et al., 2023).

Metazoen Biodiversität

Unter Metazoen werden mehrzellige eukaryotische Organismen (ohne Pilze) zusammengefasst. Im Grundwasser handelt es sich hierbei vor allem um Invertebraten wie Würmer (Nematoden, Oligochaeten), Schnecken und andere Weichtiere (Mollusken), sowie verschiedene Gruppen von Krebstieren (Crustacea), vor allem Ruderfusskrebse, Asseln und Flohkrebse (Tabelle 1). Im Grundwasser beobachtete Arten sind meist im Bereich von μm bis wenige mm gross, einzelne Flohkrebse können bis wenige cm gross werden. Als grundwasserbewohnende Wirbeltiere sind bisher in Europa nur der Grottenolm (im Dinarischen Karst) und eine Population der Bachschmerle (Süddeutschland) bekannt (Behrman-Godel et al., 2017). Es gibt mehrere Klassifizierungssysteme zur Beschreibung der im Grundwasser vorkommenden Fauna (Stygofauna). Durchgesetzt hat sich die Unterteilung basierend auf der Regelmässigkeit des Vorkommens in Aquiferen. Dabei wird unterschieden zwischen stygobionten Arten (Stygobiota oder Stygobionte), welche exklusiv im Grundwasser vorkommen, stygophile Arten, die sowohl im Grundwasser als auch in Oberflächengewässern vorkommen und stygoxene Arten, die zwar im Grundwasser gefunden werden können, dort allerdings eher zufällig vorkommen (Culver et al., 2023; Gibert et al., 1994).

Stygobionte Arten sind gekennzeichnet durch spezifische Anpassungen an das Leben im Grundwasser wie dem Fehlen von Pigmentierung (Abbildung 2), reduzierter oder fehlender Augen, einem flachen Körperbau, einem stark verlangsamten Lebenszyklus, sehr niedrigen Populationsdichten und einer langsamen Reproduktionsrate (Hose et al., 2022). So können Grundwasserflohkrebse beispielsweise bis zu 10 Jahre alt werden und können sich mit wenigen Nahrungsaufnahmen pro Jahr am Leben erhalten. Zusätzlich zu den oben genannten Anpassungen variiert auch die Grösse der Organismen stark, von einigen Millimetern (Ruderfusskrebse) bis zu einzelnen Zentimetern (Flohkrebse) (Abbildung 3; Marmonier et al., 2023). Eine wichtige Rolle unter den stygobionten Arten spielen die Krebstiere (Crustacea), welche Regional mehr als 50 % der bekannten stygobionten Arten ausmachen können, und in Europa die Anzahl an Oberflächengewässer bewohnenden Krebstiere übertreffen (Deharveng et al., 2009; Stoch & Galassi, 2010). Ein weiteres Merkmal ist die geringe Ausbreitungsgeschwindigkeit von stygobionten Arten, welche zu sehr lokal begrenzten Verbreitungsmustern führen kann und unter anderem zu einer hohen Anzahl an Endemiten und lebenden Fossilien beiträgt (Gibert, 1986; Ginet, 1969).

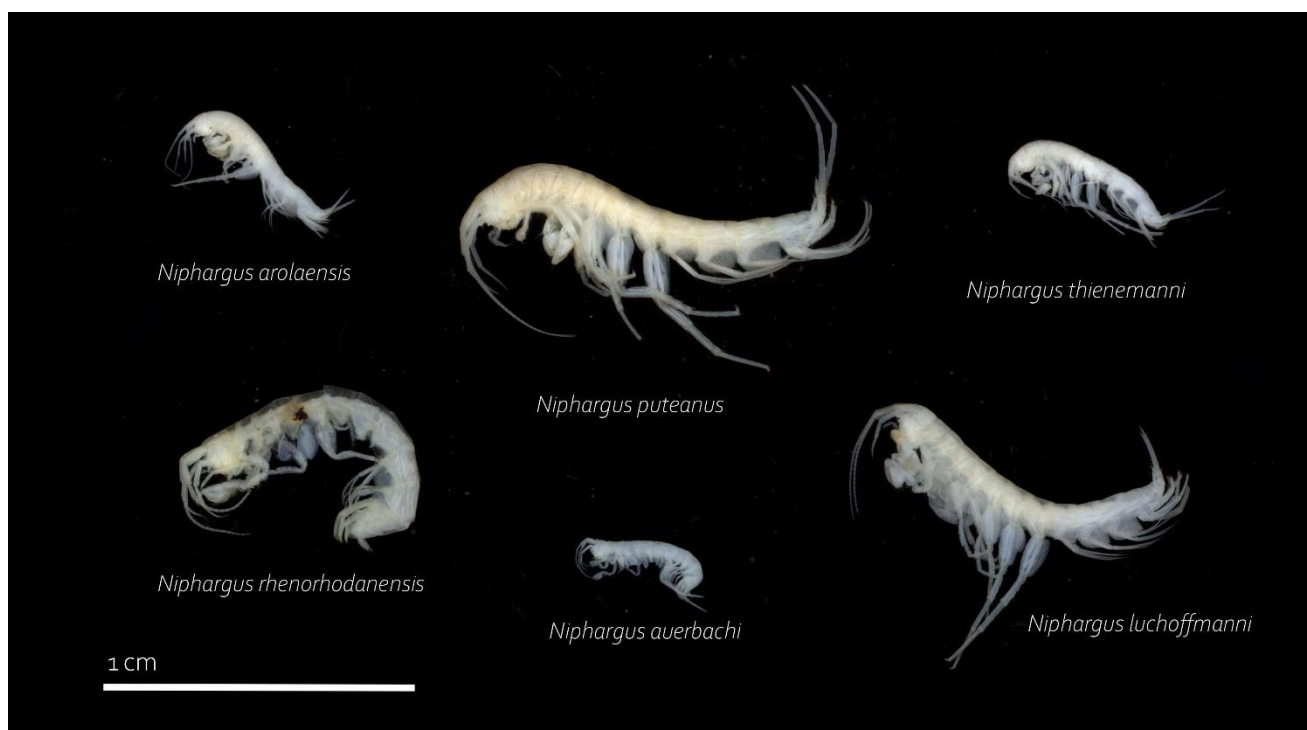


Abbildung 2: Beispiele einiger in der Schweiz heimischen Grundwasserflohkrebse aus der Gattung *Niphargus*. Sehr gut ersichtlich sind die Anpassungen an den Lebensraum Grundwasser: ein flacher Körperbau, fehlende Pigmentierung sowie fehlende Augen. © Eawag/Mara Knüsel.

Die Biodiversität dieser Metazoen im Grundwasser ist global nicht homogen verteilt, Hotspots finden sich in Europa, Nordamerika sowie Australien (Stoch et al., 2009; Zigmajster et al., 2018). In Europa geht man von mindestens 2000 stygobionten Arten (Gibert & Culver, 2009) aus, was im Vergleich zu sonstigen Hotspots wie Australien (170) oder Nordamerika (300) um ein Vielfaches höher ist, jedoch teilweise auch die höhere Untersuchungsdichte widerspiegelt. Krebstiere sind die mit Abstand grösste Gruppe stygobionter Arten, und in Europa mit über 1500 Arten vertreten. Davon entfallen etwas über 400 Arten auf die Grundwasserflohkrebse allein.

Neben stygobionten Arten finden sich vor allem in oberflächennahen Aquiferen auch eine Vielzahl an Arten, die eher mit Oberflächengewässern oder mit dem Leben in Böden assoziiert sind. Eine Studie in der Schweiz konnte beispielsweise sowohl Eintagsfliegen-, Steinfliegen-, Köcherfliegen-, Zweiflügler- sowie Käfer-Larven in Proben aus Quellwasserfassungen identifizieren (Schneider et al., 2023). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Grundwassersysteme sehr stark mit der Oberfläche vernetzt sind.

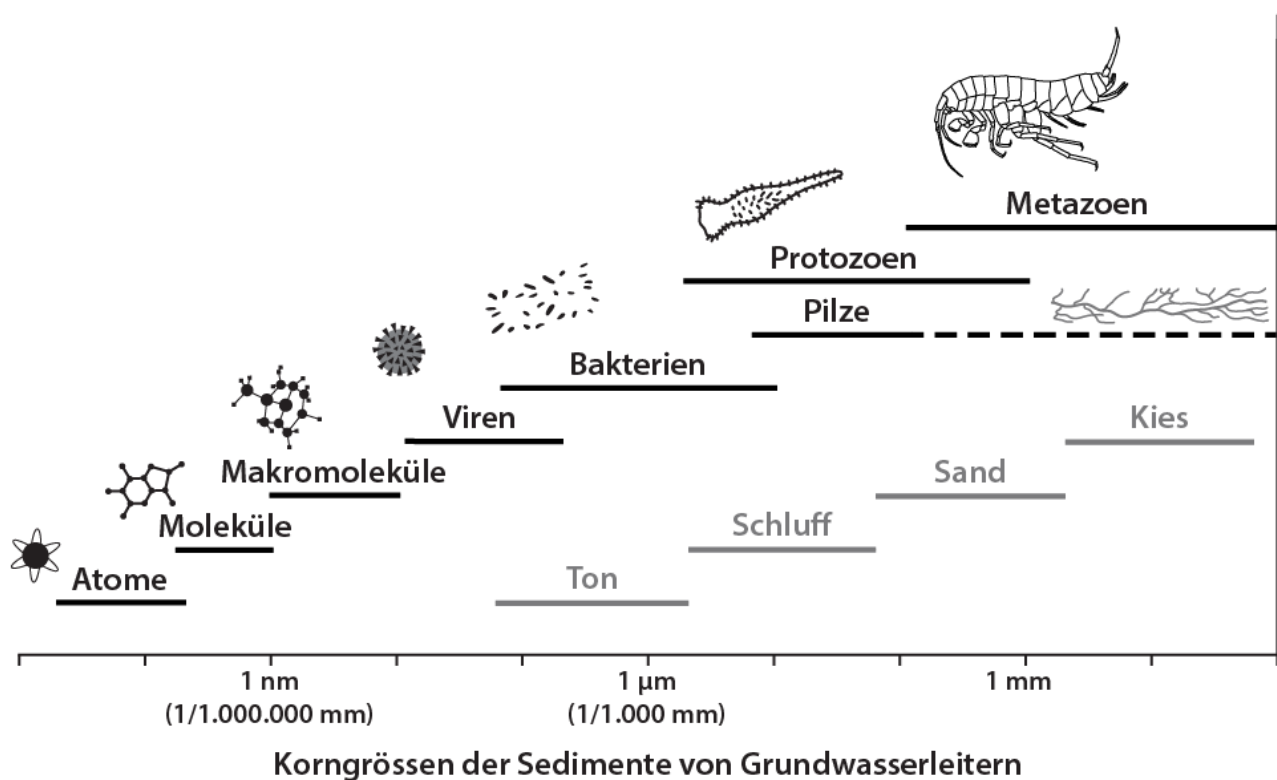


Abbildung 3: Grössenverteilung der Grundwasserlebewesen in Relation zu den Korngrössen. Abbildung adaptiert nach Arndt et al. (2005).

Tabelle 1: Artenzahlen der bisher bekannten stygobionten Grundwassermetazoen (Stand 2025). Die grosse Vielfalt der stygophilen Arten ist hier nicht aufgeführt. Sie macht für die Grundwasserbiodiversität jedoch einen signifikanten Anteil aus. Es wurden in dieser Tabelle die jeweiligen taxonomischen Bezeichnungen aus den Quellen übernommen, weshalb es zu einer Mischung unterschiedlicher taxonomischer Klassifizierungen kommt. Bei fehlenden Schätzwerten ist «NA» (not applicable) angegeben. Es gilt zu beachten, dass gewisse Zahlen mit grosser Vorsicht zu betrachten/vergleichen sind, da sie teilweise veraltet sind, und oftmals (z.B. bei Muschelkrebse in der Schweiz) auf mangelnder Forschung beruhen. Der Farbcode grau–gelb–grün gibt eine grobe Abschätzung über die Verlässlichkeit (grau: unverlässlich, veraltet und unterschätzt; gelb: in der Grössenordnung verlässlich, tendenziell unterschätzt; grün: verlässlich und/oder gut erforscht).

	Schweiz	Deutschland	Österreich *	Italien *	Frankreich	Europa
Krebstiere (Crustacea)		87				1570
Flohkrebse (Amphipoda)	40	22	7	12	45	438
Ruderfusskrebse (Copepoda)	24	36	19	36	59	251
Asseln (Isopoda)	3	4	3	2	28	108
Syncarida					10	
Brunnenkrebse (Bathynellacea)	2	8	NA	6	NA	106
Muschelkrebse (Ostracoda)	2	16	19	13	21	114
Weichtiere (Mollusca)						279
Schnecken (Gastropoda)	7	3	2	2	26	60
Muscheln (Bivalvia)	0	1	0	0	1	2
Würmer (im weiten Sinn)						
Fadenwürmer (Nematoda)	NA	NA	2	NA	NA	24
Plattwürmer (Plathelminthes)	1	NA	4	NA	8	NA
Ringelwürmer (Annelida)	6	17	3	16	21	70
Weitere Gruppen						
Milben (Acari)	0	20	4	7	31	130
Insekten (Insecta)	Praktisch keine stygobionten Arten, aber viele stygophile (z. B. EPT-Arten)				2	2
Wirbeltiere	0	1 **	0	0	0	2
Referenzen	2, 3, 10, 11, 15	1, 5, 8, 9, 11	7, 11	6, 11	4, 11, 12, 13	8, 14, 16

* Diese Daten sind räumlich begrenzt und nicht für das ganze Land repräsentativ. In diesen Ländern wird jedoch intensiv geforscht und aktualisierte Artenlisten sind wohl in den nächsten Jahren zu erwarten.

** Es gibt in Deutschland eine Population von höhlenbewohnenden Bachschmerlen.

1) Behrmann-Godel, J., Nolte, A. W., Kreiselmaier, J., Berka, R., & Freyhof, J. (2017). The first European cave fish. *Current Biology*, 27(7), R257–R258.

2) Bernasconi, R. (2010). Die Karstgebiete und die Höhlenfauna der Schweiz – Les karsts et la faune cavernicole de Suisse. *Stalactite*, 60(1), 53–71.

3) Chappuis, P. A. (1948). Remarques sur l'Aselle psammique *Proasellus walteri* (Chappuis, 1948) (Crustacea, Isopoda, Asellota). *Digital Commons @ USF*

4) Ferreira, D., Malard, F., Dole-Olivier, M.-J., & Castellarini, F. (2007). Obligate groundwater fauna of France: diversity patterns and conservation implications. *Biodiversity and Conservation*, 16(3), 567–596.

- 5) Fuchs, A., Hahn, H. J., & Cho, J.-L. (2012). *Parabathynella badenwuerttembergensis* N. SP., the First Record of Parabathynellidae Noodt, 1965 (Malacostraca: Bathynellacea) from Germany. *Journal of Crustacean Biology*, 32(4), 655–663.
- 6) Galassi, D. M. P. (2009). Groundwater biodiversity patterns in the Lessinian Massif of northern Italy. *Freshwater Biology*, 54(4), 830–847.
- 7) Griebler, C., Karwautz, C., Rasch, G., Fillinger, L., Veits, R., Junker, R., Gaviria-Melo, S., Fuchs, A., Scharhauser, F., Eisendle, U., & others. (2023). Inventory of a world hotspot of groundwater fauna biodiversity - the Lobau wetland and the Danube Floodplain National Park (Austria) revisited. *Acta ZooBot Austria*, 159, 21–65.
- 8) Griebler, C., & Mösslacher, F. (2003). *Grundwasser-Ökologie* (1. Aufl.). Facultas.
- 9) Groh, K., Bössneck, U., Clewing, C., Albrecht, C., & Richling, I. (2020). A new pill clam from an unusual habitat: the interstitial *Pisidium interstitialis* n. sp. (Bivalvia: Sphaeriidae) from southwestern and Central Germany. *Journal of Molluscan Studies*, 86(2), 104–109.
- 10) Knüsel, M. (2024a). Opening the Black Box: Biodiversity and Biogeography of Groundwater Amphipods in Switzerland. University of Zurich.
- 11) Mori, N. (2025). A Comprehensive Occurrence Dataset for European Ostracoda Inhabiting Groundwater and Groundwater-Dependent Ecosystems. *Global Ecology and Biogeography*.
- 12) Mouthon, J., Bertrand, A., & Audibert, C. (2021). A propos de la nouvelle espèce *Pisidium interstitialis* (Bivalvia: Sphaeriidae) et de sa présence en France. *Folia Conchyliologica*, 62, 3-8.
- 13) Robinson, C. (o. J.). Vorlesung zu Grundwasser und Interstitial. Arten inklusive Quellenarten.
- 14) Stoch, F., & Galassi, D. M. P. (2010). Stygobiotic crustacean species richness: A question of numbers, a matter of scale. *Hydrobiologia*, 653(1), 217–234.
- 15) Strinati, P. (1966): Faune cavernicole de la Suisse. Thèse doctorat Faculté des Sciences de Toulouse. Editions Centre National Recherche Scientifique. *Ann. de spéléologie*, 21(1), pp. 5-268
- 16) Zgamajster, M., Eme, D., Fišer, C., Galassi, D., Marmonier, P., Stoch, F., Cornu, J.-F., & Malard, F. (2014). Geographic variation in range size and beta diversity of groundwater crustaceans: Insights from habitats with low thermal seasonality. *Global Ecology and Biogeography*, 23(10), 1135–1145.

Funktionen der Grundwasserorganismen

Grundwasserorganismen erfüllen vielfältige ökologische Funktionen, die entscheidend für die Wasserqualität und Stabilität des Ökosystems sind. Mikroorganismen steuern zentrale biogeochemische Prozesse, reinigen das Wasser durch Abbau organischer Stoffe und Schadstoffe und tragen zur Umwandlung und Verfügbarkeit von Nährstoffen bei. Chemolithoautotrophe Bakterien sichern die Primärproduktion in der lichtlosen Umgebung und bilden die Basis der Nahrungskette. Makrofauna wie Invertebraten reguliert mikrobielle Gemeinschaften durch Beweidung, fördert den Stoffumsatz und verbessert durch Bioturbation die Porendurchlässigkeit und den Wasserfluss. Aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Umweltveränderungen eignen sich Grundwasserorganismen zudem potenziell als Bioindikatoren für die Bewertung der Grundwasserqualität.

Die mikrobielle Diversität wurde bisher sowohl global als auch regional in der Schweiz vor allem mit einem Fokus auf die Trinkwassernutzung untersucht. Aufgrund der Bedeutung als Trinkwasserreserven und der Humanpathogenität einiger Bakterien und Viren sind daher bestimmte mikrobielle Prozesse im Grundwasser relativ gut erforscht und beschrieben (Fillinger et al., 2023; Griebler et al., 2014a). Generell kann die vorherrschende Meinung verkürzt damit zusammengefasst werden, dass weniger Mikroben mit einer besseren Trinkwasserqualität einhergehen. Die mikrobielle Diversität erfüllt jedoch essenzielle Funktionen in Aquiferen und trägt zum Erhalt der Wasserqualität bei. Die mikrobiellen Gemeinschaften sind an die nährstoffarmen und sauerstofflimitierten Bedingungen im Grundwasser angepasst, was zu einer bemerkenswerten funktionellen Vielfalt geführt hat, die erst in den letzten Jahrzehnten durch moderne molekularbiologische Methoden erfasst werden konnte.

Mikrobielle Gemeinschaften im Grundwasser spielen eine wichtige Rolle in biogeochemischen Zyklen, wie dem Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- und Eisenkreislauf, sowie der Umwandlung und biologisch Verfügbarmachung von Mineralien (Fillinger et al., 2023). Dies ist besonders relevant, da beispielsweise die Funktion als Kohlenstoffsenke und die Umwandlung von organischen Kohlenstoffen massgeblich zur Reinigung des Grundwassers und damit zur Sicherung der Trinkwasserqualität beiträgt (Tufenkji et al., 2002). Die Chemolithoautotrophie einiger Bakterien spielt zudem eine bedeutende Rolle im trophischen Stoffkreislauf der Grundwasserbiozöten, indem sie, unter bestimmten Bedingungen und in Abwesenheit von photoautotrophen Organismen als primäre Energielieferanten dienen und einen wichtigen Ressourcenpool für heterotrophe Mikroorganismen und in weiterer Folge auch für Metazoen bilden (Hutchins et al., 2016).

Ausserdem haben die Stoffwechselwege von Mikroorganismen eine wichtige Rolle für den natürlichen Abbau von Pathogenen und anthropogenen Verschmutzungen. So wurde bereits in den achtziger Jahren gezeigt, dass viele aus Grundwasser isolierte Bakterienstämme das Wachstum des Fäkalbakteriums *Escherichia coli* hemmen (Hirsch & Rades-Rohkohl, 1983). Durch die Reduktion von organischem Kohlenstoff durch Grundwassermikroorganismen wird ausserdem das Wachstum von potenziell pathogenen Bakterienstämmen wie *E. coli* und *Vibrio cholerae* im Vergleich zu Oberflächengewässern stark gehemmt. Da viele dieser Prozesse auch temperaturabhängig sind, kann dies unter höher werdendem anthropogenem Druck von aussen (z. B. Klimawandel, erhöhte Temperaturen durch thermische Nutzung) zu immer grösseren Problemen führen (Griebler & Avramov, 2015). Neben den bekannten Stoffwechselwegen werden auch in regelmässigen Abständen neue und unbekannte Stoffwechselwege in Bakterien entdeckt. Dies ist hinsichtlich der Bioremediation von anthropogenen Einträgen im Grundwasser interessant. Es gibt mittlerweile Hinweise auf Stoffwechselwege und Enzyme, welche es Bakterien erlaubt, gewisse Pestizide, Polymere, PFAS und andere menschlich geschaffene potenziell umweltschädliche Substanzen zu zersetzen (Wackett & Robinson, 2020). Gerade im Grundwasser herrscht hier möglicherweise ein noch nicht ausgeschöpftes Potenzial an Stoffwechselwegen, welche zukünftig die Bioremediation von anthropogenen Einträgen im Aquifer verbessern können.

Auch Makroorganismen haben wichtige Funktionen. So spielt Beweidung durch Invertebraten im Grundwasser eine wichtige Rolle im Erhalt und in der Pflege der mikrobiellen Gemeinschaften (Mermillod-Blondin et al., 2023) und ebenfalls im Kohlenstoffkreislauf, wo das Fehlen von Makroorganismen den Kohlenstoffabbau negativ beeinflussen kann (Schmidt et al., 2025). Zudem deuten Studien darauf hin, dass die Grundwasserfauna möglicherweise eine Rolle im Abbau und Weitertransport von Pathogenen spielt (Boulton et al., 2008; Griebler & Avramov, 2015). Neben den direkten Interaktionen mit anderen Organismen wurde in Experimenten gezeigt, dass Invertebraten in porösen Grundwasserleitern durch ihre Bewegungen eine wichtige Rolle in der Erhaltung des Wasserdurchflusses im Grundwasserleiter einnehmen. Konkret wurde in einem Experiment von Hose and Stumpp (2019) gezeigt, dass Bioturbation durch Flohkrebse die Porendurchlässigkeit in Grundwassersystemen positiv beeinflusst und damit direkt zum Wasserfluss im Grundwasser beiträgt. Trotz dieser ersten Hinweise ist es jedoch weiterhin ungeklärt, was die Effektgrössen dieser Phänomene bei realistischen Populationsdichten im Grundwasser sind (Griebler & Avramov, 2015).

Die wohl interessanteste angewandte Funktion der Grundwasserorganismen ist ihre mögliche Nutzung als Bioindikatoren im Rahmen eines regulären Biomonitorings. Durch ihre Lebensdauer und dem Absolvieren des gesamten Lebenszyklus im Grundwasser sind sie der gesamten Stoffbreite und Umweltbedingungen im Grundwasser ausgesetzt. Die starke Spezialisierung vieler Arten auf konstante

abiotische Faktoren macht Grundwasserorganismen besonders empfindlich gegenüber Veränderungen in ihrem Lebensraum (Griebler et al., 2010; Korbel & Hose, 2011; Marmonier et al., 2013; Steube et al., 2009). Gerade im Bereich chronischer Exposition und Mischexposition stossen rein chemische Beurteilungen an Grenzen, da im Grundwasser ein sehr breites Spektrum unterschiedlichen Schadstoffen in meist geringen Konzentrationen charakteristisch ist. Eine Beurteilung rein anhand der chemischen Zusammensetzung ist deshalb unzureichend, weshalb auch in Oberflächengewässern Organismen (z. B. *Daphnia magna*, *Gammarus fossarum*, Diatomeen) aufgrund ihrer Sensitivität zur integrierten Beurteilung der Gewässerqualität (chronische Exposition bei geringen Konzentrationen, Mischexposition, Metabolite) umfangreich verwendet werden. Eine Verwendung von mikrobiellen und eukaryotischen Organismen im Grundwasser für die Beurteilung der Gewässergüte ist aus diesem Grund nicht nur angezeigt, sondern würde eins zu eins an die schon im Oberflächengewässer genutzte biologische Beurteilung anschliessen. Aufgrund der Erkenntnisgewinne und Entwicklung von Methoden zur Beurteilung und Erfassung der Biodiversität im Grundwasser–u.a. auch anhand von Forschungsprojekten an der Eawag in den letzten Jahren–ist eine solche Implementation absolut realistisch.

2.2 – Aktueller Wissensstand und Monitoring

Was ist der Stand des Wissens bzgl. Biodiversität im Grundwasser der Schweiz?

Sowohl in der Schweiz als auch international gewinnt die Grundwasserbiodiversität zunehmend an Aufmerksamkeit. Forschungsarbeiten der Eawag zeigen am Beispiel der Flohkrebse, dass ein fundiertes Wissen über relevante Taxagruppen innerhalb weniger Jahre aufgebaut werden kann. Zudem ermöglichen eDNA-Methoden, die Grundwasserökosysteme gesamtheitlicher (Mikro- und Makroorganismen) zu erfassen. Bisher fehlt in der Schweiz ein nationales Monitoring zum Zustand der Grundwasserbiodiversität.

Wie wird in den Nachbarländern der Schweiz und international die Grundwasserbiodiversität untersucht? Was ist dort der Stand der Dinge?

In mehreren Nachbarländern, sowie International, laufen aktuell Bemühungen und Forschungsarbeiten mit dem Ziel, die Grundwasserfauna besser zu verstehen und in Monitoringprogramme sowie Gewässerbeurteilungen integrieren zu können. Ein Vorzeigeprojekt findet in Baden-Württemberg statt, wo seit über 20 Jahren Monitoringdaten zur Grundwasserfauna erhoben werden. Dieser und weitere Ansätze könnten für die Entwicklung eines Monitorings in der Schweiz als Grundlage dienen. Die eDNA-Methodik ist für Grundwasser in der Praxis noch nicht etabliert (im Gegensatz zu

Oberflächengewässern). Erfahrung aus der Schweiz zeigen jedoch, dass diese aufgrund der hohen Versatilität einfach implementiert und standardisiert werden.

Rote Listen

Rote Listen sind zentrale Instrumente zum Schutz der Biodiversität, doch für Grundwasserorganismen fehlen sie in der Schweiz bislang weitgehend. Aktuell sind nur sehr wenige Schnecken-, Muschel- und Insektenarten mit gelegentlichem Vorkommen im Grundwasser erfasst, während obligate Grundwasserbewohner wie Flohkrebse oder Ruderfusskrebse fehlen. Für einzelne endemische Arten (*Stygepactophanes jurassicus*, *Gellyella monardi*) besteht bereits nationaler Schutzstatus. Dank neuer Forschungsarbeiten und genetischer Methoden (z. B. Barcoding) sind die Grundlagen für die Erstellung Roter Listen für ausgewählte Gruppen von Grundwasserorganismen (speziell Flohkrebse) innert den nächsten 2–3 Jahren vorhanden. Auch international – etwa in Frankreich und Deutschland – gibt es aktuell Bemühungen, Rote Listen für Grundwasserorganismen (z. B. Flohkrebse) zu erstellen. Die Etablierung von Roten Listen würde das Erfassen von Referenzdaten im Rahmen von standardisierten Monitoringprogrammen synergistisch ergänzen, so dass neben Gefährdungsstatus und Schutzprioritäten auch Aussagen zur Gewässergüte möglich sind.

Wissensstand Schweiz

Die Schweiz hat mit der Gewässerschutzverordnung (GSchV, 1998) Grundwasser explizit als Lebensraum definiert, der in einem naturnahen, standortgerechten und typischen Zustand für nicht oder nur schwach belastete Gewässer erhalten werden soll. Aktuell wird Grundwasser in der Schweiz auf quantitative und qualitative Parameter überprüft. Dafür werden im Rahmen der Nationalen Grundwasserbeobachtung NAQUA mit den Modulen TREND, SPEZ, QUANT und ISOT mehr als 600 Messstellen untersucht (BAFU, 2019b). Ein regelmässiges Monitoring der biologischen Komponente abseits mesophiler Keime und *E. coli* beschränkt sich bisher auf Methodensammlungen, Pilotstudien zur Machbarkeit oder wissenschaftlichen Studien (Hunkeler et al., 2006; Pronk et al., 2010). Für einige Artgruppen ist inzwischen eine gute Wissensgrundlage über die Diversität im Grundwasser vorhanden.

Um die Diversität von Mikroorganismen zu untersuchen, wurden in den Jahren 2009 und 2010 erstmals 50 Messstellen aus dem Modul NAQUA TREND und neun potenziell belastete Messstellen des Moduls SPEZ mindestens einmal beprobt (Pronk et al., 2010). Das Ziel war dabei herauszufinden, ob es Indikatorbakterien gibt, wie stark die Belastung mit Fäkalien assoziierten Bakterien ausfällt und welche weiteren mikrobiologischen Parameter relevant für die Grundwasserqualität sind. Dazu wurden an den

repräsentativ ausgewählten Messstellen Wasserproben zusammen mit Proben zum chemischen Monitoring entnommen. Dafür wurde im Fall von Förderbrunnen zuerst die 3-fache Wassermenge herausgepumpt, bevor mit sterilen Gefässen Wasserproben entnommen wurden. In Quellwasserfassungen mit offenen Wasserfassungen wurde die Probe direkt aus dem offenen Gerinne entnommen. Für die weitere Analyse bedienten sich die Studienautoren dabei klassischer Analysemethoden für Mikroorganismen (z. B. Durchflussszytometrie) sowie einfachen qualitativen genetischen Analysen auf humanpathogene Erreger. Dabei wurden in 42 der 59 Messstellen Fäkalien-assoziierte Mikroorganismen nachgewiesen, wobei pathogene Bakterien generell selten waren. Neben diesen Mikroorganismen wurde auch eine Vielzahl bakterieller Zellen, viraler Bestandteile und sehr selten auch Protozoen (z. B. *Giardia* sp.) nachgewiesen. Zusammengefasst kamen die Autoren zum Schluss, dass es in Lockergesteins-Aquiferen allgemein eine gute Grundwasserqualität gab, während in Karstgebieten eine Vielzahl der Proben mit Fäkalkeimen verunreinigt war. Diese Studie war vielversprechend, wurde aber nicht in das reguläre NAQUA Monitoringprogramm übernommen (BAFU 2019). Weiter wurde festgestellt, dass für ein regelmässiges Monitoring ein Referenzzustand der Biodiversität als Referenzzustand des Aquifers wichtig ist und die Festlegung dieses Referenzzustandes Priorität haben sollte. Ein Referenzzustand ist bis heute weder für die Mikroorganismen noch für die Makrofauna definiert worden. Für einzelne Artgruppen wie die Grundwasserflohkrebse wäre die Datengrundlage inzwischen vorhanden. Für den Grossteil der Diversität muss der Referenzzustand aber noch erhoben werden.

In der Schweiz gab es bereits 1966 mit der Doktorarbeit «Faune cavernicole de la Suisse.» von P. Strinati eine erste systematische Zusammenfassung des Wissenstandes über die Schweizer Höhlenfauna. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits Höhlengewässer-bewohnende Makroinvertebraten gelistet. Weiter wurde im Jahr 1984 im Karst des Schweizer Jura die Art *Stygepactophanes jurassicus* (Moeschler & Rouch 1984) und im Jahr 1988 in der Areuseschlucht die Art *Gelhyella monardi* (Moeschler & Rouch 1988) erstmals beschrieben. Beide Ruderfusskrebs-Arten sind insofern relevant, da sie in der Schweiz aktuell die einzigen Grundwasserarten sind, welche als Endemiten und somit als national prioritäre Arten gelistet werden. In den späten 1990er Jahren wurden detaillierte Studien über Makroinvertebraten in Interstitiallebensräumen durchgeführt und die Bedeutung der Nährstoffverfügbarkeit für diese Ökosysteme aufgezeigt (Brunke & Gonser, 1999). Erstmals systematisch wurde die Metazoen-Diversität im Grundwasser 2013 in einer Pilotstudie an acht NAQUA-Messstellen (Quellen und Quellfassungen) untersucht. Dabei fand das Team eine hohe Zahl an Organismen (40 Arten, bis zu 10 Tiere pro Kubikmeter, Magazin Umwelt 2015, S.49ff). Darauf folgend gab es 2014 eine Studie mit einem Schwerpunkt auf der Verbreitung von Flohkrebse, bei der auch ein erstes Inventar der Grundwasserflohkrebse erstellt wurde (Altermatt et al., 2014). Dabei wurden neun Arten innerhalb der Gattung *Niphargus* gefunden und deren Verbreitung beschrieben. Im weiteren Verlauf wurden diese Projekte auch unter Mithilfe des BAFU intensiviert und es gibt dadurch

erste schweizweite Verbreitungskarten für einige Grundwasserorganismen. Darauf aufbauend wurden Citizen-Science Projekte durchgeführt, zuerst gemeinsam mit Höhlenforschern im Hölloch, danach mit Brunnenmeistern in Quellwasserfassungen. Damit konnten sowohl die Artenzahlen und Verbreitung von Flohkrebse (Alther et al., 2021; Knüsel, 2024a; Studer, 2022) als auch ein erster Überblick über weitere Makroinvertebraten im Grundwasser gewonnen werden (Schneider et al., 2023). Die Mehrheit der obligaten Grundwasserarten der Schweiz stammt aus der Gruppe der Flohkrebse (*Niphargus* sp.), der Hüpferlinge, sowie der Asseln (Asellidae, cf. *Proasellus*), wobei bisher methodisch bedingt vor allem die Flohkrebse und Asseln gut dokumentiert sind.

Durch die Intensivierung der Beprobung konnte innerhalb weniger Jahre eine weitgehend vollständige Artenliste der Flohkrebse erstellt werden, sodass nur noch wenige, sehr seltene oder klein verbreitete Arten zu erwarten sind. Dadurch zählen die Grundwasserflohkrebse der Gattung *Niphargus* inzwischen zu den am besten dokumentierten stygobionten Arten der Schweiz. Bisher sind über 40 Arten bekannt, was die 19 Flohkrebsearten in Oberflächengewässern bei weitem übertrifft (Knüsel, 2024a). Mindestens ein Dutzend dieser Arten sind potenziell endemisch, einige Arten bisher unbeschrieben, oder nur von wenigen Probenstellen bekannt (Knüsel et al., 2023; Knüsel, 2024a; Knüsel et al., 2024b; Knüsel et al., 2024c). In einem gross angelegten Projekt, bei dem rund 900 Messstellen besammelt wurden, wurden von allen gefundenen Flohkrebsearten rund die Hälfte nur an 1–3 Messstellen nachgewiesen, was auf eine sehr kleinräumige Verbreitung vieler Arten hinweist (Knüsel et al., 2024c). Zusätzlich wurden mit dem vermehrten Einsatz molekularer Barcoding-Techniken einige kryptische Arten (Arten, die morphologisch bisher in einer Art zusammengefasst wurden, jedoch genetisch eindeutig getrennt sind) nachgewiesen, wie zum Beispiel im *Niphargus rhenorhodanensis* Komplex (Delić et al., 2025). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Schweiz eine einzigartige unterirdische Fauna besitzt, die von den eiszeitlichen Bedingungen beeinflusst wurde, und deren aktueller Zustand nur bedingt dokumentiert ist. Besonders erwähnenswert sind die Vorkommen von *Niphargus*-Arten, die weltweit nur an einem oder ganz wenigen Orten in der Schweiz bekannt sind. Diese sogenannten endemischen Arten (z. B. *Niphargus murimali*, *N. muotae*) sind weltweit einzigartig, und die gesamte Verantwortung für ihren langfristigen Erhalt liegt in der Schweiz. (Knüsel et al., 2024b).

Neben Studien, die auf konventionellen Methoden basieren, gibt es in der Schweiz bereits Studien zur Anwendung von Umwelt-DNA Methoden zur Identifikation von Biodiversität im Grundwasser. Diese Studien beweisen das grosse Potenzial dieser modernen Methodik für schwer zugängliche Ökosysteme und liefern erste Hinweise darauf, dass die Diversität im Schweizer Grundwasser höher ist als bisher angenommen (Couton et al., 2023a, b). An den 20 untersuchten Standorten wurden mit diesem Ansatz 4917 Sequenzvarianten (ASV) identifiziert, verteilt auf fünf eukaryotische Reiche und elf

Metazoenstämme, von denen bisher 752 (15,3 %) einem Taxon zugeordnet werden konnten. 89 ASVs (1,8 %) konnten bis auf Artniveau bestimmt werden. Dieser tiefe Wert deutet auf eine bislang weitgehend untererfasste Vielfalt im Grundwasser hin. Aufgrund der Methode (Vergleich der Sequenzen mit zukünftig immer besser werdenden Datenbanken) können diese Daten aber auch in Zukunft umfassend und besser aufgelöst analysiert werden. Zudem sind für die Beurteilung der Gewässergüte nicht unbedingt eine taxonomische Auflösung der mikrobiellen Diversität erforderlich, und können direkt aus sogenannten «taxonomy-free approaches» abgeleitet werden.

Trotz dieser intensiven Bemühungen fehlten jedoch bislang sowohl Informationen darüber wie typische Grundwassergemeinschaften aussehen, als auch die passenden Methoden, wie zum Beispiel eDNA basierte Methoden, diese effizient zu erfassen. Für Ersteres wurden mit den Projekten zu den Grundwasserflohkrebsen und Mikrobiologie bereits grosse Schritte in diese Richtung unternommen, dennoch fehlen noch räumlich und zeitlich stärker aufgelöste Daten zur Grundwasserdiversität, auch über weitere taxonomische Gruppen hinweg. Zweiteres kann mittlerweile als gelöst betrachtet werden da sowohl konventionelle als auch molekulare Methoden mehrfach erfolgreich im Grundwasser eingesetzt wurden. Der nächste Schritt ist nun klar, diese etablierten Methoden einzusetzen, um die noch vorhandenen Lücken in Bezug auf die Grundwasserbiodiversität zu schliessen, und dabei, wie in der Gewässerschutzverordnung (GSchV, 1998) gefordert, Schweizer Grundwassergemeinschaften welche «naturnah, standortgerecht und typisch für nicht oder nur schwach belastete Gewässer» sind festzulegen.

Wissensstand Nachbarländer und internationale Situation

Grundlage für den Schutz und das Monitoring sind EU-weit geltenden Richtlinien wie die Wasserrahmenrichtlinie (Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union, 2000) oder die EG-Grundwasserrichtlinie (2006/118/EG, Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union, 2006). Diese definieren das Ziel des «guten Zustands» bisher hauptsächlich/ausschliesslich auf chemisch-physikalische sowie quantitative Parameter, es werden aber vermehrt Bestrebungen und Grundlagen entwickelt, um dies auf die Biodiversität auszuweiten (v.a. Länderspezifische Ansätze, siehe unten). Die Flora Fauna Habitat (FFH)-Richtlinie der Europäischen Union nennt den Olm (*Proteus anguinus*), der in Anhang II und IV genannt wird als schützenswerte Art des Grundwassers (Hudoklin, 2016). Internationale Abkommen wie die Ramsar-Konvention oder das Netzwerk Natura 2000 als wichtige Instrumente zum Schutz von Arten und Lebensräumen klammern Grundwassersysteme weitgehend aus. Initiativen zum Schutz und Monitoring der Grundwasserbiodiversität werden auf Europäischer Ebene gefordert (Di Lorenzo et al., 2024), und komplementieren diesbezügliche Anstrengungen auf der Ebene einzelner Länder.

Nationale Programme

Österreich: Österreich verfügt über ein sehr stark ausgebautes Grundwassermonitoringnetzwerk. Gesetzlich basiert das aktuelle Monitoring auf der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL), wobei das Umweltbundesamt die Umsetzung koordinativ begleitet und die Bundesländer das Monitoring durchführen. Insgesamt werden im Rahmen der Gewässerzustandsüberwachungsverordnung (GZÜV) ca. 2000 Grundwassermessstellen bis zu 4-mal jährlich beprobt. Dabei werden vor allem chemisch-physikalische Parameter erhoben, die Grundwasserbiodiversität spielt im regelmässigen Monitoring keine Rolle. Alle erfassten Daten werden dabei online zur Verfügung gestellt (<https://www.umweltbundesamt.at/dashboard-grundwasser>, <https://ehyd.gv.at/>).

Obwohl es kein reguläres Biodiversitätsmonitoring gibt, gibt es vor allem rund um die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Griebler an der Universität Wien einen starken Forschungsfokus rund um das Thema «Leben im Grundwasser». Diese Gruppe hat in den Jahren 2019 und 2020 unter anderem die 2000 Monitoringstellen der GZÜVZ zwei- bis viermal jährlich auf mikrobielle Biodiversität (Zellzahl) hin untersucht, diese Ergebnisse werden aktuell in einer Publikation aufbereitet und sind noch nicht öffentlich zugänglich (Christian Griebler, persönliche Kommunikation). Daneben digitalisiert die Gruppe alle Daten bezüglich Grundwasserfauna, welche in Publikationen, Berichten oder anderen Datenquellen vorliegt, um eine einheitliche Datenbank zur Grundwasserfauna in Österreich zu erstellen (Stygofauna Austriaca). Für ein zukünftiges Monitoring in der Schweiz besteht hier Vernetzungspotenzial mit dem österreichischen Umweltbundesamt und der Arbeitsgruppe rund um Prof. Dr. Christian Griebler.

Deutschland: In Deutschland wird die Biodiversität des Grundwassers zunehmend in den Fokus von Forschung und Umweltpolitik gerückt. Das Bundesland Baden-Württemberg startete 2002 ein Monitoring für Grundwasserfauna an ~340 Messstellen, welches 2006 evaluiert wurde und in ein freiwilliges Monitoring der Grundwasserbiodiversität an 41 Standorten mündete (LUBW, 2025). Dieses Langzeitmonitoring wird durch das Institut für Grundwasserökologie IGÖ GmbH durchgeführt und erfasste in diesem Zeitraum insgesamt 17.285 mehrzellige, aquatische Organismen, die 126 verschiedenen Taxa (darunter 117 Arten) zugeordnet werden konnten. Mit 16 Messstellen aus diesem Datensatz wurde ausserdem in einer wissenschaftlichen Studie gezeigt, dass die Artenzusammensetzungen und Abundanzen von vorkommenden stygobionten Arten über mehrere Jahre konstant war, aber es in 7 Messstellen zu starken Schwankungen der Abundanzen und der Artenzusammensetzung in Relation zu Oberflächenprozessen (z. B. Versiegelung und Bautätigkeiten) kam (Koch, Blum, Stein, et al., 2024).

Weiter wurde 2014 ein vom Umweltbundesamt (UBA) initiiertes Projekt zum Monitoring der Grundwasserbiodiversität und der Nutzung von biologischen Indikatoren durchgeführt (Griebler, et al.,

2014). Dabei wurden zwischen 2007 und 2009 über 1000 Grundwassermessstellen in verschiedenen Regionen Deutschlands konventionell beprobt. Ziel war dabei ein erstes Konzept für ein ökologisch orientiertes Bewertungssystem für Grundwasserökosysteme. Es wurde speziell Rücksicht genommen, möglichst viele Grundwasserleiter und verschiedene ökologische Einheiten unter möglichst geringen anthropogenen Einflüssen zu erfassen, auch um einen Referenzzustand eines «guten» Zustands zu erhalten. Im Rahmen dieses Projektes wurden etwa 50 physikalisch-chemische, mikrobiologische sowie faunistische Messgrößen untersucht, von denen etwa die Hälfte das Potenzial zeigte, den ökologischen Zustand anzuzeigen. Es zeigte sich, dass eine integrierende Kenngröße aus allen Parametern «sehr tauglich» war, um Oberflächeneinflüsse auf das Grundwasser anzuzeigen. Faunistisch waren dabei vor allem das Verhältnis der stygobionten zu nicht stygobionten Arten und die Anzahl von Oligochaeten gute Indikatoren für den Zustand des Grundwasserökosystems. Die Autoren entwickelten so einen Indikator, der unbelastete Grundgewässer durch einen Anteil von >50 % stygobionter Arten, >75 % Krebstiere und weniger als 20 % Anteil an Oligochaeten charakterisiert. Zusätzlich zeigten sich mikrobielle Indikatoren wie die Gesamtzellzahlen (organische Belastung), Shannon-Diversität, assimilierbarer organischer Sauerstoff (AOC) sowie die aktive mikrobielle Biomasse (ATP) als wertvoll, vor allem in Systemen mit geringen Sauerstoffkonzentrationen. Aufgrund dieser Arbeit schlagen die Autoren ein zweistufiges Modell (ähnlich dem australischen GWHI) vor, das ähnlich den Oberflächengewässern eine Bewertung basierend auf Indikatorgrößen zulässt. Dieses System wurde jedoch bisher nicht in ein regelmässiges Monitoring übernommen.

Aufbauend auf den Erfahrungen der UBA-Studie 2014 wurde der **Biomasse-Aktivität-Energie** (B-A-E) Index zur Klassifizierung des mikrobiellen Zustands des Grundwassers entwickelt (Griebler et al., 2018). Hierbei wird für die Bewertung des Grundwassers die mikrobielle Biomasse (Zellzahl), die Aktivität im System (ATP-Gehalt) sowie die Energieverfügbarkeit in Form von assimilierbarem organischem Kohlenstoff zur Erstellung eines mikrobiologischen Fingerabdrucks verwendet. Die Autoren konnten dabei aufzeigen, dass eine Indexgröße aus diesen drei Parametern ausreicht, um den mikrobiologischen und ökologischen Zustand im Grundwasser zu bewerten, sowie zur Klassifizierung in verschiedene Gewässergüteklassen dienen kann.

Daneben gibt es mit dem Projekt gwTriade (<https://www.gwtriade.de/de/>), das darauf abzielt, prioritäre Grundwasserschadstoffe zu identifizieren und geeignete Testverfahren zur Bewertung ihrer Auswirkungen auf die Grundwasserbiodiversität zu entwickeln. Dazu wird ein integriertes Bewertungskonzept auf Basis des Triade-Ansatzes angewendet, das ökologische, chemische und ökotoxikologische Daten mit gesellschaftlichen Zielvorstellungen zum Grundwasserschutz kombiniert. Ein interdisziplinäres

Konsortium aus Expertinnen und Experten verschiedener Fachrichtungen arbeitet gemeinsam an praxisnahen Handlungsempfehlungen für Anwender und Entscheidungsträger.

Frankreich: Frankreich verfügt über ein nationales Grundwasserüberwachungsprogramm, das den Vorgaben der WRRL folgt und bisher wenig Fokus auf biologische Aspekte legt. Ausnahmen gibt es in Form von Pilotprojekten wie dem Projekt BIODIVEAU des französischen geologischen Dienstes BRGM, welches die mikrobielle Biodiversität in Aquiferen untersucht. Ziel ist es, mikrobiologische Signaturen als Indikatoren für den Zustand von Grundwasserquellen zu etablieren (BRGM, 2023).

Italien: In Italien wurde 2013 das Projekt AQUALIFE (LIFE12 BIO/IT/000231) ins Leben gerufen, in dem Indikatorsysteme für die Biodiversität in grundwasserabhängigen Ökosystemen entwickelt wurden und in einer Software für Indikatorbewertungen mündeten (Strona et al., 2019). Ausserdem wurde 2024 an der Universität Bologna gemeinsam mit den süditalienischen Behörden ein Projekt zur Verbesserung des Monitorings von Aquädukten und unterirdischen Quellen in Süditalien gestartet. Ziel ist es, ein Netzwerk zur Überwachung von Trinkwasser- und natürlichen Quellen aufzubauen (Università di Bologna, 2024). Im Apennin, genauer im Gran Sasso-Sirente-Aquifer, wurde ein biologisches Frühwarnsystem entwickelt, das auf der Überwachung von Mikroorganismen basiert, um die Wasserqualität in Echtzeit zu bewerten (Di Giacinto et al., 2021).

Vereinigtes Königreich (UK): Die britische Umweltbehörde Defra veröffentlichte 2018 ihren 25-Jahres-Umweltplan mit dem Ziel, die Umwelt innerhalb einer Generation zu verbessern. Ein Schwerpunkt liegt auf der Verbesserung der Wasserqualität und dem Schutz bedrohter Arten – auch in Grundwasserökosystemen. Dazu wurde das Programm «Natural Capital Ecosystem Assessment (NCEA)» ins Leben gerufen, das langfristige Daten zu Zustand und Veränderungen von Ökosystemen in England erhebt. Erstmals rückt damit auch das Grundwasser in den Fokus. Seit März 2024 wurden in Südengland 55 Standorte beprobt, 2025 soll das Netzwerk auf 80 Standorte landesweit ausgebaut werden. Die Mitarbeitenden wurden in Probenahme und Artenbestimmung passend ausgebildet. Erste Ergebnisse zu Artenvielfalt und Verbreitung werden noch 2025 erwartet, sind jedoch noch nicht öffentlich zugänglich (Johns, 2024). Zudem wird der Einsatz von eDNA-Technologie zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften geprüft.

Australien: Im internationalen Vergleich nimmt Australien eine Vorreiterrolle ein. Bereits 2002 wurde im Bundesstaat New South Wales erstmals ein gesetzlicher Rahmen für den Schutz und das Monitoring von «groundwater-dependent ecosystems (GDEs)» eingeführt. Diese Richtlinien wurden 2006 auf nationaler Ebene teilweise übernommen. Mit dem Groundwater Health Index, entwickelt von Korbel & Hose (2011), wurde dort ein zweistufiges Indikatorsystem geschaffen, welches sowohl abiotische als auch

biotische Faktoren integriert und Referenzzustände für Aquifere (hinsichtlich «Grundwassergesundheit») definiert. Ziel der Autoren war ein System, mit dem der Einfluss von Bewässerung in der Landwirtschaft auf den Grundwasserspiegel (z. B. durch erhöhte Oberflächeneinträge) messbar wird. Dieses System wurde nach Kritik an der begrenzten Aussagekraft der Referenzzustände weiter verfeinert und 2017 als «weighted groundwater health index» (WGHI) vorgestellt (Korbel & Hose, 2017). Der zweistufige Prozess sieht in der ersten Stufe die Evaluierung genereller Indikatoren, wie zum Beispiel DOC, Vorkommen von stygoxenen Arten, der Anzahl von Krebstieren und Oligochäten oder Pestizidkonzentrationen, vor. In der zweiten Stufe werden dann lokale Faktoren miteinbezogen, wie mikrobielle Diversität, Wasserqualität oder ob Stygofauna vorkommt. Der gewichtete Ansatz ergänzt diese Richtlinie um bessere lokale Indikatoren für den menschlichen Einfluss, was eine genauere Unterscheidung zwischen natürlicher Varianz und tatsächlichem menschlichen Einfluss zulässt. Obwohl diese Richtlinie existiert, wird in Australien die Grundwasserbiodiversität nur regional begrenzt regelmässig untersucht.

Internationale Programme

International gibt es bereits einige Initiativen zur systematischen Erfassung der Grundwasserfauna. Das älteste Projekt ist dabei Stygofauna Mundi (Botosaneanu, 1986), ein internationales Biodiversitätsprojekt, welches 1986 in Amsterdam gestartet wurde, und das seitdem zu einer umfassenden, frei zugänglichen Datenbank zur weltweiten Verbreitung und Vielfalt der Grundwasserfauna ausgebaut wird (Martinez et al., 2024). Es basiert auf über 11'000 Quellen und enthält mehr als 388'000 Einträge zu über 31'000 Tierarten aus unterirdischen Lebensräumen wie Quellen, Höhlen, Brunnen oder interstitiellen Zonen. Die Datenbank integriert biologische, geographische und geologische Informationen und ist mit offenen globalen Datensystemen vernetzt. Ziel ist es, Forschungslücken zu erkennen, die Grundlagen für Schutzstrategien zu schaffen und ein besseres Verständnis der ökologischen Bedeutung unterirdischer aquatischer Systeme zu ermöglichen.

Ein erstes Projekt, welches sich der Standardisierung der Probenahme widmete, war PASCALIS (Protocol for the Assessment and Conservation of Aquatic Life In the Subsurface), ein europäisches Forschungsprojekt (2002–2004) welches erstmals eine standardisierte Erhebung der Grundwasserbiodiversität in Westeuropa ermöglichte (Gibert et al., 2009). Das Projektteam hatte das Ziel, die biologische Vielfalt in unterirdischen Lebensräumen wie Karstsystemen, Poren- und Kluftaquiferen systematisch zu erfassen und vergleichbar zu machen. In sechs ausgewählten europäischen Regionen wurden standardisierte Probenahmeprotokolle angewendet, ergänzt durch geologische und hydrologische Standortinformationen. Zum Einsatz kamen speziell entwickelte Netz- und Pumpmethoden zur Probenahme aus Brunnen und Quellen, kombiniert mit taxonomischer Analyse im Labor. Die erhobenen Daten aus mehr als 4000 Probenstellen lieferten neue Erkenntnisse zur Artenvielfalt stygobionter

Organismen und führten in vielen Gebieten zu einer deutlichen Erweiterung der bekannten Biodiversität, sowie eine methodische Grundlage zur Erhebung ebendieser. Die Ergebnisse wurden in einer zentralen Datenbank dokumentiert und bilden bis heute eine wichtige Grundlage für ökologische Bewertung und Schutzstrategien (Deharveng et al., 2009).

Das EU-finanzierte und 2023 gestartete Projekt DarCo (Diversity and Resilience of Subterranean Communities) zielt darauf ab, Strategien zu entwickeln, um unterirdische Ökosysteme in Biodiversitäts- und Klimaschutzagenden nach 2020 zu integrieren. Acht europäische Länder, darunter die Schweiz mit der Universität Zürich unter der Leitung von Prof. Dr. Florian Altermatt, sind beteiligt.

Ein weiteres internationales Projekt ist das 2025 gestartete GReG (Global Research on eDNA in Groundwaters, Saccò et al., 2025). Dieses internationale Konsortium unter der Leitung von Mattia Saccò, Kathryn Korbel und Michelle Guzik legt den Fokus auf die Anwendung von Umwelt-DNA (eDNA) zur Erfassung der Grundwasserbiodiversität und einer etwaigen Integration in Monitoringprogramme. Ziel ist es dabei, internationale Standards für die Anwendung von eDNA zu erarbeiten, eine erste globale Übersicht über Stygofauna zu erhalten (mithilfe eines Crowd-Sourced eDNA-Projekts) sowie den aktuellen Stand des Wissens zu erfassen. Auch hier beteiligt sich die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Florian Altermatt an der Sammlung von eDNA-Daten für das Crowd-Source Projekt und entwickelt die Methode weiter.

Rote Listen - Arteninventare

Rote Listen Messstellen ein zentrales rechtliches Instrument dar, um den Zustand der biologischen Vielfalt zu bewerten, Risiken zu erkennen und naturschutzfachliche Prioritäten zu setzen. In der Schweiz werden diese Listen vom Bundesamt für Umwelt in Auftrag gegeben und dienen der Interessenabwägung gemäss dem Bundesgesetz über Natur- und Heimatschutz, der Abgrenzung prioritärer Arten sowie der Identifikation von wichtigen Lebensräumen auf nationaler Ebene.

Für die Schweiz gibt es bisher keine Rote Liste für Grundwasserorganismen allgemein, respektive auch nicht für einzelne Organismengruppen mit einem Hauptvorkommen im Grundwasser (z. B. Flohkrebse); nur wenige Arten aus den Gruppen der Weichtiere und der Eintags-, Stein- und Köcherfliegen sind auf Roten Listen aufgeführt und teilweise im Grundwasser zu finden. Bei den Weichtieren sind aus den Gattungen der Quell- und Brunnenschnecken (*Bythinella* spp. und *Bythiospeum* spp.) zwei, respektive fünf Arten von der Roten Liste erfasst (Rüetschi et al., 2012), die im Grundwasser respektive in Quelllebensräumen vorkommen. All diese sieben Arten weisen eine erhöhte Gefährdung (NT od. VU) auf. Bei den Gruppen Eintags-, Stein- und Köcherfliegen gibt es einige Arten, die teilweise im Grundwasser vorkommen und die auf der Roten Liste der EPT-Arten (Lubini et al., 2012) aufgeführt sind.

Letztere kommen jedoch nicht obligat im Grundwasser vor, und die im Grundwasser gefundenen Larven müssen eher als sporadische Nachweise ohne direkte Klassifizierbarkeit für die Roten Listen betrachtet werden. Zwei stygobionte Arten, *Stygepactophanes jurassicus* und *Gellyella monardi*, sind als Endemiten auf der Liste prioritäre nationaler Arten gelistet (Moeschler & Rouch, 1984, 1988).

Besonders geeignet für Rote Listen sind Artgruppen mit hohen bis sehr hohen Anteilen an Grundwasserorganismen (beispielsweise Flohkrebse oder Ruderfusskrebse). Bei den Flohkrebse (mindestens 40 Grundwasser bewohnende Arten der Gattungen *Niphargus* und *Crangonyx*) sind durch Forschungsarbeiten (v.a. in der Arbeitsgruppe von Prof. Florian Altermatt) in den letzten zehn Jahren genügend Grundlagen erarbeitet worden, dass eine Etablierung von Roten Listen für die Schweiz in den nächsten 2–4 Jahren realistisch und umsetzbar ist.

International/in Europa gibt es aktuell keine dezidierten Rote-Listen für Grundwasserorganismen, einzelne stygobionte Arten werden jedoch auf allgemeinen Listen passend zur taxonomischen Klassifikation geführt. Es werden jedoch 10 Arten aus der Gattung *Niphargus* auf der globalen IUCN Red-List geführt, wobei die meisten als Data-deficient gelten und somit keine echte Einstufung des Gefährdungszustandes haben. In einzelnen Ländern gibt es Bemühungen, Rote Listen und Artinventare zu erstellen, vor allem mit dem Schwerpunkt Grundwasserflohkrebse. Frankreich hat beispielsweise seit 2012 eine Rote Liste der Krebstiere, auf der sechs *Niphargus*-Arten als potenziell bedroht eingestuft werden (Allanic, 2012). In Deutschland gibt es erste Listen aus Bayern (Burmeister, 2003) sowie neuere Bemühungen zur Erfassung der Grundwasserkrebstiere im Saarland (Weber & Flot, 2020). Die Liste im Saarland umfasst neun Arten innerhalb der Gattung *Niphargus*, von denen drei als bestandsgefährdet, drei als potenziell ausgestorben oder bestandsgefährdet und drei weitere als selten eingestuft werden. Dank dem Einsatz von COI und 28s rRNA Barcoding Methoden konnten auch fünf potenziell kryptische Arten im Artkomplex *Niphargus aquilex* nachgewiesen und als abgetrennte Einheit in die Liste aufgenommen werden.

2.3 – Biodiversität und anthropogene Einflüsse

Die Landnutzung an der Oberfläche beeinflusst nicht nur die chemische Qualität, sondern auch die biologische Vielfalt im Grundwasser. Während der planerische Grundwasserschutz in der Schweiz darauf ausgerichtet ist, das für die Trinkwasserversorgung genutzte Grundwasser vor unmittelbarer Verschmutzung zu schützen, berücksichtigt er die Lebensgemeinschaften im Grundwasser bislang kaum. Studien zeigen jedoch klare Zusammenhänge: In Karstgebieten treten häufiger fäkalassoziierte Mikroorganismen auf und die Artenvielfalt ist in landwirtschaftlich geprägten Aquiferen geringer als in bewaldeten. Besonders die Stygofauna (z. B. Flohkrebse der Gattung *Niphargus*) reagiert empfindlich auf die Landnutzung und könnte als Indikator für den ökologischen Zustand von Aquiferen dienen.

Trotz flächendeckender Forschungsprojekte in der Schweiz (Amphiwell) und ersten Monitoringprogrammen im Ausland fehlen hierzulande weiterhin die Referenzzustände und längerfristige Zeitreihen. Offene Fragen betreffen unter anderem die Reichweite oberflächlicher Einflüsse, zeitliche Schwankungen der Artenvielfalt und die funktionelle Bedeutung der Organismen. Ein systematisches, langfristiges Monitoring ist daher entscheidend, um die Rolle der Biodiversität im Grundwasserschutz besser zu verstehen.

In Gewässern an der Oberfläche hat die umliegende Landnutzung einen direkten und starken Einfluss auf Gewässerqualität und Biodiversität (z. B. Haberthür & Alvarez-Troncoso 2025, Wüthrich 2021). Ähnliche Zusammenhänge zwischen der oberflächlichen Landnutzung und der chemischen Qualität des Grundwassers sind schon bekannt (Di Lorenzo et al., 2014). Dabei wird vermutet, dass Grundwassersysteme besonders verletzlich auf Umweltveränderungen reagieren, auch wegen der Anpassung von Grundwasserorganismen an sehr konstante Umweltbedingungen, deren eingeschränkten Ausbreitungspotenzials und deren langsamen Stoffwechsels.

In wissenschaftlichen Projekten der Eawag, insbesondere dem vom BAFU mitfinanzierten Projekt Amphiwell (<https://www.amphipod.ch/de/amphiwell/>), wurden mithilfe eines Citizen-Science-Ansatzes (Einbezug der Brunnenmeister) zunächst über 900 Quelfassungen über die ganze Schweiz verteilt konventionell und mittels eDNA untersucht (Alther et al., 2021, Knüsel 2024a, Couton et al., 2023a). Analysiert wurden dabei Verbreitung und Artenreichtum der Grundwasserfauna (Knüsel 2024a), deren zeitliche und räumliche Variabilität (Knüsel et al. 2024b), die biogeographische Geschichte der Gattung *Niphargus* (Alther et al., 2021, Knüsel 2024c) sowie der Einfluss oberflächlicher Landnutzung auf die Artenzusammensetzung (Knüsel 2024d). Besonders relevant ist der Nachweis, dass die Landnutzung nicht nur innerhalb der Grundwasserschutzzonen, sondern auch weit darüber hinaus einen deutlichen Einfluss

auf das Vorkommen von *Niphargus*-Arten hat: in naturnahen Zonen (Wald) wurden signifikant häufiger *Niphargus*-Arten nachgewiesen als in Zonen intensiver Landwirtschaft. Die eDNA-Analysen konnten zeigen, dass verschiedene Landnutzungskategorien auch einen deutlichen Einfluss auf den Rest der Artengemeinschaft des Grundwassers haben, nicht nur auf die Flohkrebse. Dabei konnten Artengemeinschaften im Grundwasser aus Waldgebieten deutlich von solchen aus Landwirtschaftsgebieten unterschieden werden und es wurde eine rund fünfmal geringere Biodiversität in landwirtschaftlich geprägten Aquiferen detektiert (Couton, et al., 2023a). Internationale Untersuchungen bestätigen diese Muster: In urbanen Grundwassersystemen wurden weniger Flohkrebse, dafür mehr Nematoden und Oligochaeten nachgewiesen, während andere Krebstiere nicht betroffen waren (Koch et al. 2021).

Die Mechanismen, welche zu diesen Differenzen zwischen verschiedenen Landnutzungsformen führen, sind divers und reichen von Stoffeinträgen über Veränderungen des Grundwasserspiegels zu thermischer Nutzung des Grundwasserleiters. Korbel (2013) zeigte beispielsweise, dass die Veränderungen der Fauna schon durch geringe Änderungen der abiotischen Bedingungen, vor allem gelöster Sauerstoff, Stickstoff und Phosphor, zwischen den einzelnen Landwirtschaftsformen ausgelöst wurden. Ähnlich nuancierte abiotische Veränderungen zwischen einzelnen Landnutzungsformen fanden auch andere Studien, was nahelegt, dass selbst geringe Einträge durch oberflächliche Landnutzung die Artzusammenstellungen verändern können (Dole-Olivier et al., 2009).

Der Einfluss beschränkt sich nicht auf die Grundwasserfauna, sondern betrifft auch die Mikrobiologie im Grundwasser. Im Rahmen des Fachausschusses zur Umsetzung der Motion 22.3702 «Energiezukunft durch sichere Nutzung des Untergrunds zur Speicherung» wurde 2024 durch die Eawag ein Bericht «Review on the impact of water temperature changes due to geothermal activities on groundwater microbiology and associated geochemical processes» verfasst (Jimenez-Martinez, 2024). In diesem Bericht wird auf die Auswirkungen von erwärmten Grundwasserleitern auf die dort vorkommende Biodiversität hingewiesen. So geht man davon aus, dass selbst eine geringe Erwärmung, wie aktuell im Schweizer Grundwasser zu beobachten und zukünftig durch vermehrte thermische Nutzung zu erwarten ist, einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Funktion der mikrobiellen Artgemeinschaft hat. Es werden drei noch offene Fragen aufgeworfen: (1) Kann die Erwärmung der Grundwasserleiter einen Wechsel hin zu anoxischen Bedingungen auslösen, und damit eine Verschlechterung der Grundwasserqualität? (2) Kann die Erwärmung zur Freisetzung unerwünschter Stoffe aus den Grundgesteinen führen? (3) Was ist der aktuelle Zustand der flachen Grundwasserleiter in städtischen Gebieten hinsichtlich der biologischen (Fäkalkeime und Pathogene) und chemischen Komponenten? Vor allem der letzte Punkt kann im Rahmen eines anlaufenden Biodiversitätsmonitorings untersucht werden.

3 – Methodik & Analytik

Wie erfolgt die Beprobung an einer Grundwassermessstelle? Was ist der Aufwand?

Das Grundwasser kann entweder konventionell (direktes Sammeln der Organismen) oder per eDNA auf Grundwasserorganismen beprobt werden. Für die konventionelle Beprobung ist die Methode standortabhängig. In der Schweiz wurde insbesondere der Einsatz von Filternetzen in Quelfassungen etabliert. Diese Methode ist technisch einfach und kann auch durch Nicht-Fachpersonen (z.B. Brunnenmeister) durchgeführt werden, erfordert jedoch einen zusätzlichen Besuch an der Quelfassung und dadurch zusätzlichen personellen Aufwand. Die eDNA-Methode erfordert die Entnahme und Filtrierung von Wasserproben, die im Feld relativ unkompliziert und unabhängig vom Messstellentyp durchgeführt werden kann.

Was sind die Einschränkungen (Zeit, Probenvolumen etc.)?

Die Wahl und Umsetzbarkeit der konventionellen Methode ist stark vom Messstellentyp abhängig. Bei der konventionellen Beprobung in Quelfassungen sollte das Filternetz ca. zwei Wochen im Voraus montiert werden, die eigentliche Probenahme dauert etwa 30 Minuten. Auch die geringe Individuendichte im Grundwasser sollte bei der Wahl der konventionellen Methode beachtet werden. Bei der eDNA-Beprobung werden Wassermengen von ca. 10–15 L Volumen, spezielles Equipment, sowie eine saubere Arbeitsweise vorausgesetzt. Die Filtration dauert ca. eine Stunde, während dieser Zeit können jedoch auch andere Arbeiten durchgeführt werden. Um Kontaminationen zu vermeiden, resp. zu erkennen, sind Negativkontrollen essenziell.

Gibt es Anforderungen an die Messstellen oder an die Messstellenart (Quelle, Förderbrunnen, Piezometer) für die Beprobung?

Für die Beprobung eignen sich Quellen, Brunnen und Piezometer, je nach Aquifertyp auch Höhlen oder Bohrlöcher. Da für die eDNA nur eine Wasserprobe benötigt wird, ist die Methode in allen Arten von Messstellen umsetzbar. Bei der konventionellen Beprobung hängt die spezifische Methode (und wie systematisch eine solche erfolgen kann) stark vom Messstellentyp (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2 resp. Abschnitt 4.1 *Feldarbeit* und Appendix 3) ab.

Fortsetzung auf nächster Seite

Welche Biodiversität (welche Arten von Organismen) können wir mit welcher Methode erfassen?

Mit konventionellen Methoden lassen sich Invertebraten morphologisch und mittels Barcoding bestimmen. In der Schweiz gibt es für Grundwasserflohkrebse bereits taxonomische Expertise, für weitere Gruppen kann die Expertise aufgebaut oder im Ausland (z. B. Deutschland) genutzt werden. Mikroorganismen können über Mikroskopie, Zytometrie, Kultivierung oder Sequenzierung erfasst und detektiert werden. eDNA-Metabarcoding ist weniger selektiv und ermöglicht die gleichzeitige Erfassung mehrerer Organismengruppen, von Bakterien über Protozoen bis zu Invertebraten, und eröffnet neue Perspektiven für ein ganzheitliches Monitoring.

Die Entwicklung der Methoden zur Grundwasserbiodiversitätserfassung hat eine lange Historie (Abbildung 4). Die Entwicklung von und die Erfahrung mit konventionellen und modernen genetischen Methoden sind so weit fortgeschritten, dass sie in einem nächsten Schritt in ein regelmässiges Monitoring integriert werden können. Die grösste Herausforderung im Grundwasser ist der Zugang zum Ökosystem, da Aquifere meist nur in künstlich geschaffenen Zugängen, schwer zugänglichen Höhlen oder Quellen beprobt werden können. Für die Schweiz gibt es bereits Erfahrungen mit konventionellen Beprobungsmethoden, darunter Filternetze, Fallen, Pumpen, Bohrkerne oder Schöpfer (Tabelle 2, Koch et al., 2024) sowie eDNA basierten Methoden. Diese unterscheiden sich darin, dass man in ersteren Organismen direkt besammelt und morphologisch oder molekularbiologisch bestimmt, während letztere DNA aus Wasserproben extrahiert und mittels molekularer Methoden und Referenzdatenbanken Arten identifiziert. Die Grundlagen beider Methoden sind etabliert, es besteht teilweise noch Handlungsbedarf bei der Standardisierung, der Etablierung von Indices und dem Komplettieren von Referenzdatenbanken.

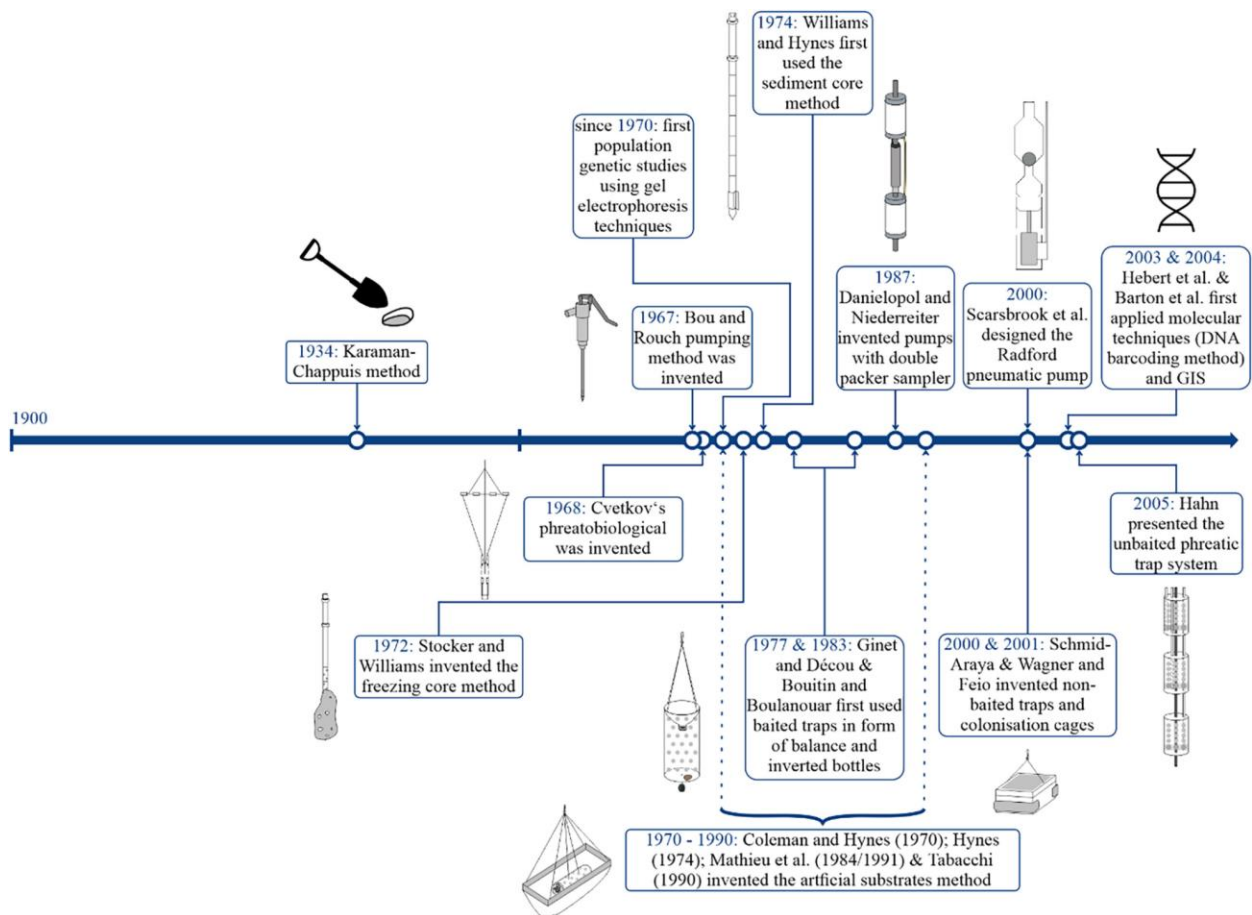


Abbildung 4: Übersicht der methodischen Meilensteine zur Erfassung der Grundwasserbiologie. Abbildung entnommen aus Koch et al., 2024 (CC-BY-4.0). Es fehlt der Einsatz von eDNA in Gewässern seit dem Jahr 2008 (Ficetola et al., 2008).

3.1 – Konventionelle Methoden

Konventionelle Methoden zur Untersuchung von Grundwasserorganismen fassen alle Methoden zusammen, bei denen Pumpen, Filternetze oder Fallen eingesetzt werden. Wasserproben dienen vor allem der Analyse von Mikroorganismen (z. B. über Zellzahlbestimmung oder Kultivierung), während die Makrofauna mit Filternetzmethoden oder Fallen erfasst wird. Klassische morphologische Bestimmungen sind unerlässlich für den Aufbau von taxonomischen Grundlagen, sie stoßen jedoch teilweise an Grenzen, da viele Arten selten, schwer zugänglich oder schwierig bestimmbar sind.

Grundsätzlich lassen sich bei der Beprobung im Grundwasser drei Hauptverfahren unterscheiden: (1) der Einsatz von Pumpen, die Wasser an die Oberfläche bringen und aus dem die Organismen gewonnen werden, (2) das aktive Beprobieren mithilfe von Filternetzen, sowie (3) das Aufstellen von Fallen zur passiven

Probenahme (Tabelle 2, Koch et al., 2024; Stubbington et al., 2016). Während Höhlensysteme ähnlich einem Oberflächengewässer beprobt werden (z. B. Filternetze, Biofilm, Fallen, Wasserproben), ist der Zugang zu Aquiferen schwieriger und die Art der Probe und der detektierten Organismen ist abhängig vom Typ des Zugangs. In Aquiferen bieten sich vorhandene Förderbrunnen- und Quelfassungen sowie Grundwassermessstellen (Piezometer) an, aus denen im Idealfall mit Filternetzen oder Pumpen eine Probe gewonnen werden kann. Vor allem für Quelfassungen gibt es in der Schweiz bereits positive Erfahrungswerte, auf denen ein konventionelles Monitoring aufbauen kann (Knüsel 2024a, Couton et al., 2023a). Da dieses Vorgehen auf umfangreichen Forschungsarbeiten aufbaut, bietet es sich auch für ein angehendes Monitoring an. Bei dieser Methode werden Filternetze mit einer Maschenweite von 0,8 mm über mindestens zwei Wochen direkt am Einlauf der Wasserfassung montiert. Dies ermöglicht die Sammlung von grösseren Makroinvertebraten wie Grundwasserflohkrebse oder -asseln mit relativ geringem Arbeitsaufwand (siehe Abschnitt 4.1 *Feldarbeit* und Appendix 3). Alternativ könnten für den Zugang zum Aquifer auch bestehende Piezometer genutzt werden oder es müssten Piezometer spezifisch für die Beprobung erstellt werden. Das Erstellen dieser ist technisch anspruchsvoll und aufwändig. Einen Sonderfall stellt das Interstitial von Flüssen dar, in dem mittels Interstitialpumpen, Sedimentkernen oder dem Ausheben von Löchern und Beprobung des sich sammelnden Grundwassers (Karaman-Chappuis Methode) eine Probe gewonnen werden kann.

Mikroorganismen können in Wasserproben detektiert werden. Wichtig bei der Beprobung ist dabei der Austausch des Standwassers durch mehrmaliges Leerpumpen des Pegelvolumens (Griebler, Stein, et al., 2014; Pronk et al., 2010) sowie eine saubere Arbeitsweise und saubere Sammelbehälter, die die Probe vor Kontamination schützt (Handschuhe, Mundschutz, sterile Behälter). Die gewonnenen Wasserproben werden im mikrobiologischen Labor weiterverarbeitet und untersucht. Mikrobielle Gemeinschaften können aus der gewonnenen Wasserprobe über Färbungen, Mikroskopie, Kultivierung (nur sehr eingeschränkt, siehe 2.1 und 2.3), funktionelle und physiologische Assays, Durchflusszytometrie und/oder Sequenzierung weiter bestimmt werden. Dazu gibt es bereits Leitfäden, die als Grundlage herangezogen werden können und in denen die Aufbereitung mikrobieller Proben beschrieben wird (Griebler et al., 2018; Griebler, Stein, et al., 2014; Hunkeler et al., 2006). Aufgrund der schwierigen Kultivier- und Bestimmbarkeit hat sich für mikrobielle Organismen die Sequenzierung von Isolaten oder Mischproben als verlässlichste und einfachste Möglichkeit zur Identifikation der Artengemeinschaften durchgesetzt (Zinger et al., 2012).

Makrofauna aus dem Grundwasser kann analog zu Proben aus Oberflächengewässern entweder morphologisch, molekularbiologisch oder mit einer Kombination aus beidem bestimmt werden. Als Vorbild für weitere Überlegungen kann hier das seit 2003 durchgeführte Monitoring in Baden-

Württemberg dienen. Dort wird für hydrochemische Analysen das Wasser mit einem Wasserschöpfer entnommen, der an einer Seilwinde oder Angel befestigt ist und knapp über dem Messstellenboden des Piezometers eine Wasserprobe entnommen. Zur Erfassung der Grundwasserfauna kommt anschliessend ein Filternetzsammler zum Einsatz, der mehrfach auf und ab bewegt wird, um Sediment und Tiere aufzuwirbeln. Diese semiquantitative Methode erlaubt durch eine standardisierte Anzahl von Netzzügen eine vergleichbare Probenahme und die Ermittlung von Abundanzen (LUBW, 2025).

Während die konventionelle morphologische Methode für einzelne Artengruppen mit bestehender taxonomischer Expertise in der Schweiz eine Option ist (z. B. Grundwasserflohkrebse, Eawag), besteht für die meisten Artgruppen der Grundwasserfauna eine ausgeprägte Lücke an taxonomischer Expertise sowie an Bestimmungsliteratur. Viele Grundwasserorganismen kommen zusätzlich lediglich in sehr geringen Dichten vor und die Sammlung ist zeit- und ressourcenaufwändig (Marmonier et al., 2023). So wurden beispielsweise in einer Studie der Eawag in manchen Probenstellen trotz mehrwöchiger Sammlung lediglich einzelne Individuen der Gattung *Niphargus* gefunden (Knüsel et al., 2024c). Ebenfalls sind viele Grundwasserorganismen morphologisch kaum voneinander zu unterscheiden (Delić et al., 2025; Knüsel, 2024a). Hier kommen moderne molekulare Identifikationsmethoden, basierend auf der Identifikation über genetische Information aus Gewebeproben (Barcoding), zum Zug, die es ermöglichen, kryptische Arten mittels Sequenzierung der genetischen Information auseinanderzuhalten, aber auch nicht bestimmbare Individuen oder Fragmente von Organismen zu identifizieren (Hebert et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass ein Einordnen von morphologisch schwer bestimmbaren Arten in «Molekulare taxonomische Einheiten» (MOTU) basierend auf einem Marker-Gen wie COI, im Grundwasser zu vergleichbaren Diversitätsmustern und Artenzahlen führt wie morphologische Bestimmung (Borko et al., 2022).

Tabelle 2: Vergleich der gängigsten Beprobungsmethoden für die Erhebung von Grundwasserfauna. Die Tabelle wurde übernommen aus Koch et al., 2024 (Table 1), übersetzt und adaptiert. Farbcodiert ist die Einschätzung zum Arbeitsaufwand im Feld, wobei Dunkelgrün den geringsten, Gelb einen mittleren und Rot den höchsten Aufwand signalisiert.

Beprobungsmethode		Zeitaufwand Beprobung	Organismen	Tiefe	Geeignetes Habitat	Referenzen
Karaman - Chapis Technik			Interstitialfauna	Oberflächennahe	Alluviale Sedimente	1
Planktonnetz (Phreatobiologisches Netz)			Freischwimmende Invertebraten, abhängig von Maschenweite		Quellen sowie Habitate mit genügend grossem Zugang	1
Fallen	Mit Köder		Invertebraten	Je nach Bohrloch	Quellen, Höhlen	1
	Ohne Köder		Invertebraten		Quellen, Höhlen	1
	Phreatische Köderfallen		Invertebraten, Mikroorganismen		Quellen, Bohrlöcher	2
Gefrorene Sedimentkerne			Interstitialfauna		Oberflächliche Sedimente, Hyporheisches Interstitial	
Künstliche Substrate			Meiofauna, Mikroorganismen		Unterirdische Flüsse und Seen in Höhlen	1, 3
Sedimentbohrkerne			Mikro und Makroorganismen			4
Pumpen	Bou & Rouch Pumpe		Diverse Meio- und Makroorganismen; freischwimmende Organismen & Sand assoziierte Arten, Interstitialfauna	Bis zu 6 m	Sandige Sedimente und Flussskies, Seen & flaches Grundwasser	5
	Zentrifugenpumpe		Kleine Invertebraten, Fragmente grösserer Organismen			6
	Doppel-Packer-Pumpe		Kleine und grosse Invertebraten			2, 7

	Pneumatische Pumpe		Kleine Invertebraten			2, 6
Molekulare Techniken	eDNA - Einzelne Arten		Invasive Arten, Seltene Arten	Abhängig von Beprobungsmethode	Alle aus denen Wasser entnommen werden kann/ Sedimente	8, 9, 10
	eDNA - Metabarcoding		Artgemeinschaften, Mikrobiologisch sowie Metazoen	Abhängig von Beprobungsmethode	Alle aus denen Wasser entnommen werden kann/ Sedimente	8, 9, 10
	Sequenzierung von Individuen		Alle, inkl. kryptischer Arten	Abhängig von Beprobungsmethode		11, 12
Filternetz (Quellwasserfassung)			Invertebraten, v.a. Grundwasserflohkrebs e und Asseln	Oberflächennah	Quellfassungen	13
Videologging		NA	Makroinvertebraten	Bis zu 10 m	Sedimente	14

- 1) Malard, F., Dole-Olivier, M. J., Mathieu, J., Stoch, F., Boutin, C., Brancelj, A., .. & Valdecasas, A. G. (2002). Sampling manual for the assessment of regional groundwater biodiversity. Protocols for the Assessment and Conservation of Aquatic Life in the Subsurface (PASCALIS), <http://www.pascalis-project.com/results/samplingmanual.html>.
- 2) Hahn, H. J. (2005). Unbaited phreatic traps: A new method of sampling stygofauna. *Limnologica*, 35(4), 248–261.
- 3) Sket, B. (2018). Collecting and processing crustaceans of subterranean habitats. *Journal of Crustacean Biology*, 38(3), 380–384.
- 4) Dudley Williams, D., & Hynes, H. B. N. (1974). The occurrence of benthos deep in the substratum of a stream. *Freshwater Biology*, 4(3), 233–256.
- 5) Boulton, A. J., Dole-Olivier, M. J., & Marmonier, P. (2004). Effects of sample volume and taxonomic resolution on assessment of hyporheic assemblage composition sampled using a Bou-Rouch pump. *Archiv für Hydrobiologie*.
- 6) Scarsbrook, M., Fenwick, G., & Radford, J. (2000). Living groundwater: studying the fauna beneath our feet. *Water & Atmosphere*, 8(3), 15-16.
- 7) Allford, A., Cooper, S. J. B., Humphreys, W. F., & Austin, A. D. (2008). Diversity and distribution of groundwater fauna in a calcrete aquifer: Does sampling method influence the story? *Invertebrate Systematics*, 22(2), 127–138. <https://doi.org/10.1071/IS07058>
- 8) Saccò, M., Guzik, M. T., Van Der Heyde, M., Nevill, P., Cooper, S. J. B., Austin, A. D., Coates, P. J., Allentoft, M. E., & White, N. E. (2022). eDNA in subterranean ecosystems: Applications, technical aspects, and future prospects. *Science of The Total Environment*, 820, 153223. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153223>
- 9) Couton, M., Hürlemann, S., Studer, A., Alther, R., & Altermatt, F. (2023). Groundwater environmental DNA metabarcoding reveals hidden diversity and reflects land-use and geology. *Molecular Ecology*, 32(13), 3497–3512.
- 10) Couton, M., Studer, A., Hürlemann, S., Locher, N., Knüsel, M., Alther, R., & Altermatt, F. (2023). Integrating citizen science and environmental DNA metabarcoding to study biodiversity of groundwater amphipods in Switzerland. *Scientific Reports*, 13(1), 18097. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44908-8>
- 11) Trončelj, P., Douady, C. J., Fišer, C., Gibert, J., Gorički, Š., Lefébure, T., Sket, B., & Zakšek, V. (2009). A molecular test for cryptic diversity in ground water: How large are the ranges of macro-stygobionts? *Freshwater Biology*, 54(4), 727–744.
- 12) Knüsel, M., Borko, Š., Alther, R., Salussolia, A., Flot, J.-F., Altermatt, F., Fišer, C., & Stoch, F. (2023). Phylogenetic structure and molecular species delimitation hint a complex evolutionary history in an Alpine endemic *Niphargus* clade (Crustacea, Amphipoda). *Zoologischer Anzeiger*, 306, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2023.07.001>
- 13) Knüsel, M. (2024a). Opening the Black Box: Biodiversity and Biogeography of Groundwater Amphipods in Switzerland [PhD Thesis]. University of Zurich.
- 14) Datry, T., Malard, F., Niederreiter, R., & Gibert, J. (2003). Video-logging for examining biogenic structures in deep heterogeneous subsurface sediments. *Comptes Rendus. Biologies*, 326(6), 589–597. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(03\)00147-1](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00147-1)

3.2 – eDNA-Methode: Beprobung und Analyse

Umwelt-DNA (eDNA) erlaubt den Nachweis von Organismen anhand genetischer Spuren in Wasserproben. Damit können sowohl einzelne Arten als auch ganze Lebensgemeinschaften detektiert werden, von Mikroben bis zu Invertebraten. Für das Grundwasser bietet eDNA grosse Vorteile: Die Probenahme ist einfach, benötigt wenig Material und ermöglicht ein umfassendes Monitoring. Erste Untersuchungen in der Schweiz zeigen, dass sich Methoden aus Oberflächengewässern gut auf das Grundwasser übertragen lassen und Synergien für standardisierte Untersuchungen bestehen. Offene Fragen sind die Verfügbarkeit von Referenzdatenbanken, die Datenhaltung, die Etablierung und Standardisierung von Indices sowie die Verfügbarkeit von kommerziellen Anbietern für Analysen. Für alle diese Aspekte laufen aktuell in der Schweiz wie auch auf europäischer Ebene Bestrebungen, die Lücken zu schliessen, so dass eine Implementation schon jetzt mehrheitlich realistisch und vergleichbar ist.

Auf molekularen Techniken zur Artidentifikation aufbauend, erweisen sich Umwelt-DNA (eDNA) basierte Methoden seit einigen Jahren als eine valide Alternative zu herkömmlichen Methoden in aquatischen Systemen. Umwelt-DNA ist genetisches Material, das frei oder gebunden in Wasserkörpern (und anderen Umweltproben) vorkommt, und mittels molekularer Methoden Rückschlüsse auf die vorkommenden Organismen zulässt (Pawlowski et al., 2020; Thomsen & Willerslev, 2015). Diese Methoden basieren auf der Vervielfältigung kurzer Fragmente von meist mitochondrialen oder ribosomalen Marker-Genen (COI, CytB, 12S, ITS) mittels PCR. Eine darauffolgende Visualisierung der Fragmente auf Gelen oder Hochdurchsatzsequenzierungen (z. B. Illumina, Pacbio) erlaubt die Identifikation einzelner Arten, genetischer Varianten oder ganzer Gesellschaften aus Umweltproben. Diese Methoden ermöglichen es, aus ein und derselben Probe Organismen über den gesamten Stammbaum des Lebens (z. B. Bakterien bis Invertebraten) zu detektieren, was ein ganzheitliches Monitoring von Ökosystemen erlaubt. Im Grundwasser bieten diese Methoden daher potenziell Vorteile da sie wenig Ansprüche an die Probestellen haben, eine einfache Probenahme ermöglichen und mithilfe einer Probe sowohl auf mikrobielle und makrobielle Arten geschlossen werden kann (Baird & Hajibabaei, 2012).

Es gibt bei der eDNA-Methode mehrere Nachweisarten. So kann mithilfe der aus Umweltproben isolierten DNA entweder nach einzelnen, vorher bekannten, Arten gesucht werden (Einzelartnachweise), zum Beispiel zur Detektion invasiver und seltener Arten. Dieser Ansatz ist bereits im Einsatz zur Detektion von seltenen Arten wie dem Grossen Kammolch in Oberflächengewässern und sehr

verlässlich einsetzbar. Die für ein Grundwasser-Monitoring interessantere Nachweisart ist das eDNA-Metabarcoding, bei dem aus der Umweltprobe ohne vorhergehende Kenntnis der Artzusammensetzung die gesamte Artgemeinschaft detektiert werden kann. Dazu benötigt es Referenzen, mit denen man gefundene DNA abgleichen kann, sowie passende Infrastruktur. Aktuelle Forschungsprojekte im Grundwasser zeigen, dass über Quelfassungen oder Piezometer Wasser entnommen werden kann, dass für eDNA-Analysen filtriert und untersucht werden kann (Couton et al. 2023a, b). Die weitere Analyse folgt denselben Analyseschritten wie in Oberflächengewässern, was vielversprechende Synergien und Standardisierungsmöglichkeiten über Ökosystemgrenzen hinweg eröffnet. Die Grundlagen der eDNA-Analysen sind im Methodenbericht «Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen» bereits detailliert beschrieben (Pawlowski et al., 2020). Zusammenfassend wird im Folgenden eine verkürzte Übersicht gegeben.

Generelle Arbeitshinweise und technische Aspekte

Umwelt-DNA liegt meist in sehr geringen Konzentrationen vor und die Analysemethoden sind hochsensitiv, weshalb die der Proben bei der Probenahme, Transport, Lagerung und Analyse ein grosses Risiko darstellt. Daher haben sich bei eDNA-Probenahmen und Analysen weitgehend Einwegmaterialien durchgesetzt, um die aufwändige Reinigung von Equipment zu verringern. Alle Materialien, welche mehrfach verwendet werden, müssen nach jeder Probenahme DNA-frei gemacht werden. Dazu kann entweder mit kommerziell erhältlichen Produkten gearbeitet werden (z. B. DNA-Exitus™) oder Reinigungsmittel mit mindestens 5–10 % Hypochlorit (z. B. Kaliumhypochlorit oder Natriumhypochlorit, Handelsnamen: Javel, Danklorix) und/oder der Bestrahlung mittels UV-C (vor allem Oberflächen). Nach Behandlung mit Chlorbleiche sollten etwaige Rückstände entweder durch Spülen mit Probenwasser oder deionisiertem Wasser entfernt werden. Wichtig zu beachten ist, dass EtOH zwar Bakterien abtötet, aber DNA nicht angreift und daher nicht ausreicht, um Oberflächen von DNA zu befreien.

Neben Einwegartikeln sollte bei der Probenahme ausserdem auf Einweg-Handschuhe geachtet werden (jede Probe ein neues Paar), sowie im Fall von mikrobiellen Analysen auf die Verwendung passender Atemschutzmasken, um eine Kontamination der Probe mit humanen Mikroorganismen zu verringern. Bei der Verwendung von Mehrwegartikeln müssen zusätzliche Negativkontrollen (z. B. DNA freies Wasser) für Equipment eingeplant werden, um etwaige verschleppte Kontaminationen zu detektieren und die Aussagekraft der Ergebnisse nicht zu gefährden.

Ausserdem müssen die generellen Anforderungen an eDNA-Labore berücksichtigt werden. Diese Labore haben einen Fokus auf Probenschutz und dem Verringern von Kontaminationen, sollten also Reinraumbedingungen entsprechen. Das heisst, es braucht passende Sterilisierungstechnologie für

Oberflächen (z. B. UV-C Anlagen), Filteranlagen für Luft, positiver Luftdruck, klar getrennte Bereiche für Extraktionen, Pre-PCR sowie Post-PCR Bearbeitung, Massnahmen zum Probenschutz (Overalls, Masken, Handschuhe) und eine Schleuse als Zugangspunkt (Pawlowski et al., 2020). Da diese Art von Laboren sehr aufwändig im Betrieb und Anschaffung sind, haben sich hier bereits kommerzielle Anbieter für eDNA-Analysen etabliert.

Probenahme

Der erste Schritt für eine eDNA-Analyse ist die Probenahme. Für ein Grundwassermonitoring ist dies Wasser, das aus Quelfassungen, Piezometern, Förderbrunnen o. ä. gesammelt wird, und ähnelt der Probenahme in Oberflächengewässern. Generell gibt es für die Gewinnung von Wasserproben für eDNA-Analysen bereits Erfahrungswerte in der Schweiz, die unter anderem auch in Methodenanleitungen für molekulare Analysen im Umweltbereich festgehalten sind (Pawlowski et al., 2020). Der grosse Vorteil von eDNA Beprobungen im Grundwasser ist, dass es ausser dem Zugang zu Wasser keinerlei Anforderungen an die Messstellen gibt.

Aufgrund der eher geringen DNA-Konzentration im Grundwasser sollten generell höhere Volumina und mehrere Feldreplikate als in Oberflächengewässern gesammelt werden (Altermatt et al., 2023) um eine Gemeinschaft mittels eDNA verlässlich zu charakterisieren. Eine Studie der Eawag konnte empirisch zeigen, dass 15 Liter (3 x 5 L) ausreichend sind, um eine annähernde Sättigung der detektierten Biodiversität in Proben aus oberflächennahem Grundwasser zu erreichen (Couton et al., 2023a). In dieser Studie wurden die Wasserproben mithilfe von Kanistern direkt in der Quelfassungen entnommen. Dies kann jedoch auch mittels Schöpfer oder Pumpen erreicht werden. Es besteht hier noch Optimierungspotenzial hinsichtlich des eingesetzten Equipments. Das so gesammelte Wasser muss dann schnellstmöglich weiterverarbeitet, zum Beispiel vor Ort filtriert, werden. Sollte eine sofortige Weiterverarbeitung nicht möglich sein, können die gewonnenen Wasserproben vor der Filtration für kurze Zeit (12–24 Stunden) bei 4°C und Dunkelheit gelagert werden.

Gewinnung der DNA aus der Umweltprobe

Die im Wasser vorhandene DNA muss für die weitere Analyse im Labor zuerst gewonnen und konzentriert werden. Es gibt hier zwei unterschiedliche Herangehensweisen, einerseits eine Ethanol-basierte Ausfällung der DNA, welche jedoch nur für geringe Volumen in Frage kommt, oder aber die Filtration durch feinporige Membranen mit unterschiedlichen Porengrössen (z. B. Glasfaser 0,22 – 5 µm). Die Porenweite der Filter variiert vor allem zwischen den Organismengruppen die untersucht werden sollen, so sind kleine Porengrössen von 0,22 µm vor allem bei Mikroorganismen relevant, während Porengrössen von 0,45–5 µm hauptsächlich für eukaryotische Organismen eingesetzt werden. Dies hat

nicht nur mit der Grösse der Organismen/DNA Fragmente zu tun, sondern auch mit der Abundanz im System (Bakterien sind häufiger als Invertebraten, brauchen daher weniger Volumen) und dem durch die Sauberkeit des Wassers limitierten filtrierbaren Volumens in Wasser mit einem hohen Schwebstoffanteil.

Durchgesetzt hat sich die Filtration mittels einer Pumpe (z. B. Handpumpen, Peristaltik, Vakuum) durch Einwegfilterkapseln. Dadurch wird das Kontaminationsrisiko stark minimiert und den Filtern kann direkt eine Konservierungsflüssigkeit (z. B. Longmire-Puffer, DNA/RNAlater™) zugefügt werden, was die Lagerung bei Raumtemperatur über mehrere Monate ermöglicht und damit die Logistik stark vereinfacht. Prinzipiell ist auch einfrieren der Filter ohne Puffer (Minimum -20 °C), oder das komplette Trocknen des Filters möglich, was allerdings nicht empfehlenswert und logistisch schwieriger umzusetzen ist.

Extraktion der DNA

Im nächsten Schritt wird die DNA von den Filtern extrahiert. Dies sollte so schnell wie möglich nach der Filtration erfolgen, da extrahierte DNA besser und länger haltbar ist. Das genaue Vorgehen hierbei ist stark abhängig vom Labor, und es gibt kommerziell erhältliche Extraktionskits, welche durchwegs ähnliche Resultate hinsichtlich der detektierten Artenzahlen ermöglichen. Die am weitaus häufigsten eingesetzten Extraktionsmethoden nutzen kommerzielle Produkte, wie das «DNeasy Blood and Tissue» (QIAGEN, Deutschland) oder «MoBio Powerwater/Qiagen Powerwater» (QIAGEN, Deutschland), es gibt allerdings auch eine Vielzahl an «Do-it-yourself» Lösungen, und prinzipiell zeigen die meisten der Methoden verlässliche Ergebnisse (Takahashi et al., 2023). Wichtiger als die eingesetzte Chemie ist in diesem Schritt, dass alle Arbeiten in einem für eDNA-Analysen ausgestatteten Labor erfolgen, das ausführende Labor Extraktionskontrollen verwendet und bei der Extraktion bereits potenzielle PCR-Inhibition (Hemmung durch Stoffe in der Probe) berücksichtigt werden. Die extrahierte DNA kann danach entweder gefriergetrocknet werden oder bei -80 °C über lange Zeit gelagert und auch archiviert werden.

Vervielfältigen der DNA

Die extrahierte DNA muss in einem nächsten Schritt vervielfältigt werden. Dazu werden Primer eingesetzt, das sind kurze Oligonucleotidsequenzen welche in einem Schlüssel/Schloss Prinzip an Ziel-DNA binden, und als Startpunkt für die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient. Diese Primer können sehr spezifisch sein und nur einzelne Arten vervielfältigen, z. B. invasive oder seltene Arten, oder aber auch ganze Organismengruppen abdecken und so Biodiversität und Artengemeinschaften ohne vorhergehende Informationen vervielfältigen (Tabelle 3). Bei eDNA-Analysen werden meist kurze Fragmente von mitochondrialen oder ribosomalen Marker-Genen, ähnlich dem Barcoden von Arten, vervielfältigt, da diese in der Zelle häufiger vorkommen und damit auch in der Umweltprobe häufiger erwartet werden können. Während der PCR wird die DNA vervielfältigt, dazu gibt es verschiedene Protokolle, welche stark

von den Primern wie auch den Bedingungen im ausführenden Labor abhängen. Es hat sich gezeigt, dass weitere Replikate in diesem Schritt die Detektionswahrscheinlichkeiten verbessern und es daher zu mindestens drei PCR-Replikaten pro Probe kommen sollte (Bruce et al., 2021; Pawlowski et al., 2020). Die PCR-Produkte können nun visualisiert werden (bei einzelnen Arten, z. B. mittels Auftrennung nach Fragmentlänge), Sanger-Sequenziert (Gewebeproben) oder aber mittels Hochdurchsatz-Sequenziermethoden identifiziert werden (im Falle von Mischproben, Metabarcoding).

Tabelle 3: Übersicht über gängige eDNA-Primer sowie deren Zielorganismen. Namen der «forward» und «reverse» Primer sind angegeben, sofern diese explizit in den Quellen genannt werden, ansonsten wird auf die Originalpublikationen verwiesen. «NA» bedeutet keine Angabe.

Primer / Gen	Primer_fwd	Primer_rev	Zielorganismus	Referenzen
Cytochromoxidase I (COI)	fwhF2_Niph	fwhR2n_Nip	<i>Niphargus</i> , Invertebraten	Couton et al 2023a
COI	mICOIntF	jgHCO2198	Invertebraten	Leray et al 2013
COI	fwhF2	EPTDr2n	Invertebraten, EPT	Leese et al., 2021 ; Vamos et al., 2017
CytB	NA	NA	Fisch, Vertebraten	Hänfling et al., 2016
12S_telo	Teleo_fwd	Teleo_rev	Fisch, Vertebraten	Valentini et al., 2015
12S_Mifish	Mifish_fwd	Mifish_rev	Fisch, Vertebraten	Miya et al., 2016
16S_rRNA V6	515f	806r	Bakterien	Vos et al., 2012
16S V3-V4	NA	NA	Archaea	GREG Workshop
18S Universal	SSU_FO4	SSU_R22	Nematoden, Invertebraten	Blaxter et al., 2003
ITS (ITS1, ITS4, NS1, and NS2)	NA	NA	Fungi	Blaxter et al., 1998

Sequenzierung der DNA

Die PCR-Produkte werden im nächsten Schritt sequenziert. Auch hier gibt es unterschiedliche Systeme und Anbieter, wobei sich im Fall von eDNA Illumina mit ihren MiSeq und NovaSeq Technologien weitgehend durchgesetzt haben. Bevor die PCR-Produkte sequenziert werden können, werden sie, je nach gewünschter Sequenziertiefe (Anzahl der gewünschten Reads pro Probe), gleichmässig gemischt. Im Normalfall lässt ein Miseq-Run so 400 Proben bei einer Sequenziertiefe von $\sim 10^5$ Sequenzen zu, was für

die Bestimmung der Diversität in Oberflächengewässern als ausreichend erachtet wird, und daher für die kleineren Communities im Grundwasser ausreichen sollte. Dieser Schritt ist essenziell, da die Sequenziertiefe als ein wichtiger Parameter für den Erfolg von Metabarcoding Analysen gilt. Ausserdem kann hier entschieden werden, ob nur in eine Richtung sequenziert werden soll (single-end-sequencing), was meist günstiger ist, aber die Qualität der Sequenzen massiv verringert, oder aber die DNA in beide Richtungen sequenziert werden soll (paired-end-sequencing), was sich mittlerweile als Standard durchgesetzt hat.

Bioinformatische Analyse und Artzuweisung

Es herrscht nach wie vor kein wissenschaftlicher Konsens, welches die beste bioinformatische Analyse ist, aber Studien zeigen, dass robustes Studiendesign (z.B. biologische und technische Replikate bei der Probennahme, sauberes arbeiten im Labor) valide ökologische Daten unabhängig von der gewählten bioinformatischen Analyse liefert (Zinger et al., 2019). Nach der Sequenzierung müssen die Proben bioinformatisch aufbereitet und, wenn gewünscht, einer Art zugewiesen werden. Der Ablauf, vor allem die eingesetzte Software, ist nicht einheitlich zwischen Labors und Arbeitsgruppen. Allerdings folgen alle eingesetzten Methoden dem gleichen Ablauf, unabhängig von der eingesetzten Software oder Sequenziermethode. Zuerst werden die entstandenen Sequenzen auf ihre Qualität überprüft, dieser Schritt wird teilweise automatisch vom Sequenziergerät gemacht und man hat wenig Einfluss darauf. Im nächsten Schritt müssen die gepoolten Proben wieder auseinanderdividiert werden, dieser Vorgang nennt sich «demultiplexing» und nutzt die im PCR-Schritt angebrachten Index-Nucleotide, um vorhandene Sequenzen einer Probe oder einem Replikat zuzuordnen. Im nächsten Schritt, dem «Primer-Trimming» werden nun sowohl Primer als auch Index-Nukleotide entfernt. Danach können die vorhandenen Sequenzen entweder basierend auf Ähnlichkeitsparametern (z. B. 98 % Übereinstimmung, «Vsearch») oder mittels Algorithmen (z. B. «Swarm» Mahé et al., 2021) zu Operational Taxonomic Units (OTU) geclustert werden, oder basierend auf der Sequenzqualität (z. B. «DADA2») zu Exact/Amplicon Sequence Variants (ESV / ASV, manchmal auch ZOTU) denoised werden. Beide Methoden werden nach wie vor regelmässig eingesetzt, teilweise auch kombiniert (Antich et al., 2021), wobei sich die Analyse von ASV sowohl bei mikrobiologischen als auch bei makrobiologischen Analysen immer mehr durchsetzt (Callahan et al., 2016, 2017).

Im nächsten Schritt kommt es zur Qualitätskontrolle und dem Entfernen von etwaigen Kontaminationen. Dabei werden PCR-Artefakte entfernt (z. B. Chimärische Sequenzen, Primer-Dimer), Reduktion von in geringer Frequenz vorkommenden Sequenzen (die Grenzwerte können mithilfe von Positiv- und Negativkontrollen empirisch ermittelt werden), der Bereinigung von Kontamination (z. B. durch Subtraktion von Sequenzen in Negativkontrollen, entfernen von OTU/ASV welche in Negativkontrollen

auftauchen o. ä.), und im Falle vorhandener PCR Replikate zum Anwenden eines passenden Grenzwerts (z. B. zwei von drei PCR positiv).

Die übrig gebliebenen OTU/ASV können im letzten Schritt nun taxonomisch zugeordnet werden. Dabei kann unterschieden werden zwischen auf Ähnlichkeit basierenden Methoden, bei denen die Artzuweisung auf einer prozentualen Übereinstimmung in einem Alignment mit Referenzdaten beruht, Zuweisung von taxonomischen Leveln basierend auf Modellen, die auf die Sequenzzusammensetzung trainiert sind, Phylogenetischen Methoden, die genetische Verwandtschaften berücksichtigen und Methoden, die auf trainierte Classifier setzen und über probabilistische Methoden Arten zuweisen (Tabelle 4). Auch gibt es verschiedene Softwarelösungen, welche die vorhandenen Sequenzen mit Referenzdatenbanken vergleichen (z. B. BLAST, IDTaxa, Obitools).

Referenzdatenbanken

Der aktuelle Stand der Referenzdatenbanken für Grundwasserorganismen ist noch lückenhaft, da viele Arten unbekannt oder nicht sequenziert sind. Studien in der Schweiz zeigen, dass nur ein kleiner Teil der ASVs (z. B. 15 %) zuverlässig einem taxonomischen Niveau zugeordnet werden kann. Internationale und nationale Initiativen zur Charakterisierung von Stygofauna deuten jedoch darauf hin, dass sich die Datenbanken in den kommenden Jahren deutlich verbessern werden. Verbesserte Referenzdatenbanken ermöglichen zukünftige Neuanalysen und eine präzisere Erfassung der Biodiversität im Grundwasser. Das heisst, schon heute gesammelte (und sequenzierte) Proben werden in Zukunft in einheitlicher Form (wieder) analysierbar sein. Selbst komplette Referenzdatenbanken erlauben keine perfekten Identifikationen (Blackman et al., 2023, Keck et al., 2023). In Fällen, in denen keine ausreichende Referenzdatenlage vorliegt oder die taxonomische Bestimmung unsicher ist, können auch Taxonomie reduzierte oder -freie Ansätze angewendet werden. Hierbei erfolgt die Analyse nicht auf der Ebene benannter Arten, sondern man bleibt auf dem Level von Sequenzeinheiten wie OTUs oder ESVs/ASVs. Ein Zuwarten mit Analysen/Probenahmen aus Gründen (noch) unvollständiger Referenzdatenbanken ist deshalb nicht angezeigt, zumal viele Analysen bezüglich Gewässergüte auch ohne taxonomische Zuordnung erfolgen können.

Tabelle 4: Übersicht über die Vor- und Nachteile der gängigen taxonomischen Identifikationstools. Tabelle wurde übernommen aus Hleap et al., 2021 und übersetzt.

Methode	Sequenz-Ähnlichkeit (SS)	Sequenz-zusammensetzung (SC)	Phylogenetisch (Ph)	Wahrscheinlichkeitsbasiert (Pr)
Zuverlässigkeit	Hoch/Niedrig ^a	Hoch/Niedrig ^a	Hoch ^c	Hoch
Verfügbarkeit	Hoch	Mittel	Mittel	Niedrig
Skalierbarkeit	Mittel	Hoch/niedrig ^b	Sehr niedrig	Hoch
Verständlichkeit	Hoch	Niedrig	Hoch	Niedrig
Benutzerfreundlichkeit	Hoch/Mittel	Mittel	Mittel/Niedrig	Niedrig
Anmerkungen:				
a: Hoch bei exakter Übereinstimmung oder Artgleichheit in der Datenbank, mittel bis niedrig, wenn nicht.				
b: Wenn bereits trainiert, schnell; Training kann jedoch hohe Rechenleistung erfordern.				
c: Wenn genügend Signal in der Sequenz vorhanden ist				

Einsatz von Taxonomie reduzierten Klassifizierungen

Die molekularen Einheiten (OTU/ASV) ermöglichen es, Veränderungen in der Biodiversität auch ohne exakte Artbenennung über Raum und Zeit zu vergleichen. Besonders in wenig erforschten Lebensräumen oder bei taxonomisch schwierig einzuordnenden Organismengruppen bieten sie eine praktikable und robuste Grundlage für Umweltvergleiche, Zustandsbewertungen oder die Identifikation von ökologischen Veränderungen (Brantschen et al., 2021). In der Schweiz wurde die Machbarkeit einer solchen reduzierten Klassifikation bereits mit Daten aus Oberflächengewässern getestet. Dabei wurde untersucht, ob als menschlich beeinflusst oder unbeeinflusst klassifizierte Messstellen sowohl mittels morphologischer Arten als auch mittels eDNA-Daten identifiziert werden konnten. Die mittels Machine-Learning analysierten Datensätze zeigten, dass die eDNA generierten Daten gleich gut geeignet sind, um beeinflusste Messstellen von Referenzstellen zu unterscheiden wie die taxonomisch identifizierten Arten (Keck et al., 2023). Für den Einsatz von eDNA im Grundwasser bedeutet dies, dass der Beginn eines Monitorings nicht von der Vollständigkeit der Referenzdatenbank abhängt, und mögliche Klassifikationen basierend auf den rohen eDNA-Daten gemacht werden können.

3.3 – Übersicht über die Nutzung von konventionellen und eDNA-Methoden zum Monitoring der Biodiversität im Grundwasser

Die beiden Methoden eignen sich komplementär für ein Biodiversitätsmonitoring. Konventionelle Methoden basierend auf der Sammlung von Individuen bieten Vorteile bei der Bestimmung von Abundanzen, der Identifikation kryptischer Arten und können beim Aufbau von Referenzdatenbanken helfen. eDNA bietet Vorteile bei der grossflächigen Anwendung unabhängig des Messstellentyps, der Analyse über mehrere Artgruppen hinweg, der Berechnung von Gewässergüte-Indices und bietet Synergien mit dem Monitoring von Oberflächengewässern. Beide Methoden ergänzen sich gut, was für eine Kombination aus konventionellen und eDNA-Methoden spricht.

Die Probenahme und Analyse von Grundwasserproben im Rahmen eines Monitorings sind grundsätzlich sowohl mit konventionellen Methoden als auch mit eDNA möglich (Abbildung 5). Beide Ansätze sind mit bestehenden Monitoringprogrammen wie NAQUA kompatibel, unterscheiden sich jedoch erheblich hinsichtlich Methodik, Aufwand, Aussagekraft und Skalierbarkeit (Tabelle 5). Konventionelle (faunistische) Methoden erlauben Aussagen zu Abundanzen und dem Zustand einzelner Organismen. Gesammelte Organismen können morphologisch oder genetisch bestimmt werden. Die Anwendung der konventionellen Methode erfordert jedoch passende Zugänge zum Grundwasser (z. B. gross genug für ein Filternetz mit passender Maschenweite) und hängt somit von der Messstelle ab. Zudem benötigt diese Methode vorhandene taxonomische Expertise, um Organismen morphologisch zu identifizieren. Diese ist aktuell nur für wenige Gruppen, z. B. Flohkrebse, verfügbar.

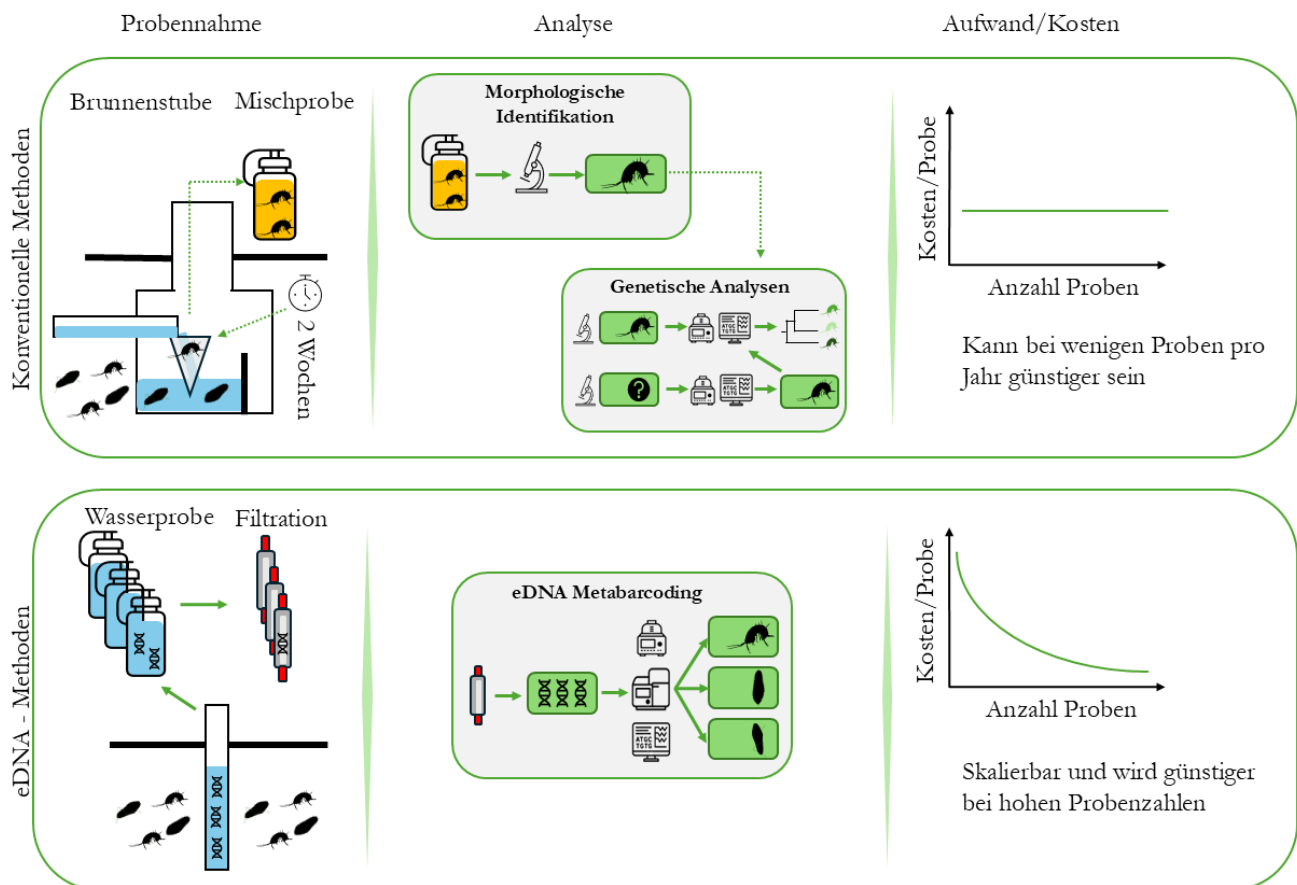


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Abläufe und Grundprinzipien konventioneller Methoden sowie eDNA-Analysen.

Demgegenüber ermöglicht die Analyse von Umwelt-DNA (eDNA) die parallele Erfassung mehrerer Organismengruppen aus einer einzigen Wasserprobe. Darunter fallen auch Gruppen, welche evolutionär weit voneinander entfernt sind (z. B. Bakterien und Invertebraten). Umwelt-DNA hat bereits gezeigt, dass die Detektion von Individuen mit geringen Populationsdichten im Grundwasser möglich ist (Couton et al., 2023a; Couton et al., 2023b). Die Probenahme ist logistisch einfach umzusetzen und kann an bestehende Beprobungsabläufe angepasst und damit mit bestehenden Beprobungen kombiniert werden. Selbst bei fehlenden Referenzsequenzen können OTU oder ASV-Listen als Grundlage für die vorkommende Biodiversität dienen. Dies ist in einem System wie dem Grundwasser, wo ein grosser Teil der Diversität noch unerforscht ist, von Vorteil. Diese Daten können in Zukunft erneut gegen ausgebaute Referenzdatenbanken abgeglichen werden. Spezifisch hervorzuheben ist, dass mit eDNA direkt Indices zur Gewässergüte berechnet werden können. Die Etablierung dieser Indices für Grundwasser ist realistisch und kann zeitnah umgesetzt werden (siehe Abschnitt 4.4). Jedoch sind Aussagen zu Abundanzen mit eDNA nur bedingt möglich. eDNA basierte Methoden erfordern initial Investitionen in Methodvalidierung, Lagerkapazitäten, etwaige Schulungen des probennehmenden Personals sowie der Laborkapazität.

Generell sollte die Wahl der Methode auf Basis der konkreten Fragestellung, der vorhandenen Infrastruktur und der verfügbaren Ressourcen erfolgen. Im Fall eines neu zu beginnenden Grundwassermonitorings sprechen viele Aspekte für eine Kombination der Umwelt-DNA-Methode mit konventionellen Beprobungen in ausgewählten Messstellen. In der Schweiz konnte bereits gezeigt werden, dass ein kombinierter Einsatz beider Verfahren sinnvoll und sich ergänzend ist (Couton et al., 2024). In dieser Studie wurden eDNA-Analysen mit einer Probennahme verglichen und gezeigt, dass eDNA zwar im Vergleich zu einem mehrwöchig installierten Filternetz in einer Quellwasserfassung weniger Flohkrebsarten detektiert, aber zusätzliche Informationen zur Artengemeinschaft liefert. Die eDNA-Methode konnte so mit einzelnen Flohkrebsarten assoziierte ASV-Gemeinschaften identifizieren, die mit der Filternetzmethode nicht möglich waren. Daher ist eine Kombination beider Methoden angezeigt, um sowohl taxonomische Tiefe als auch eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung sowie Effizienz zu gewährleisten.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile der konventionellen Methode zur Erhebung der Grundwasserbiodiversität gegenüber eDNA-basierten Methoden. Die Farben zeigen, wie gut sich die Methode eignet: Grün = geeignet und einsetzbar, wenige offene Fragen; Gelb = einsetzbar, aber mit noch offenen Punkten, die im Monitoring geklärt werden können; Rot = nicht geeignet oder mit zu vielen offenen Fragen.

Kriterium	Konventionell	eDNA (Metabarcoding)	Bemerkung
Abdeckung Organismengruppen	Makrofauna, einzelne Mikroorganismengruppen	Alle gängigen Organismengruppen	eDNA erfasst nicht kultivierbare und schwer detektierbare Taxa
Nachweisgrenze	Eingeschränkt durch geringe Dichten bzw. mangelnde Kultivierbarkeit	Sehr sensitiv	eDNA detektiert Organismen auch bei geringer Dichte
Taxonomische Auflösung	Hoch, wenn taxonomische Expertise vorhanden	Variabel, abhängig von Referenzen	Referenzlücken, v. a. bei Grundwasserfauna
Lebend/Nicht-lebend Unterscheidung	Möglich	Nicht möglich	Nachweis von DNA ist nicht gleich Nachweis lebender Organismen
Abundanzen	Ja	Höchstens semiquantitativ	Zusammenhang Reads zu Abundanz nicht einwandfrei belegbar
Probennahme-Invasivität	Invasiv, jedoch methodenabhängig	Minimal-invasiv	Wasserprobe reicht bei eDNA, bei konventionellen Methoden werden Organismen entnommen
Standardisierung	Noch nicht, kann aber auf Methoden bei Oberflächengewässern aufgebaut werden	ISO und DIN für eDNA-Beprobung in Oberflächengewässern vorhanden	ISO und DIN noch nicht in Gesetzgebung
Kontaminationsrisiko	Niedrig bis moderat	Hoch	Hohe Sorgfalt und richtiges Equipment für eDNA nötig (Feld + Labor)
Zeit-/Kostenaufwand	Hoch	Mittelhoch, skalierbar	eDNA initial teuer, aber effizient bei vielen Proben
Monitoring-Tauglichkeit	Moderat	Hoch	Anwendung im Feld einfach in bestehendes Monitoring integrierbar
Bearbeitungsaufwand	Hoch	Moderat	Einzelne Proben konventionell machbar, mehrere Proben starke Skaleneffekte bei eDNA

4 – Szenarien für ein Monitoring der Biodiversität im Grundwasser

Wie viele Grundwassermessstellen müssten in etwa beprobt werden, um einen schweizweiten Überblick der Biodiversität im Grundwasser zu erhalten?

Minimal empfehlen wir die Beprobung aller 50 NAQUA TREND Messstellen. Dies ermöglicht eine erste Charakterisierung der Grundwasserfauna. Für eine bessere Aussagekraft wäre eine Ergänzung dieser Messstellen auf 75–100 empfehlenswert, wobei die Auswahl der Messstellen eine möglichst grosse Repräsentativität auf Landesebene garantieren sollte.

Wie oft sollte eine konventionelle oder eDNA-Beprobung durchgeführt werden?

Minimal empfehlen wir eine jährlich wiederkehrende Beprobung mit jeweils zwei Probenahmen pro Standort und Jahr mittels eDNA (saisonal gestaffelte Probenahme). Zwei Proben pro Jahr erlaubt grobe Rückschlüsse bezüglich Saisonalität, erhöht die Wahrscheinlichkeit seltene Arten zu detektieren und erlaubt potenziell aussagekräftigere Indices zur Gewässergüte zu entwickeln. Zudem empfehlen wir, in passenden Quellwasserfassungen (Möglichkeit Netze zu befestigen, niedrige bis mittlere Schüttung, siehe Abschnitt 4.1 *Feldarbeit*) ebenfalls zweimal jährlich eine Probenahme mittels konventioneller Methode, um Makroorganismen zu beproben.

Wie erfolgt die Beprobung an einer Grundwassermessstelle? Was ist der Aufwand?

Die Beprobung an der Grundwassermessstelle hängt von der gewählten Methode ab. Bei eDNA werden 3 x 5 Liter Wasser aus der Probenstelle entnommen und durch einen Kapselfilter filtriert. Der zeitliche Aufwand dafür beträgt ca. 1 h pro Messstelle, wobei dies v. a. die Zeit für die Filtration beinhaltet, während der auch andere Arbeiten möglich sind. Als konventionelle Methode empfehlen wir die Verwendung eines Filternetzes am Einlaufrohr der Quellwasserfassungen. Das Filternetz sollte zwei Wochen im Voraus montiert werden (ca. 10 min Aufwand), die eigentliche Probenahme dauert ca. 30 Minuten und kann zeitlich parallel zur eDNA Probennahme erfolgen.

Fortsetzung auf nächster Seite

Welche Labors können die Analysen durchführen (in der Schweiz und im Ausland)? Wie ist die Verfügbarkeit dieser Labors?

Es gibt kommerzielle Anbieter für eDNA-Analysen in der Schweiz sowie in den Nachbarländern. Die Bestimmung der konventionellen Proben (taxonomische Bestimmung) erfolgt vergleichbar mit dem BDM durch ausgewählte ExpertInnen, und müsste nach taxonomischen Gruppen aufgegliedert werden. Expertise für die Bestimmung von Flohkrebse besteht in der Schweiz and der Eawag in der Forschungsgruppe von Florian Altermatt; für weitere taxonomische Gruppen wird auf die in Oberflächengewässern akkreditierten Taxonomen verwiesen.

Welche Art von Qualitätssicherung wird durchgeführt?

Aktuell gibt es für eDNA-Analysen noch keine einheitlichen Qualitäts-Standards, diese sind jedoch in der Entwicklung. Für die Schweiz empfiehlt sich die Umsetzung bestehender Normen (z. B. DIN EN 17805) und international anerkannter Laborstandards (ISO 9001/17025). Ringtests mit Referenzproben können die Leistung von Labors objektiv bewerten und so die Qualität von eDNA-basiertem Monitoring sichern, sowohl für Grundwasser als auch andere aquatische Systeme.

Was sind die Analytikskosten?

Die Kosten einzelner Anbieter sind nicht bekannt, da diese meist Projektbasiert arbeiten. Je nach Szenario kann man jährlich mit eDNA-Analysekosten im unteren bis mittleren fünfstelligen Bereich rechnen (Analysekosten pro Probe bewegen sich im Bereich von einem mittleren dreistelligen Betrag).

4.1 – Szenarien

Für ein schweizweites Monitoring der Biodiversität im Grundwasser gibt es mehrere Ansätze, die sich in ihrem Aufwand und den entsprechenden Kosten relativ stark unterscheiden. Es können zwei Grundmethoden unterschieden werden: Das Anknüpfen an ein bestehendes Monitoringnetzwerk, zum Beispiel an NAQUA (Abbildung) oder das Erstellen eines komplett neuen Monitoringnetzwerkes, welches auf einem neuen Raster ähnlich dem bereits etablierten Biodiversitätsmonitoring (BDM) der Schweiz beruht. Diese beiden Ansätze haben einen anderen Fokus und erlauben unterschiedliche Aussagen hinsichtlich der Grundwasserbiodiversität.

Ein **Anknüpfen des Monitorings an die Nationale Grundwasserbeobachtung NAQUA** erlaubt es, vorhandene Infrastruktur und Messdaten zu nutzen. Die Messstellen insbesondere des Moduls TREND sind gut charakterisiert. Ausserdem sind langjährige Datenreihen sowohl von kontinuierlichen Aufzeichnungen des Wasserstands/Abflusses, der Wassertemperatur und elektrischen Leitfähigkeit als auch Stichproben von Substanzen wie zum Beispiel Chlorid, Sulfat, Nitrat, Pflanzenschutzmittel, flüchtige halogenierte Kohlenwasserstoffe (FHKW) und Abwasserindikatoren sind vorhanden. Diese bereits etablierten Zeitreihen zu den physikalisch-chemischen Bedingungen (Zustand und Veränderung) an den Messstellen müssen als grosser Vorteil betrachtet werden.

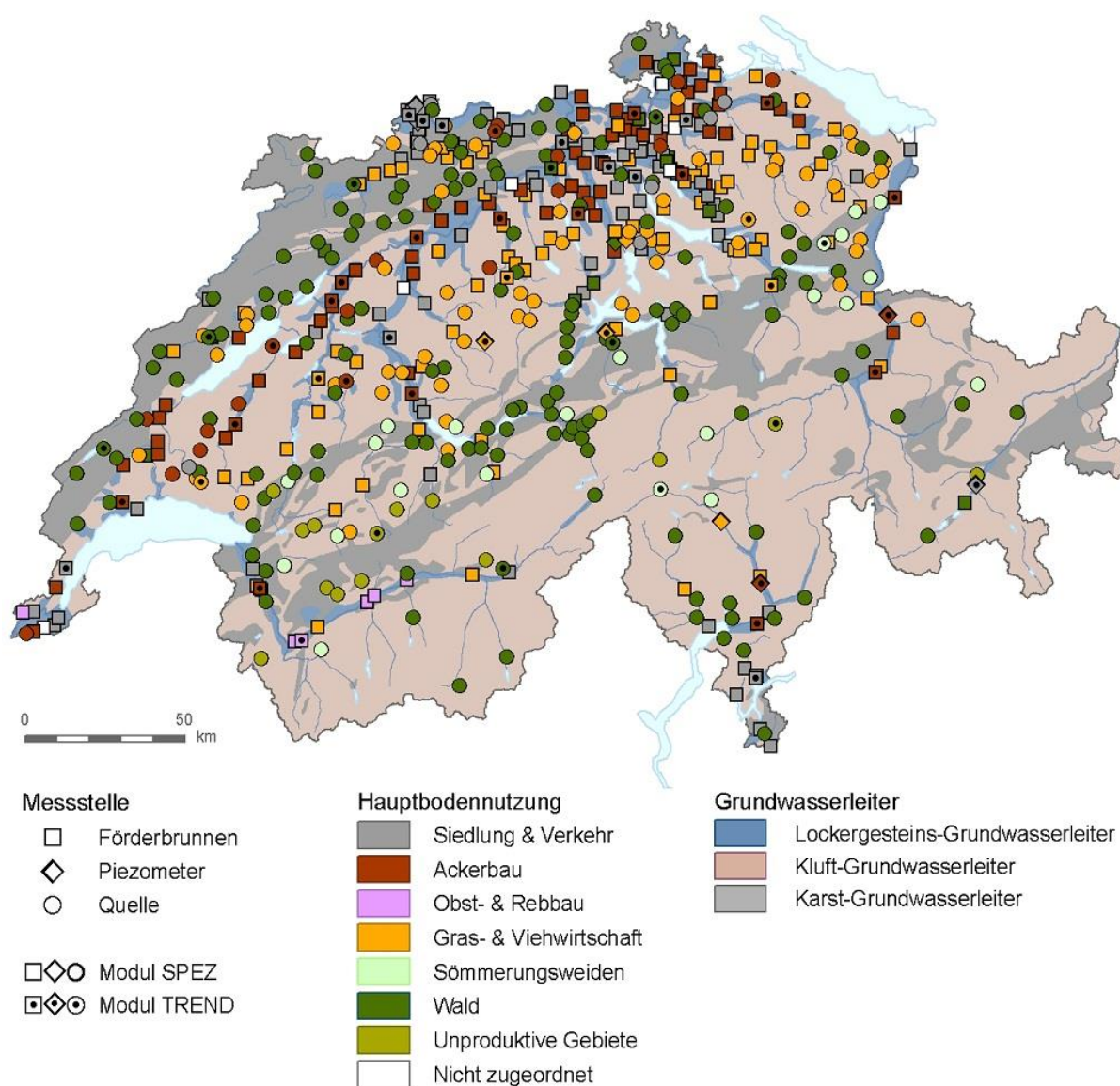


Abbildung 6: Übersicht der Messstellen innerhalb des NAQUA Monitoringprogramms in der Schweiz 2015. Quelle: BAFU (2019b).

Die Eingliederung ins bestehende NAQUA Monitoringprogramm deutlich effizienter und ressourcenschonender, als ein neues Programm aufzustellen. Ein Monitoring der Biodiversität an diesen Messstellen erlaubt eine lokale Charakterisierung der Fauna, auch hinsichtlich verschiedener menschlicher Einflüsse. Diese Auswahl der Probenahmestellen ist aber allenfalls nicht optimal geeignet, um den natürlichen Referenzzustand der Grundwasserbiodiversität in der Schweiz abzubilden.

Die zweite Variante, nämlich ein **Monitoringnetzwerk von Grund auf neu** zu erstellen, erlaubt eine repräsentativere Charakterisierung der Biodiversität im Grundwasser in der Schweiz und sollte als Goldstandard für ein Biodiversitätszentriertes Monitoring gesehen werden. Es ist allerdings mit erheblich mehr Aufwand verbunden und daher schwieriger umzusetzen. Ähnlich dem bestehenden Schweizer BDM kann hier ein auf einem Raster basierendes Netzwerks erstellt werden, um dort mittels regelmässigen Monitorings repräsentative Daten über die ganze Schweiz zu erfassen. Dieser Ansatz bedarf der Schaffung neuer Infrastruktur, vor allem neuer Zugänge zum Grundwasser (z.B. einrichten neuer Piezometer), da nicht überall auf vorhandene Infrastruktur zurückgegriffen werden kann. Auch die Erhebung physikalisch-chemischer Parameter zur Charakterisierung der Grundwasserqualität müsste an diesen Messstellen in Betracht gezogen werden. Ein solches Szenario ist nicht nur kostenintensiver, sondern auch komplexer, da hier mehrere externe Parteien (z. B. Gemeinden, Kantone, Grundbesitzer) miteinbezogen werden müssen. Hinsichtlich der biologischen Aussagekraft wäre dies jedoch das optimale Szenario, da eine repräsentative Abdeckung bezüglich geologischer Variation, unterschiedlicher Landnutzung sowie entlang von anthropogenen Nutzungsdrücken möglich wäre.

Tabelle 6: Kurzübersicht über die Umsetzbarkeit der vorgeschlagenen Szenarien. Die Szenarien sind komplementär und aufeinander aufbauend. D.h., es könnten mittelfristig auch mehrere sich ergänzende Monitoring-Module umgesetzt werden. Die Farben zeigen den Aufwand und die Umsetzbarkeit der Szenarien mit der jeweiligen Methode. Grün = relativ einfach in bestehende Monitoringprogramme integrierbar und sofort umsetzbar, Gelb = zusätzliche Messstellen, teilweise Mangel an taxonomischer Expertise, jedoch mittelfristig umsetzbar, Rot = sehr grosser Aufwand und aktuell noch nicht umsetzbar.

Umsetzbarkeit der Szenarien und Probenahmemethoden				
	Anzahl Messstellen	eDNA	Fauna	eDNA + Fauna
Szenario 1 NAQUA TREND – BIO	50			
Szenario 2 NAQUA TREND – BIO+	75–100			
Szenario 3 GBDM	>100			

Im Folgenden beschreiben wir konkrete Szenarien, schätzen deren Umsetzbarkeit ab (Tabelle 6), vergleichen Aufwand, Vor- und Nachteile und geben Empfehlungen hinsichtlich Aussagekraft und Anwendungsbereitschaft (Tabelle 7).

Szenario 1: «NAQUA TREND – BIO»

Das Szenario «NAQUA TREND – BIO» würde das Basisprogramm des Moduls NAQUA TREND um einen Biodiversitätsaspekt erweitern. An den bestehenden Messstellen würden die Biodiversität im Grundwasser mittels Umwelt-DNA basierten Proben ergänzt. Dieses Szenario führen wir unten ausführlich aus. Optional könnte dieses Szenario vor allem an Quellwasserfassungen mittels der konventionellen Methode ergänzt werden, um die eDNA-Daten um Abundanzen zu erweitern und den Auf- und Ausbau von genetischen Referenzdatenbanken zu ermöglichen.

Messstellennetz

NAQUA Trend besteht aus 50 Messstellen in oberflächennahen Grundwasserleitern, die seit 1996 regelmässig beprobt werden (BAFU, 2019b). Die Messstellen sind repräsentativ ausgewählt über die gesamte Schweiz und bestens charakterisiert hinsichtlich ihres physikalisch-chemischen Zustands. Von den ausgewählten Messstellen sind 31 über Förderbrunnen, vier über Piezometer und 15 über Quellen erschlossen. Insgesamt werden alle Haupt-Aquifertypen abgedeckt, mit 37 Messstellen im Lockergestein und 13 im Festgestein. Der Schwerpunkt der Bodennutzung in den Zuströmbereichen liegt auf menschlich geprägten Flächen. An 39 Messstellen dominiert entweder Siedlungs- oder Landwirtschaftsnutzung, während 11 Messstellen in naturnahen Gebieten wie Wald, Sömmerungsweiden oder unproduktiven Flächen liegen (BAFU, 2019b).

Feldarbeit

Die eDNA-Proben können analog der bereits erfolgten eDNA-Studie der Eawag gesammelt werden (Couton et al., 2023a). Dazu werden an den Probestellen 3 x 5 Liter Wasser direkt entnommen, diese vor Ort durch Einwegfilter filtriert (0,22 µ oder 0,45 µ) und sofort mittels Longmire-Puffer fixiert. Um auch die saisonale Variabilität der Grundwassergemeinschaften zu erfassen, sollte diese Beprobung im optimalen Fall für jede Saison erfolgen, wobei wir minimal zwei Probenahmen im Jahr empfehlen. Dies würde je nach Ausführung von 300 (2 x jährlich) bis 600 (4 x jährlich) eDNA-Proben pro Jahr entsprechen (exklusive PCR-Replikate sowie Negativ- und Positivkontrollen). Dieses Monitoring baut komplett auf NAQUA TREND auf und die bestehenden Strukturen kann zurückgegriffen werden. Durch die Integration der eDNA-Probenahmen in das bestehende Programm müsste mit einem zusätzlichen zeitlichen Arbeitsaufwand pro Probestelle gerechnet werden. Für die eDNA-Probenahme bei parallel durchgeführter Filtration der Replikate wird der reine Zeitaufwand pro Probestelle auf etwa 1–1,5 Stunden geschätzt (Probennahme: Filtrieren, Puffern der Filter, ohne Anfahrt).

Parallel dazu können in den TREND Quellwasserfassungen zweimal im Jahr oder gleich oft wie im eDNA-Monitoring, konventionelle Proben entnommen werden. Dazu wird die bereits etablierte Methode für die Beprobung in Quellwasserfassungen empfohlen (Knüsel et al., 2024c; Appendix 3). Da jede Quelfassung eine individuelle bauliche Ausführung aufweist, muss die Beurteilung der Probenahmemöglichkeiten direkt vor Ort, idealerweise zusammen mit dem Brunnenmeister, erfolgen. Grundvoraussetzung für die konventionelle Beprobung ist ein zugängliches Einlaufrohr, da das Filternetz so montiert werden muss, dass das Wasser vollständig durch das Netz strömt. Quelfassungen ohne entsprechendes Einlaufrohr sind daher ausgeschlossen. Die verwendeten Filternetze besitzen einen inneren Öffnungsdurchmesser von 17 cm und eine Netztiefe von rund 43 cm. Der Hersteller gibt für diese Filterfläche eine maximale Durchflussrate von 20 m³/h ($\approx$ 5.6 L/s) an. Schüttungen unterhalb dieses Werts sind unproblematisch; in der Praxis konnten die Netze jedoch auch bei deutlich höheren Schüttungen erfolgreich eingesetzt werden. Der limitierende Faktor ist primär der Durchmesser des Einlaufrohres. Bei Rohrdurchmessern bis 17 cm ist die Montage in der Regel problemlos möglich. Weicht der Rohrdurchmesser nur um wenige Zentimeter davon ab, kann der Ring des Filternetzes aufgeschnitten werden, sodass die Probenahme meist weiterhin gut funktioniert (vgl. Fotos 1 und 2 im Probenahmeprotokoll, Appendix 3). Ist das Einlaufrohr jedoch deutlich grösser als die Netzöffnung, lässt sich das Netz nicht mehr zuverlässig montieren; gleichzeitig sind solche Quelfassungen typischerweise auch mit zu hohen Schüttungen verbunden. In den geeigneten TREND Quellwasserfassungen würde ein Filternetz mit 0,8 mm Maschenweite wie beschrieben mittels grosser Kunststoffkabelbindern direkt am Einlaufrohr befestigt und nach einer Filterperiode von zwei Wochen auf Organismen kontrolliert werden. Die Befestigung des Filternetzes am Einlaufrohr sollte bestenfalls durch die lokalen Brunnenmeister durchgeführt werden (ca. 10 min Aufwand, ca. zwei Wochen vor dem eigentlichen Probenahmedatum). Am eigentlichen Probenahmedatum der NAQUA Probenahmen würde das Filternetz dann durch METAS auf Organismen kontrolliert und diese eingesammelt werden. Der Arbeitsaufwand für das Einsammeln der Organismen wird auf ca. 30 Minuten pro Probestelle geschätzt. Zusätzlich zum Vorgehen in Quellwasserfassungen könnten weitere Standorte faunistisch beprobt werden. Eine Option ist die Beprobung der vier Piezometer des TREND-Messstellenmittels eines Planktonnetzes nach Vorbild des Baden-Württembergischen Grundwassermonitorings.

Labor und Auswertung eDNA

Das ausführende Labor muss den Mindestanforderungen eines eDNA-Labors gerecht werden (siehe Abschnitt 3.2). Im Labor muss auf ausreichende technische Replikation geachtet werden, und das ausführende Labor sollte mit minimal drei PCR-Replikaten (mit eigenem Tag zur späteren Qualitätskontrolle) pro Probe arbeiten. Das entspricht 900–1800 Einzelreaktionen pro Primer (ohne

negative und positive Kontrollen). Als Marker-Gene (siehe Abschnitt 3.2) empfehlen wir sowohl COI (Couton et al., 2023) als auch 16S (z. B. Vos et al., 2012), da damit sowohl eukaryotische Invertebraten als auch mikrobielle Diversität abgedeckt werden kann. Die mittlere Sequenziertiefe pro Probe sollte 10^5 (paired-end) Reads nicht unterschreiten, was in diesem Szenario zwischen 4,5 und 9 Sequenzierruns (bei Illumina Miseq V3 Technologie) pro Jahr entspricht.

Bioinformatische Pipeline

Für ein neu zu startendes Monitoring empfehlen wir, die resultierenden Rohdaten sowohl bei Eukaryoten als auch bei Bakterien auf ASV-Level zu analysieren. Als Referenz kann hier die Erfahrung aus wissenschaftlichen Arbeiten zu eDNA im Grundwasser, wie die Arbeit von Couton et al. (2023) dienen (<https://github.com/joarwrie/NiphToess>). Wichtiger als die eingesetzten Softwarepakete ist eine lückenlose Dokumentation der angewandten Methoden, Filter-Grenzwerte, Qualitätskontrollen und langfristige Speicherung der Sequenzier-Rohdaten. Andernfalls sind ASVs, die aus unterschiedlichen bioinformatischen Pipelines generiert wurden, nur schwer miteinander vergleichbar (siehe auch Pawlowski et al., 2020). Ab dem Moment, in dem die Sequenzen als ASV vorliegen, können diese Daten wie konventionelle Artlisten behandelt werden. Anhand der vorhandenen Referenzdatenbanken können diese Sequenzen in diesem Schritt einem Taxon (Art, Gattung, oder höhere Klassifizierung; siehe Kapitel 4.3) zugeordnet werden, dafür kann wiederum auf die Erfahrungen aus Couton et al. (2023) zurückgegriffen werden., können diese Sequenzen in diesem Schritt einem Taxon (Art, Gattung, oder höhere Klassifizierung; siehe Kapitel 4.3) zugeordnet werden, dafür kann wiederum auf die Erfahrungen aus Couton et al. (2023) zurückgegriffen werden.

Auswertung der konventionellen Proben

Falls optional zusätzlich konventionelle, faunistische Proben genommen würden, sollte die Identifikation auf das tiefstmögliche Niveau erfolgen und kann bei einigen Gruppen mit vorhandener Expertise, wie z. B. Flohkrebse, bis auf Artniveau erfolgen. Die taxonomische Identifikation sollte nicht nur rein morphologisch, sondern auch anhand genetischem Barcoding erfolgen, damit die Datenbanken weiter aufgebaut als auch potenzielle kryptische Arten identifiziert werden können. Für die Grundwasserflohkrebse könnten die morphologischen Analysen sowie das Barcoding in der ersten Phase des Monitorings durch die Eawag durchgeführt werden.

Analyse der Daten

In einem ersten Schritt sollten mit den erhobenen Biodiversitätsdaten (ASV-Listen, eDNA basierte Taxonlisten, konventionell erhobene Artlisten) Referenzzustände an den einzelnen Messstellen untersucht

werden. Aufgrund der gut charakterisierten TREND-Messstellen können in diesem Modul generierte Biodiversitätsdaten mit vorhandenen Messdaten (kontinuierlich und Stichproben) und Metadaten der Messstelle wie Bodennutzung, Grundwasserleitertyp, Geologie kombiniert werden. Mithilfe von statistischen Analysen wie Redundanzanalysen (RDA) können Faktoren, welche Einfluss auf die Artenzusammensetzung im Grundwasser haben, identifiziert werden. Ausserdem gruppieren diese Analysen Gemeinschaften basierend auf Ähnlichkeiten in der Artenzusammensetzung, was es ermöglicht, biogeographische Grundwasserzonen zu identifizieren. Als Vorbild für die Analyse kann hier der Bericht aus Deutschland von 2014 dienen, welcher eine solche Klassifizierung für Deutschland macht (Griebler, et al., 2014).

Sobald diese ersten Referenzzustände identifiziert sind, kann aufbauend darauf an weiteren Analysen, wie der Entwicklung von Indizes (siehe 4.5 - Horizon Scanning), gearbeitet werden.

Umsetzbarkeit

Dieses Szenario ist aus unserer Sicht realistisch und bedarf kaum zusätzlichen Forschungsbedarf. Wir empfehlen, dieses Szenario so bald wie möglich zu starten (siehe Punkt 4.4 bezüglich Anknüpfungspunkte zum NFP 82 Projekt FutureProof), bestenfalls mit wissenschaftlicher Begleitung über die ersten vier Jahre (siehe Abschnitt 4.2 und 4.4.).

Arbeitsaufwand und geschätzte Kosten

Insgesamt würde dieses Szenario 1 bei der Feldarbeit zu einem zusätzlichen Arbeitsaufwand von mindestens 100–150 Stunden (bei 1–1,5 Stunden pro Stelle und 50 Messstellen die 2-mal beprobt werden) führen, falls nur eDNA beprobt wird. Die konventionelle Besammlung in den 15 Quellwasserfassungen baut auf einer Zusammenarbeit mit Brunnenmeistern, welche jeweils 2 Woche vor der Probenahme ein Netz installieren. Dadurch kann der zusätzliche Aufwand tief gehalten werden und die konventionellen Proben während der eDNA-Probe eingesammelt werden. Durch den Fokus auf eDNA und bereits erprobten konventionellen Methoden in Quellwasserfassungen bedarf dieses Szenario keiner grundlegender Änderung des bestehenden Monitorings, und kann durch Probenahmeteam durchgeführt werden (allenfalls unterstützt durch die Installation der Filternetze durch die Brunnenmeister).

Die jährlichen Sequenzierkosten für die DNA-Analysen durch kommerzielle Anbieter sind schwer abschätzbar, da die meisten dieser Anbieter mit Rahmenverträgen arbeiten. Da Skaleneffekte bei eDNA-Analysen grössere Probenmengen nicht linear teurer machen, werden die meisten der Anbieter mit vermehrter Probenzahl günstiger. Zudem gibt es das Potenzial, Grund- und Oberflächengewässeranalysen zukünftig zu kombinieren, was den Preis pro Probe deutlich senken dürfte. Die jährlichen Analysekosten

belaufen sich hier je nach gewählter Probenhäufigkeit, Sequenziertiefe, finaler Anzahl von Proben und der Anzahl von Primern im tiefen- bis maximal mittleren fünfstelligen Bereich (CHF), und würden die gesamten Laborkosten, Material sowie Sequenzierungen umfassen.

Das konventionelle Monitoring kann parallel zur Probenahme der eDNA erfolgen, erfordert aber einen zweimaligen Zugang zur Probestelle (Installieren der Filternetze zwei Wochen vor der Probenahme, allenfalls durch Brunnenmeister. Danach Leeren der Filternetze zeitgleich mit der eDNA-Probenahme). Der grösste Aufwand in diesem Zusatzmodul ist die Auswertung der Proben, da diese schlecht skalierbar ist: bei doppelt so vielen Proben entsteht doppelt so viel Aufwand/Kosten, während bei eDNA-Proben der Aufwand/Kosten pro Probe mit zunehmender Probezahl sinkt. Als Richtwert: Für die Analyse einer Einzelprobe mit EPT-Arten für das Indikatorset 6 «Makrozoobenthos» für die Wirkungskontrolle Revitalisierung werden dafür pro Probe 2,5–5 Stunden für eine Identifikation auf Artniveau veranschlagt (BAFU, 2019a). Dieser Zeitaufwand fällt für jede Probe gleich an, unabhängig davon, wie viele Proben schlussendlich gesammelt werden. Es dürfte mit ähnlichen bis niedrigeren Zeiten für die Bestimmung der Grundwasserorganismen gerechnet werden, da allgemein weniger Organismen erwartet werden können. Im Fall des Szenario 1 führt dies zu ca. 40–75 Personenstunden für die reine morphologische Auswertung in 15 Quellwasserfassungen. Die Kosten hängen jedoch von der Anzahl tatsächlich besammlbarer Quellwasserfassungen, der Anzahl der Beprobungen sowie der Verfügbarkeit der Experten, deren Stundensätzen und der taxonomischen Tiefe ab.

Optimierungspotenzial und offene Fragen

Auch bei der etablierten eDNA-Methode gibt es bezüglich dieses Szenarios Optimierungsmöglichkeiten. Wahrscheinlich wird sich der Zeitaufwand im Feld durch die Anzahl an parallel filtrierbaren Einheiten und optimale Abstimmung mit den anderen zu messenden Parametern noch weiter reduzieren. Ausserdem kann sowohl die Laboranalyse als auch die folgende Datenanalyse weitgehend automatisiert werden, wenn das Probenvolumen insgesamt hoch genug ist (abhängig vom Labor). Die Referenzdatenbank kann parallel zum laufenden Monitoring weiter ausgebaut werden und bereits generierte Sequenzen können in einigen Jahren erneut referenziert werden. Diese Optimierungen könnten durch ein begleitendes Forschungsprojekt der Eawag gemacht werden.

Für die Beprobung mittels der konventionellen Methode muss abgeklärt werden, an welchen der 50 NAQUA-TREND-Messstellen ein solches überhaupt möglich ist. Die Grundvoraussetzungen sind dabei ein direkter Zugang zum Grundwasserleiter, welcher das Absenken eines passenden Netzes oder Montieren eines Filternetzes ermöglicht. Allenfalls ist abzuklären, an welchen der NAQUA TREND Quellfassungen die Installation eines Filternetzes möglich ist und ob es weitere geeignete Messstellen gibt,

z. B. solche, die mit Planktonnetzen in vertikalen Messrohren beprobt werden könnten. Teilweise muss auch die notwendige taxonomische Expertise in der Schweiz erst geschaffen werden (Ausnahme: Flohkrebse), oder auf die taxonomische Expertise zu anderen Artgruppen in Deutschland/Österreich zurückgegriffen werden. Auch diese Anpassungen auf das beschriebene Szenario könnten durch ein begleitendes Forschungsprojekt der Eawag gemacht werden.

Aussagekraft

Szenario 1 ermöglicht einen qualitativen Einblick in die Schweizer Grundwasserbiodiversität auf Basis referenzierter DNA-Sequenzen sowie in taxonomiefreier Form. Quantitative Angaben oder zur exakten Herkunft des DNA-Signals können jedoch nicht gewonnen werden. Je nach Beprobungsfrequenz kann eine zeitliche und räumliche Aussage über die Grundwasserbiodiversität und deren Variabilität gemacht werden. Zudem erlaubt dieses Szenario eine gesamtheitliche Analyse der Biodiversität von bakterieller Diversität (eDNA) bis hin zu Makroinvertebraten (eDNA- und konventionelle Methoden). Die konventionelle Methodik ergänzt dabei die qualitative Aussage durch (semi-)quantitative Aussagen über die Abundanzen der Invertebraten, vor allem grösseren Organismen wie Flohkrebse. Ausserdem erlaubt die Ergänzung mit der konventionellen Sammlung die Erstellung besserer Referenzdatenbanken, sowie die Analyse der genetischen Diversität und der Identifikation von kryptischen Arten.

Dieses Szenario wäre räumlich auf die bestehenden 50 NAQUA TREND-Messstellen beschränkt, die nicht gleichmässig auf die Schweiz verteilt sind. Daher können nur teilweise Aussagen über den Referenzzustand der Biodiversität im Grundwasser getroffen werden.

Szenario 2: «NAQUA TREND – BIO+»

Dieses Szenario würde das obige Szenario NAQUA TREND – BIO um weitere, vor allem naturnahe Messstellen, ergänzen. So könnte das Monitoring auf ein balanciertes Probedesign (z. B. 75–100 Messstellen) erweitert werden, auch um menschlich wenig beeinflusste Messstellen sowie bisher unzureichend abgedeckte Nutzungsformen stärker zu berücksichtigen. Damit wäre eine ausgewogenere Erfassung der Biodiversität hinsichtlich des naturnahen Zustands einzelner Habitate möglich. Die Methodik der Probenahme bleibt grundsätzlich gleich. **Dieses Szenario wäre das vielversprechendste um ein aussagekräftiges, Monitoring des Grundwassers bezüglich Biodiversität und ökologischer Funktionalität zu etablieren. Es ist als Szenario auch in einem zweistufigen Verfahren umsetzbar. In einer ersten Phase sollte es um das Etablieren und Umsetzen der Methode in den bisherigen NAQUA TREND Messstellen gehen (kann in einem Zeitrahmen von 1–3 Jahren umgesetzt werden) und in einer zweiten Phase sollten die etablierten Methoden auf zusätzliche Probestandorte ausgeweitet werden.**

Auswahl der zusätzlichen Messstellen

Um die Probestellen zu erweitern und auf ein repräsentativeres Messstellennetz abzustützen, gibt es mehrere Möglichkeiten: eine Erstellung von Belastungskarten für die ganze Schweiz als Grundlage für die weitere Auswahl, Aufgreifen von Erkenntnissen aus Studien zu Biodiversitätshotspots in der Schweiz. Ersteres erfordert ein Projekt, um potenzielle Grundwasserbelastungskarten für die Schweiz zu erarbeiten. Hierfür kann auf Erfahrungen aus einem Projekt in Österreich zurückgegriffen werden, in dem basierend auf Sauerstoffgehalt, Temperatur und einigen weiteren abiotischen Parametern eine Grundwasserbelastungsklassifizierung erarbeitet und auf ganz Österreich extrapoliert wurde (Englisch & Griebler, persönliche Kommunikation).

Für Variante zwei kann auf bestehende Daten zu Biodiversitätshotspots einzelner Gruppen in der Schweiz aufgebaut werden. So konnten für Flohkrebse in der Schweiz Biodiversitätshotspots im Jura sowie im Tösstal ausgemacht werden (Knüsel et al., 2024c). Daneben wurde auch eine Vielzahl von Arten nur in einzelnen Quellwasserfassungen nachgewiesen, was ein sehr starker Hinweis ist, dass viele Arten nur sehr lokal vorkommen. Darauf aufbauend könnten Messstellen in diesen Hotspots für ein regelmässiges Monitoring herangezogen werden, aber auch Messstellen, welche als «Cold-Spot» gelten und kaum bis gar keine Nachweise von Flohkrebse haben. Weiter kann die Auswahl basierend auf der Landnutzung erfolgen, um möglichst naturnahe und in NAQUA unterrepräsentierte Gebiete zu ergänzen. Für alle Varianten gilt jedoch, dass auf bestehende Infrastruktur zurückgegriffen werden sollte. Die Auswahl und

spezifische Lage der zusätzlichen Messstellen könnte im Rahmen einer gutachtlichen Tätigkeit erstellt werden, ähnlich wie dies für oberirdische Gewässer getätigt wurde (Wüthrich & Altermatt 2019).

Für die Beprobung müsste das bestehende NAQUA Monitoringprogramm um zusätzliche Messstellen ausgeweitet werden. Insgesamt würde dieses Szenario zu einer zusätzlichen Arbeitsbelastung bei der eDNA Beprobung und bei entsprechender Implementation auch bei der konventionellen Beprobung, führen. Die eDNA-Probenzahl steigt dabei dementsprechend auf das Doppelte des Szenario 1 (bei 100 Messstellen). Das bedeutet, es ist mit 600–1200 Proben pro Jahr zu rechnen ($100 \text{ Messstellen} \times 3 \text{ Replikate} \times 2/4 \text{ Beprobungen}$), was bei der Analyse mit den in Szenario 1 beschriebenen Primern zu 3200 ($600 \times 3 \text{ PCR-Replikate} \times 2 \text{ Primer}$) – 7200 ($1200 \times 3 \times 2$) einzelnen Proben zum Sequenzieren, und damit zu 8–18 Sequenzierruns, führt. Insgesamt liegen die groben jährlichen eDNA-Analysekosten im mittleren bis hohen fünfstelligen Bereich, wiederum abhängig von der genauen Anzahl der Probestellen, dem Stundenbedarf für die Beprobung und Labor und der Anzahl untersuchter Proben. Ähnliches gilt für die konventionellen Beprobungen, welche wiederum mit ca. 30 Minuten pro Probenstelle zum Einsammeln der Organismen und 2,5–5 Stunden pro Mischprobenauswertung zu Buche schlägt.

Szenario 3: «GBDM» (Grundwasserbiodiversitätsmonitoring)

Szenarien 1 und 2 fokussieren auf ein nutzungsorientiertes Monitoring und sind daher nicht vollständig repräsentativ für die Biodiversität in der Schweiz, sondern beziehen sich auf vorhandene NAQUA-Messstellen. Um ein repräsentatives Monitoring der Grundwasserbiodiversität zu erhalten, müsste ein separates Messstellennetz eingerichtet werden. Als Grundlage könnte das Schweizer BDM für Gewässer dienen, das 590 regelmässig untersuchte Rasterzellen umfasst (BDM 2011). Für dieses Szenario müsste evaluiert werden, wie viele der einzelnen Rasterzellen durch die bestehende Infrastruktur abgedeckt werden könnten (ca. 17'000 Quellwasserfassungen in der Schweiz) und für wie viele Rasterzellen tatsächlich neue Messstellen erforderlich wären. Für diese noch nicht abgedeckten Rasterzellen müssten neue Zugänge ins Grundwasser geschaffen werden müssen, was hohe anfängliche Kosten (reine Bohrkosten pro Standort zwischen 6000 und 18'000 CHF, auch abhängig von der Tiefe) verursachen würde. Die Auswahl der insgesamt zu beprobenden Rasterzellen kann sich dabei an Modellierungen, wie in Szenario 2 beschrieben, oder direkt am BDM-Raster orientieren.

Aussagekraft

Dieses Szenario wäre hinsichtlich der Aussagekraft über die Biodiversität im Schweizer Grundwasser am aussagekräftigsten zu bewerten. Mit dem Rastermodell würde sichergestellt werden, dass es zu einer gleichmässigen Verteilung der Messstellen und damit auch zu einer Abdeckung aller potenziellen Grundwasserlebensräume, Oberflächennutzungen und geologischen Besonderheiten kommt. Dies wäre vor allem in Bezug auf den hohen Endemismus und die kleinräumige Verbreitung vieler Grundwasserarten ein Vorteil. Ein dem BDM-analoges Proberaster würde eine repräsentative Abdeckung der Grundwasserlebensräume in der gesamten Schweiz ergeben, allerdings fehlen bestehende langfristige Daten zur Wasserqualität. Zudem müssten wohl neue Zugänge zum Grundwasser erstellt werden.

Aufgrund des schwer abschätzbaren Erstaufwands (Etablierung neues Messstellennetz) und des zu erwartenden hohen Personalaufwandes (grosse Probenmenge, nicht durch bestehendes Monitoring NAQUA abgedeckt) wird hier an dieser Stelle keine Schätzung zu den Kosten vorgenommen. Das Szenario kann aber als Idealmodell gesehen werden, an dem man sich langfristig ausrichtet. Wir empfehlen, kurzfristig auf einen Fokus auf die Umsetzung von Szenario 1 oder 2 zu legen und dieses Szenario mittel- bis langfristig als Idealszenario bezüglich Messstellennetz anzusehen.

Nächste Schritte

In einer ersten Pilotphase könnte die Umsetzung eines Monitoringprogramms oder -moduls gemäss den aufgeführten Szenarien (Tabelle 7) von der Eawag im Rahmen eines Forschungsprojektes begleitet

werden. Idealerweise würde diese Pilotphase baldmöglichst beginnen, da sie bereits Daten liefern würde, die für eine weitere Evaluierung und Etablierung der Referenzzustände im Grundwasser herangezogen werden könnten. Zudem könnte in dieser Phase die eDNA-Methodik, vor allem für die Probennahme im Feld, verfeinert und adaptiert werden. Aufbauend auf dieser Pilotphase könnten Indices zum Zustand der Grundwasserbiodiversität erarbeitet werden, welche im weiteren Verlauf für die ökologische Bewertung notwendig sind. Die ersten Analysen im Rahmen der Pilotphase könnten an der Eawag durchgeführt werden, langfristig müsste jedoch die notwendige Infrastruktur geschaffen oder kommerzielle Anbieter genutzt werden. Ausserdem könnten im Rahmen der Pilotphase die Infrastruktur zur Lagerung der Daten sowie der Umgang mit DNA-Extrakten erarbeitet und festgelegt werden. Diese könnte zusammen mit Überlegungen für ein Umwelt-DNA Monitoring in Oberflächengewässern geschaffen werden.

Im bevorstehenden Nationalen Forschungsprojekt (siehe Kapitel 4.4 NFP 82 Projekt «FutureProof», November 2025–Oktober 2029) ist vorgesehen, Standards für die Probenahme, Probelagerung und Analyse von Gewässer-eDNA-Proben zu etablieren. Im Rahmen von FutureProof könnten – unter Annahme, dass die Proben aus einem Grundwassermonitoring rechtzeitig zur Verfügung stehen (Szenario 1) – erste Analysen durchgeführt und mögliche Referenzindices entwickelt werden. Um bezüglich Grundwasserbiodiversitätsmonitoring von den Forschungsarbeiten im Rahmen des NFP82 Projektes profitieren zu können, wird daher ein möglichst baldiger Beginn der Datenerhebung gemäss Szenario 1 empfohlen.

Tabelle 7: Detaillierte Übersicht über die vorgestellten Szenarien mit einer farblichen Kodierung bezüglich der Umsetzbarkeit und dem direkten Methodenvergleich. Die Farbe der Zellen markiert, wie gross die Unsicherheiten in den Aussagen der betreffenden Methoden sind resp. wie unmittelbar die Methode einsetzbar ist. Grün = Geringen Unsicherheiten/unmittelbar einsetzbar/Methode etabliert; Gelb = Unsicherheiten bestehen/mittelfristig einsetzbar/noch offene methodische Fragen; Rot = Grundlegende Forschungsfragen offen/nur langfristig einsetzbar.

	Anzahl Messstellen	Kosten	Zeitaufwand (Feld)	Zeitaufwand (Labor/ Auswertung)	Qualitative Aussagekraft (Biodiversität)	Quantitative Aussagekraft (Abundanzen)	Technology readiness
		eDNA Konventionell	eDNA Konventionell	eDNA Konventionell	eDNA Konventionell	eDNA Konventionell	eDNA Konventionell
Szenario 1 NAQUA TREND – BIO	50						
Szenario 2 NAQUA TREND – BIO+	75–100						
Szenario 3 GBDM	100–500						

4.2 – Verantwortlichkeiten und Aufgabenverteilung

Wer könnte ein solches Monitoring (eDNA oder konventionell) durchführen?

Sowohl für die Analyse und Beprobung von eDNA wie auch für konventionelle Beprobungen und Auswertungen, kommen kommerzielle Anbieter in Frage. Öffentliche Forschungseinrichtungen wie die Eawag können die Umsetzung eines Monitorings wissenschaftlich begleiten: Sie könnten bei der ersten Durchführung des Monitorings, bei der Etablierung von Indices und bei ersten Analysen unterstützen. Längerfristig müsste die Rolle von öffentlichen Forschungsinstituten auf Beratung, Ringtests und Qualitätskontrolle beschränkt werden.

Probenahme im Feld

Für die Probenahme in NAQUA TREND – BIO käme METAS in Frage, da diese bereits jetzt die Probenahme und die Wartung an den NAQUA-Messstellen des Moduls TREND durchführen. Die Probenahme für eDNA ist dabei einfach zu integrieren, da die eDNA-Filtration parallel zu den bestehenden Messungen laufen kann. Auch bei der konventionellen Probenahme wäre eine Integration in das bestehende METAS Arbeitsprotokoll möglich. Es müsste jedoch geklärt werden, wer die Filternetze zwei Wochen vor der Probenahme in den Wasserfassungen installieren würde. Für die Szenarien NAQUA TREND – BIO+ und GBDM müsste die Probenahme teilweise oder vollständig neu geplant werden. Dabei könnte METAS mit einem neuen Auftrag die Probenahme durchführen oder ähnlich wie im Schweizer BDM die Probenahme auf Auftragsbasis an private Firmen vergeben werden.

Auswertung konventionelle Methoden

Das konventionelle (faunistische) Monitoring kann ähnlich dem Oberflächengewässer an externe Auftragnehmer vergeben werden. Dafür müsste das taxonomische Fachwissen im Grundwasserbereich noch ausgebaut werden (z. B. Training von Experten, Bestimmungsliteratur). Kooperationen oder Wissenstransfers mit bereits umgesetzten Monitoringnetzwerken wie in Baden-Württemberg sind denkbar. Während der Aufbauphase des Monitorings könnten die Eawag bei der Analyse der konventionellen Proben unterstützen, insbesondere bei den Grundwasserflohkrebsen.

Auswertung eDNA

Umwelt-DNA-Analysen bedürfen spezialisierten Labors, deren Einrichtung und Betrieb mit hohen Anfangskosten sowie laufenden Kosten verbunden sind (siehe Abschnitt 3.2). Solche Labors gibt es aktuell z. B. an öffentlichen Einrichtungen wie der Eawag, ETH und WSL, sowie vermehrt auch von privaten

Anbietern. Neben den Laborauswertungen führen diese Labors meist auch die bioinformatischen Analysen durch und liefern je nach Bedarf Arten- oder OTU-Listen.

Einige dieser kommerziellen eDNA-Service Provider könnten herangezogen werden, um ein eDNA-Monitoring zur Gänze (Probennahme bis Datenauswertung), oder zumindest Laboruntersuchungen zu übernehmen. Es gibt aktuell bei diesen Providern verschiedene Angebote, sowohl im Inland als auch im europäischen Ausland, wobei die meisten projektbasiert arbeiten, und selten reine Labordienstleister sind. Um die Interaktion mit diesen Anbietern zu vereinfachen, haben wir einen Leitfaden erstellt, welcher als Hilfe zur Interaktion mit diesen Labordienstleistern dienen soll (Appendix 1).

Während der Aufbauphase des Monitorings können die Analysen an der Eawag durchgeführt werden. So kann im Rahmen des NFP 82 Projektes die Analyse und Auswertung der eDNA-Proben aus dem Grundwasser erfolgen, wenn die Probennahme frühzeitig (bestenfalls bereits 2026) startet. Die so erhobenen Daten können dann im Rahmen dieses Projekts in den Jahren 2026–2030 ausgewertet und etwaige erste Bewertungen des ökologischen Grundwasserzustands im Rahmen einer Dissertation erarbeitet werden. Die Rolle der Eawag sollte sich jedoch langfristig auf Beratung, Ringtests und etwaige Qualitätskontrollen von Anbietern reduzieren.

4.3 – Stand der Referenzdaten, Qualitätssicherung und Datenarchivierung der eDNA-Methode

Welche Möglichkeiten gibt es, die gesammelten Informationen aufzubewahren, z.B. durch Aufbewahrung der eDNA-Informationen oder durch Einfrieren der Proben?

DNA-Extrakte können bei -20 °C oder gefriergetrocknet über viele Jahre gelagert werden. Aktuell werden eDNA-Proben vor allem in einzelnen Forschungsgruppen archiviert; es gibt noch keine systematische, zentrale Archivierung in der Schweiz. Die generierten Biodiversitätsdaten und die Sequenzrohdaten können als Datenfiles bei entsprechender Filestruktur (open source Formate) zeitlich unbeschränkt gelagert werden. Für eine zentrale Archivierung müssten entweder neue Dateninfrastrukturen geschaffen werden, oder auf bestehenden Systemen, z. B. der EnviDat Plattform der WSL, aufgebaut werden.

Fortsetzung auf nächster Seite

Was ist der Stand der Referenzdatenbank?

Der aktuelle Stand der Referenzdatenbanken für Grundwasserorganismen ist über alle Organismengruppen hinweg lückenhaft, da viele Arten unbekannt oder unsequenziert sind. Studien in der Schweiz zeigen, dass nur ein kleiner Teil der «Amplicon Sequence Variants (ASV)» (z. B. 15 %) zuverlässig einem taxonomischen Niveau zugeordnet werden kann. Internationale und nationale Initiativen zur Charakterisierung von Stygofauna deuten jedoch darauf hin, dass sich die Datenbanken in den kommenden Jahren deutlich und rasch verbessern werden. Beispielsweise konnten in der Schweiz innert weniger Jahre komplette Referenzdatenbanken für Flohkrebse, Eintags-, Stein- und Köcherfliegen sowie Fische etabliert werden; ähnliches ist für weitere Gruppen realistisch. Verbesserte Referenzdatenbanken ermöglichen zukünftige Neuanalysen und eine präzisere Erfassung der Biodiversität im Grundwasser.

Mit welchen Proxys kann die Biodiversität im Grundwasser gemessen werden (eDNA etc.)?

«Taxonomy-free» Ansätze zur Biodiversitätserhebung basierend auf «Operational Taxonomic Units (OTU)» oder «Amplicon Sequence Variants (ASV)» können als sehr gute Annäherung für die Biodiversität im Grundwasser herangezogen werden. Zudem können aus OTU/ASV direkt Indices berechnet und etabliert werden, die Aussagen zum ökologischen Zustand der Grundwasserökosysteme ermöglichen. Es konnte unter anderem bereits gezeigt werden, dass ohne taxonomische Information bereits eine Aussage über Landnutzungsformen möglich ist. Aufbauend darauf können nun Indices etabliert werden, welche direkte Aussagen über die Qualität und den Zustand des Grundwassers zulassen. Ein weiterer Näherungswert für die Biologie im Grundwasser kann über die Messung der mikrobiellen Aktivität erhoben werden. Solche Messungen sind jedoch nicht direkt mit der Diversität gleichzusetzen.

Referenzdatenbanken

Die aktuell frei verfügbaren Referenzdatenbanken (Tabelle 8) für die typischen Marker-Gene sind aufgrund der hohen Anzahl an unbekannten Arten im Grundwasser aktuell noch lückenhaft (Couton et al., 2023a; Saccò et al., 2022). Für einzelne Gruppen ist diese Datenbank jedoch lokal bereits gut ausgebaut. In der Schweiz kann beispielsweise aufgrund der intensiven Forschungsarbeiten der letzten Jahre bereits auf eine gute Referenzdatenbank für Grundwasserflohkrebse zurückgegriffen werden. Diese Bemühungen zeigen auch eindrücklich, wie rasch und effizient eine solche Datenbank innerhalb weniger Jahre ausgebaut werden kann. In der Schweiz konnte beispielsweise innerhalb von 4 Jahren die Referenzdatenbank für

Grundwasserflohkrebse vervollständigt werden. Durch diese nationalen (z.B. Amphipod.ch, Amphiwell) und internationalen (z.B. «DarCo») Bemühungen werden sich die Referenzdatenbanken für Stygofauna in den nächsten 5-10 Jahren signifikant verbessern. Dadurch besteht die Möglichkeit, bestehende Datensätze zu einem späteren Zeitpunkt erneut zu analysieren, um ein besseres Bild der Biodiversität zu bekommen.

Tabelle 8: Übersicht über vorhandene Referenzdatenbanken. Übernommen von Leese et al., 2023.

Datenbank	Organismen-gruppe(n)	Marker-Gen	Kommentar	Link
BOLD	Insbesondere Tiere	v.a. COI	Ein Grossteil der Sequenzen ohne morphologische Validierung	http://www.boldsystems.org/
GBOL	Tiere, Pflanzen, Pilze und Diatomeen	z.B. COI, 18S, rbcL, ITS, trnL-F/K, matK	Taxonomisch durch Expert*innen sehr gut kuratiert	https://bolgermany.de
INSDC	Alle Organismengruppen	Alle Marker-Gene	Ein Grossteil der Sequenzen ohne morphologische Validierung	https://www.insdc.org
Diat_sys	Diatomeen	v.a. rbcL, teilweise 18S SSU	Taxonomisch durch Expert*innen sehr gut kuratiert	https://www6.inrae.fr/carrte/collection/Barcoding-database
SILVA	Bacteria, Archaea und Eukarya	16S/18S (SSU), 23S/28S (LSU)	Taxonomisch durch Expert*innen grösstenteils gut kuratiert	https://www.arb-silva.de/
PR2	Insbesondere Protisten (Fokus marin)	18S SSU	Taxonomisch durch Expert*innen grösstenteils gut kuratiert	https://pr2-database.org/
UNITE	Eukaryoten, insbesondere Fungi	ITS	Taxonomische Annotation durch die Expert*innen-Gemeinschaft	https://unite.ut.ee/

Qualitätssicherung

Hier kann auf für Oberflächengewässer etablierte Methoden (Pawlowski et al. 2020) und auf Erfahrungen aus anderen Ländern zurückgegriffen werden. In Deutschland wird für eDNA-Beprobungen ein mehrstufiges Konzept zur Qualitätssicherung vorgeschlagen, welches nahezu vollständig übernommen werden kann (BOX 1, Leese et al., 2023). Nachfolgend werden die wichtigsten Punkte kurz spezifiziert.

Feldarbeit

Die Qualitätssicherung bei der Feldarbeit ist essenziell, da viele Fehlerquellen (z. B. Kontaminationen) bereits in diesem Schritt auftreten. Daher haben sich internationale Bemühungen, wie die EU-COST Action «DNAqua-NET» vor allem der Standardisierung dieses Schritts gewidmet. Mit der Veröffentlichung der DIN EN 17805 über eDNA-Probenahme wurde damit erstmals ein Standard veröffentlicht. Die in diesem Bericht vorgestellten Methoden orientieren sich bereits danach. Es sollte darauf geachtet werden, diese Norm in die Schweizer Praxis zu überführen, da diese nicht nur Grundwasser eDNA-Beprobungen betrifft, sondern generell eDNA für Umweltmonitorings.

Labor

Es gibt noch keine eDNA spezifischen Laborzertifizierungen. Jedoch kann hier dem Vorbild anderer Länder gefolgt werden und auf generelle Qualitätsstandards wie dem ISO 9001 Laborstandard oder der ISO 1705 welche molekularen Labors betrifft, aufgebaut werden (siehe Abschnitt 4.5). Damit kann die Qualität der Laborarbeiten und Dokumentation sichergestellt werden. In Europa ist dies bisher noch nicht der Fall und nur einzelne kommerzielle Anbieter sind dementsprechend zertifiziert. Bis die jetzigen Bemühungen in de-jure Standards für eDNA-Methoden übergehen, sollte man sich auf international und national akzeptierte de-facto Standards (Richtlinien) bzgl. der Beprobung von eDNA fokussieren (Goldberg et al., 2016; Pawlowski et al., 2020).

Des Weiteren können Labors bis zur Umsetzung passender Zertifizierungen und Standards auch über Ringtests auf ihre Qualität überprüft werden. Dabei wäre für die Schweiz vermutlich ein «outcome-based» Standard geeigneter als ein «process-based» Ansatz. Das bedeutet: Labore erhalten standardisierte, gemischte Referenzproben zur Analyse, wobei es ihnen freisteht, welche Methoden sie zur Auswertung verwenden. Entscheidend ist die Leistung, also ob Gemeinschaften und Arten korrekt identifiziert werden. Auf Basis der Resultate wird ein Qualitätsrating vergeben, etwa über eine Punkteskala oder ein Ampelsystem. Dafür werden künstliche Wasserproben (z. B. Teichwasser) mit definierter DNA-Zusammensetzung erstellt, teils mit Hemmstoffen (Inhibitoren) und in variierenden DNA-Konzentrationen gemischt und an die teilnehmenden Labore übermittelt. Nach der Analyse senden diese Labore ihre Ergebnisse und erhalten anschliessend eine objektive Bewertung der Analyseleistung (basierend auf der Detektion der gesuchten Art in unterschiedlichen Verdünnungen, Trujillo-González et al., 2021). Auch mit Metabarcodingproben wurde das bereits erprobt, unter anderem in der «Joint-Danube-Survey», bei dem dieselben Proben von verschiedenen Labors ausgewertet wurden. Diese Qualitätssicherung könnte in der Schweiz nicht nur für Grundwasserproben, sondern allgemein für eDNA-Proben angewandt werden.

BOX 1 - Zusammenfassung des Qualitätssicherungsmodells (Abbildung 6), das für Deutschland vorgeschlagen wird.

Ebene 1 – Qualitätsmanagementsystem:

Ein grundlegendes Qualitätsmanagementsystem bildet die Basis. Wichtig sind dokumentierte Arbeitsprozesse, Nachvollziehbarkeit aller Arbeitsschritte und regelmässige Validierung der Methoden. Während ISO 9001 eher organisatorische Aspekte abdeckt, sind für DNA-basiertes Monitoring insbesondere Laborstandards entscheidend. Eine externe Zertifizierung ist derzeit nicht zwingend, könnte aber für behördliche Programme verpflichtend werden.

Ebene 2 – Eignungsprüfung von Laboren:

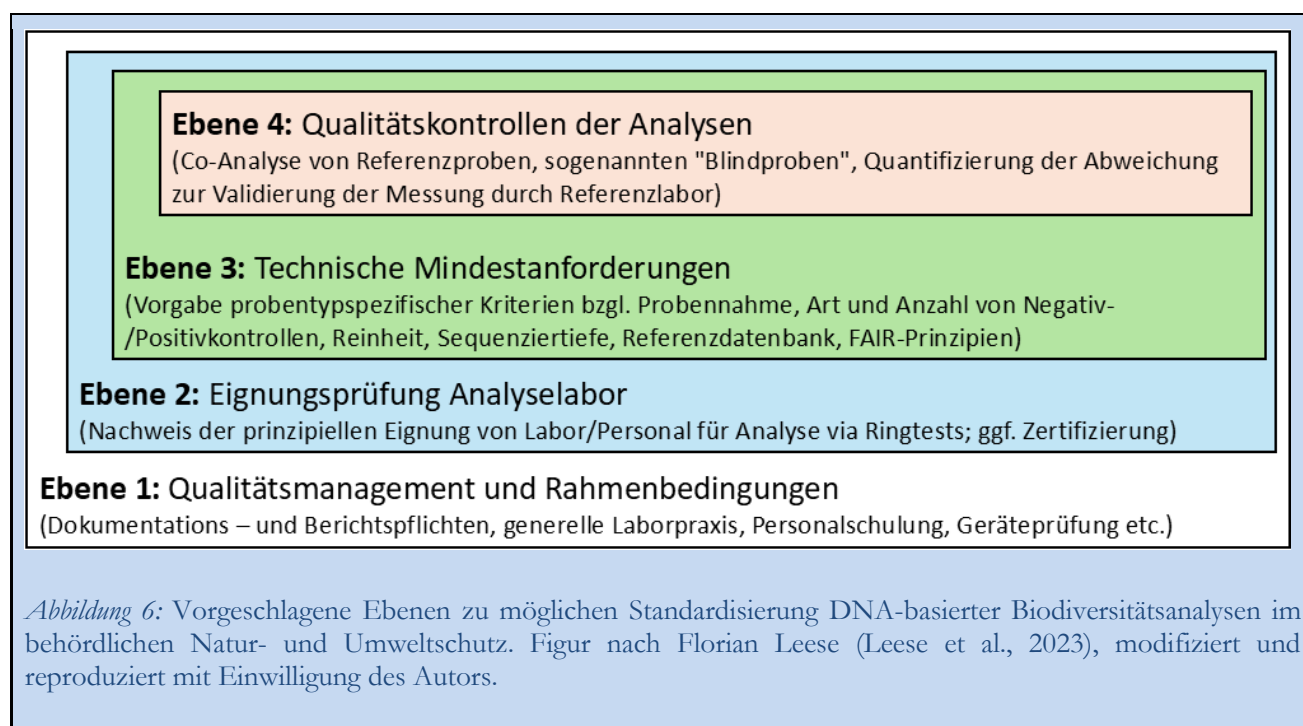
Labore, die die Basisanforderungen erfüllen, können durch standardisierte Ringversuche nach internationalen Normen (z. B. ISO/IEC 17043, ISO 13528) geprüft werden. Dabei analysieren teilnehmende Labore Referenzmaterialien, deren Ergebnisse zentral ausgewertet werden. Nur Labore mit ausreichender Genauigkeit werden zertifiziert – wie bereits beim eDNA-basierten Kammolch-Monitoring in England. Eine solche, befristete Zertifizierung wäre auch für Metabarcoding-Analysen sinnvoll. Referenzmaterialien können z. B. aus eindeutig bestimmten Organismen, Kulturproben oder synthetischer DNA stammen.

Ebene 3 – Mindestanforderungen an Analysen:

Ein qualifiziertes Labor muss definierte Mindeststandards für Metabarcoding einhalten. Dazu zählen die Anzahl biologischer und technischer Replikate, der Einsatz von Negativ- und Positivkontrollen, Sequenziertiefe, geeignete Referenzdatenbanken und die Beachtung der FAIR-Prinzipien. Bei sensiblen Proben wie Pollen sind strengere Arbeitsvorgaben erforderlich.

Ebene 4 – Nachgeschaltete Qualitätskontrolle:

Als letzte Sicherungsebene wird empfohlen, Referenzproben (Blindproben) in die Analysen einzubauen. Anhand der Übereinstimmung mit bekannten DNA-Zusammensetzungen kann die Zuverlässigkeit der Ergebnisse überprüft werden. Werden definierte Mindestwerte nicht erreicht, gelten die Ergebnisse als nicht belastbar. Diese Qualitätskontrollen können von akkreditierten Laboren durchgeführt werden, oder auch an der Eawag.



Archivierung von Daten und Proben

Im Rahmen von zwei nationalen Workshops (Spiez 2023, NFP-Workshop 2025) wurde das Thema Daten und Probenarchivierung bereits diskutiert und es wurde hervorgehoben, dass im Hinblick auf die generierten Datenmengen frühzeitig eine Strategie zur Rechteverteilung, Erfassung und Archivierung der molekularen Daten und generierten Sequenzen erarbeitet werden muss. Wie bereits in der BAFU eDNA-Methodenanleitung «Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen» (Pawlowski et al., 2020, S.61) erwähnt, sollte daher bereits früh mit den ausführenden eDNA-Unternehmen Rechte und Pflichten klar geregelt werden.

Da sich DNA-Referenzdatenbanken schnell ändern können und etwaige Neuanalysen in Zukunft möglich gemacht werden sollen, müssen die Rohdaten verfügbar gemacht und langfristig gespeichert werden. Zur langfristigen Speicherung der genetischen Daten gibt es bereits existierende Systeme, wobei man unterscheiden kann zwischen öffentlichen Repositorien wie Genbank, DRYAD oder Zenodo und institutionell geprägten, privaten Plattformen wie EnviDat des Schweizer Forschungsinstitut für Wald, Schnee und Landschaft (WSL). Weiter sollten alle biologischen Proben sowie DNA-Extrakte langfristig gelagert werden (Jarman et al., 2018). Diese könnten gemeinsam mit den Proben des Schweizer BDM gelagert und archiviert werden (aktuell Universität Lausanne). DNA-Extrakte können dabei effizient und platzsparend bei -20 °C oder gefriergetrocknet gelagert werden. Eine initiale Archivierung der Daten könnte durch die Eawag erfolgen, mittelfristig braucht es jedoch nachhaltige Lösungen ausserhalb der Eawag-Infrastruktur.

FAIR Daten

Für die langfristige Nutzbarkeit und Qualitätssicherung der im Monitoring generierten (e)DNA-Daten ist die Einhaltung der sogenannten FAIR-Prinzipien zentral (Takahashi et al., 2025; Wilkinson et al., 2016, siehe Box 2 für Erklärung). Diese wurden entwickelt, um Daten auffindbar (**F**indable), zugänglich (**A**ccessible), interoperabel (**I**nteroperable) und wiederverwendbar (**R**eusable) zu machen. Im Kontext von eDNA, wo grosse Mengen sensibler, oft standortbezogener Daten generiert werden, ist dies anspruchsvoll und bedarf passender Ressourcen. Dies sichert nicht nur die Vergleichbarkeit und Wiederverwendbarkeit zwischen Projekten und zwischen Forschung und Praxis, sondern ist auch eine Voraussetzung für die Integration in internationale Plattformen (z. B. GBIF, EMBL-EBI). Zudem stärkt es die Transparenz und Nachvollziehbarkeit gegenüber der Öffentlichkeit und politischen Entscheidungsträgern.

BOX 2 - Was bedeutet **FAIR** konkret für eDNA-Daten?

- **F**indable (Auffindbar)

Daten sollen eindeutig identifizierbar und über öffentlich zugängliche Repositorien (z. B. ENA, GBIF) auffindbar sein. Dazu gehören auch standardisierte Metadaten und persistente Identifikatoren (z. B. DOIs).

- **A**ccessible (Zugänglich)

Die Daten und zugehörigen Metainformationen sollen über etablierte Protokolle abrufbar sein, mit klaren Zugriffsregeln (z. B. Open Access oder Embargo-Regelung).

- **I**nteroperable (Interoperabel)

Die Daten sollen in standardisierten Formaten (z. B. FASTQ, Darwin Core) und mit kontrollierten Vokabularen (z. B. NCBI Taxonomy, EnvO) bereitgestellt werden, um die Integration mit anderen Datensätzen und Software zu erleichtern.

- **R**eusable (Wiederverwendbar)

Daten sollen durch vollständige Dokumentation, transparente Methodenangaben (z. B. zur DNA-Extraktion, PCR, Bioinformatik) und eine offene Lizenzierung (z. B. CC-BY) langfristig nachvollziehbar und weiterverwendbar sein.

4.4 – Entwicklungs- und Harmonisierungspotential

Auf welche Aspekte sollte das Entwicklungspotential fokussiert werden, um Defizite zu schliessen?

Parallel zur Etablierung des Biodiversitätsmonitorings des Grundwassers in der Schweiz sollten der Referenzzustand der Grundwasserökosysteme erhoben werden und mit den erhobenen Daten Indikatoren zur Grundwasserbiologie entwickelt werden. Die eDNA-Methoden sollten noch weiter standardisiert werden und Referenzdatenbanken für eDNA etabliert werden. Parallel dazu sollte bei der konventionellen Methode ein Fokus auf ausgewählte Organismengruppen gelegt, die taxonomische Expertise in der Schweiz ausgebaut und damit Rote Listen für Stygobiota der Schweiz erstellt werden.

Welche Wissenslücken können mit dem NFP 82 Projekt geschlossen werden?

Im Rahmen des NFP 82 wird das Projekt FutureProof («Förderung und Monitoring der Biodiversität und der nachhaltigen Ökosystemleistungen in der Schweiz mittels eDNA») unter der Leitung von Prof. Florian Altermatt Methoden, Protokolle und Indices zur Bewertung von Gewässerökosystemen in der Schweiz erarbeiten. Dabei soll es auch einen Fokus auf Grundwasserökosysteme geben. Nebst schon bestehenden Proben könnten auch Proben aus NAQUA-Messstellen erfasst und analysiert werden, so dass Indices zur Biodiversität und Güte der Grundwasserökosysteme ermittelt werden können. Grundlage dafür wäre eine enge Zusammenarbeit und Probenahme der DNA Proben im Rahmen der NAQUA Messkampagne.

Welche Wissenslücken können mit anderen Projekten geschlossen werden?

Im Rahmen laufender Grundwasserökologieprojekte, wie dem Projekt Amphiwell, können Artenvorkommen ausserhalb eines möglichen TREND Monitoring Netzwerks erfasst werden. Die Erkenntnisse aus solchen Forschungsarbeiten können genutzt werden, um die Entwicklung Roter Listen voranzutreiben. Bei den Grundwasserflohkrebsen gibt es bereits eine solide Datengrundlage dafür und die Rote Liste könnte erstellt werden. Weiter können im Rahmen von laufenden Grundwasserforschungsprojekten an der Eawag auch die Referenzdatenbanken weiter ausgebaut werden.

Um ein regelmässiges Grundwasserbiodiversitätsmonitoring in der Schweiz langfristig umzusetzen, sind kurz- und mittelfristig einige Lücken zu schliessen. Bereits laufende Projekte können einige davon angehen. Im Folgenden soll auf diese Synergien eingegangen werden.

Synergien mit dem Projekt FutureProof

Im Rahmen des NFP 82 wurde das Projekt FutureProof genehmigt und finanziert. Es hat drei grosse Ziele: (1) Die Entwicklung von Indices für Biodiversität und Ökosystembewertung von Gewässerökosystemen in der Schweiz mittels eDNA, (2) das Entwickeln und Testen von Langzeitmonitoring (v.a. automatisierte Probenahme mit hoher zeitlicher Auflösung) mittels eDNA und (3) das Erstellen einer Toolbox für eDNA-Anwender (z.B. für kantonale oder föderale Fachstellen oder Ökobüros). Insbesondere Punkt 1 und 3 sind direkt für ein zukünftiges Monitoring der Biodiversität im Grundwasser relevant, da diese Indices und die Toolbox nicht nur für Oberflächengewässer, sondern auch spezifisch für Grundwasser gelten sollen. Damit könnte im anlaufenden Projekt ein Teil der begleitenden Forschungsarbeit für ein Grundwasserbiodiversitätsmonitoring abgedeckt werden. Dies betrifft vor allem die Entwicklung von eDNA basierten Indices bezüglich Biodiversität und Ökosystembewertung und der weiteren Qualitätskontrolle und Anwendung der Toolbox eDNA. Grundlage für den Erfolg dieser Arbeiten sind koordinierte Probenahmen und Zugang zu eDNA-Proben aus einem breiten Spektrum an Grundwasserökosystemen. **Als grösste Synergie würde sich anbieten, dass die eDNA-Proben im Rahmen von NAQUA TREND genommen würden (analog obigem Szenario 1), und dann im Rahmen von FutureProof analysiert werden könnten.**

FutureProof hat kein eigenes Budget für die Probenahme, könnte aber das Probematerial (Filter) und Anleitungen zur Verfügung stellen, und die Probenahme begleiten. Die Probenahme müsste im Rahmen der regulären NAQUA TREND Beprobungen erfolgen (Aktuell durchgeführt von METAS). Anschliessend könnten die so erhaltenen Proben durch die Doktorandin oder den Doktoranden im Projekt FutureProof analysiert werden (Extraktion und Sequenzierung der DNA). Dies würde nicht nur eine erstmalige flächige Erhebung der Grundwasserbiodiversität ermöglichen, sondern könnte direkt für die Entwicklung von Indices genutzt werden und als Testlauf für ein reguläres Monitoring dienen. Ein solches Vorgehen wurde schon erfolgreich für die NAWA Messkampagnen angewandt, bei welchem während zweier Erhebungen an 92 Probestellen vier eDNA-Replikate beprobt wurden. Die Probenahme wurde durch die externe beauftragten NAWA Mitarbeitenden getätigt, das Probematerial wurde von der Forschungsgruppe Altermatt zur Verfügung gestellt, ebenso wurden die Analysen anschliessend im Rahmen einer Doktorarbeit getätigt. Aus diesem Projekt ging eine Reihe von Publikationen hervor (Brantschen et al., 2021; Brantschen et al., 2022; Brantschen & Altermatt, 2024; Brantschen et al., 2024; Keck et al., 2023), die direkt die Grundlage für das Monitoring und eine mögliche Umsetzung von eDNA-

Probenahmen im Rahmen von NAWA etablierten. Ebenso wurde aufgezeigt, wie aus diesen Daten direkt ökologische Indices abgeleitet werden können (Keck et al. 2023). Damit wurden alle Grundlagen für eine direkte Implementierung der eDNA-Analyse in das Routinemonitoring geschaffen. Analog wäre dies auch für das Grundwasser/NAQUA möglich. Dank der Synergie zwischen FutureProof und NAQUA könnten in den nächsten zwei bis vier Jahren kosteneffizient und zielgerichtet drei wichtige Ziele erreicht werden: Erstens wird eine erste Erhebungskampagne im NAQUA durchgeführt, zweitens werden erstmals schweizweite eDNA-Referenzdaten aus dem Grundwasser gesammelt, und drittens können diese Daten zur Entwicklung geeigneter Indices genutzt werden. Voraussetzung dafür wäre eine rasche Implementation der eDNA-Probenahme innerhalb des NAQUA Monitoringprogramms.

Das Projekt FutureProof kann nicht alle offenen Wissenslücken abdecken. Weiterführende Projekte können und sollten daher folgende Punkte abdecken:

Referenzzustand der Grundwasserökosysteme

Ein wichtiger Schritt ist es, Referenzzustände der Grundwasserdiversität zu etablieren, auf Basis deren zukünftige Bewertungen erfolgen können (Mammola et al., 2022). Mittels eDNA-Proben in gut charakterisierten Aquiferen könnte dabei ein Referenzzustand für zukünftige Bewertungen erstellt werden. Anbieten würde sich hierfür die 50 NAQUA-Messstellen des Moduls TREND. Die in Frage kommenden Messstellen müssen dabei alle biogeographischen Regionen, alle Aquifertypen, verschiedene für die Schweiz repräsentative Landnutzungsformen sowie einen klaren Gradienten von ungenutzten bis hin zu stark beeinflussten Messstellen aufweisen. Die Ergebnisse dieser Pilotphase würden eine Charakterisierung von naturnahen Aquiferen als Referenzzustand für langfristige Monitorings und die Entwicklung von Indikatorsystemen erlauben. Dabei kann auf aktuelle Forschungsdaten zur biogeographischen Verteilung des Genus *Niphargus* (Knüsel, 2024a, Amphiwell Projekt), sowie internationale Erfahrungen aus Deutschland oder Australien zurückgegriffen werden (Pronk et al., 2010). Für eine weitere Charakterisierung sind Monitoringdaten vor allem von weiteren Organismengruppen notwendig. Der Zeitaufwand dafür wird auf mindestens zwei Jahre geschätzt und kann ein laufendes Monitoring begleiten.

Standardisierung der eDNA-Methoden

Der Einsatz von eDNA basierten Methoden ist noch nicht formell standardisiert. Es gibt bereits nationale und internationale (Bruce et al., 2021; Goldberg et al., 2016; Saccò et al., 2022) Bemühungen sowohl «best-practices» für die Anwendung der Methode als auch formelle Standards einzuführen, welche 2024 in der Veröffentlichungen von ersten offiziellen ISO- und CEN-Standards resultierten (siehe Abschnitt 4.3, CEN, 2023). In der Schweiz müsste es nun in einem nächsten Schritt darum gehen, diese Richtlinien und Standards von Beginn an in ein potenzielles Monitoring einzubauen und auch gesetzliche Grundlagen für

deren Akzeptanz zu schaffen. Für die Oberflächengewässer bestehen solche Grundlagen (Modulstufenkonzept MSK und entsprechende Vollzugshilfen). Dies würde alle Schritte einer eDNA-Analyse, von der Probenahme bis hin zur Bioinformatik und der Verarbeitung von Daten gemäss dem FAIR-Data Prinzip beinhalten. Diese Standardisierung soll im Rahmen des anlaufenden NFP 82 Projekts «FutureProof» erfolgen. Ausserdem kann auf Erkenntnissen von aktuell laufenden Projekten wie GReG (<https://www.gregproject.com/>) aufgebaut werden, welches aktuell Methoden zur Erfassung von Grundwasser-eDNA global testet (Saccò et al., 2025). Dazu gibt es internationale (Bruce et al., 2021; Goldberg et al., 2016; Saccò et al., 2022) Bemühungen sowohl «best-practices» für die Anwendung der Methode als auch formelle Standards einzuführen, welche 2024 zur Veröffentlichungen von ersten offiziellen ISO- und CEN-Standards führten (siehe Abschnitt 4.3, CEN, 2023). In der Schweiz müsste es nun in einem nächsten Schritt darum gehen, diese Richtlinien und Standards von Beginn an in ein potenzielles Monitoring einzubauen und auch gesetzliche Grundlagen für deren Akzeptanz zu schaffen. Für die Oberflächengewässer bestehen solche Grundlagen (Modulstufenkonzept MSK und entsprechende Vollzugshilfen). Dies würde alle Schritte einer eDNA-Analyse, von der Probenahme bis hin zur Bioinformatik und der Verarbeitung von Daten gemäss dem FAIR-Data Prinzip beinhalten. Diese Standardisierung soll im Rahmen des anlaufenden NFP 82 Projekts «FutureProof» erfolgen.

Fokus auf ausgewählte Organismengruppen bei konventionellen Methoden

Konventionelle morphologische Methoden zur Erfassung der Biodiversität sind vor allem aufgrund der fehlenden taxonomischen Expertise herausfordernd. Schaffung dieser Expertise ist möglich und wichtig, benötigt jedoch einen mittelfristigen Zeithorizont. Unmittelbar bietet sich an, den Fokus auf einige überschaubare Gruppen zu legen, wobei sich hier spezifisch die Grundwasserflohkrebse eignen. Mit dem Projekt Amphiwell worden solide Grundlagen geschaffen und es gibt bereits eine Checkliste und Übersicht über vorkommende Arten (Altermatt et al., 2019; Knüsel, 2024a). Weitere Artgruppen, die sich anbieten würden, wären Asseln, Ruderfusskrebse oder Oligochaeten, wobei es für die Beprobung dieser noch offene methodische und analytische Fragen gibt. Zum Beispiel bräuchte es für das Sammeln von Ruderfusskrebsen eine geringere Maschenweite der Filternetze als diejenige, welche bisher in Studien der Eawag in Quellwasserfassungen verwendet worden sind. In Forschungsarbeiten aus Deutschland wurde unter anderem ein Indikator, welcher sich auf das Verhältnis zwischen Flohkrebse und Oligochaeten bezieht, vorgeschlagen (Griebler et al., 2014b). Mittel- bis langfristig könnte ein faunistisches Monitoring auch genutzt werden, um gezielt Expertise für die morphologische Bestimmung von Grundwasserfauna aufzubauen.

Referenzdatenbanken für eDNA

Einer der grundlegenden Bausteine eDNA-basierter Methoden ist die Abhängigkeit von Referenzdatenbanken (z. B. NCBI, BOLD), um Sequenzen erfolgreich Arten zuordnen zu können. Diese Referenzen sind im Grundwasser nur mangelhaft vorhanden, so konnte eine Studie in der Schweiz lediglich 15 % aller detektierten Sequenzen aus Grundwasserproben auch taxonomisch zuordnen (Couton et al., 2023a). Während in Oberflächengewässern der Ausbau der Referenzdaten voranschreitet und lokal bereits sehr gute Datenbanken zur Verfügung stehen (Blackman et al., 2023; Weigand et al., 2019), ist der Aufwand, diese im Grundwasser auszubauen, gross. Es gibt hier allerdings ein hohes Potenzial, diese Datenbanken für das Grundwasser im Rahmen laufender nationaler Projekte (z. B. dem Projekt Amphiwell, dem NFP 82 Projekt FutureProof und möglicherweise dem Quellenmonitoring) als auch im Rahmen internationaler Projekte (z. B. dem Biodiversa+ Projekt DarCo, <http://meg.irs.cnr.it/index.php/component/content/article?id=105> und dem Projekt GReG, siehe oben) weiter auszubauen. Es bestehen daher viele Synergien in Bezug auf die Referenzdatenbanken.

Indikatorentwicklung Grundwasserbiologie

Aufgrund der aufgezeigten Auswirkungen menschlicher Einflüsse auf die Grundwasserbiologie (siehe Kapitel 2.3) kann die Artzusammensetzung im Grundwasserleiter als Indikator für den Zustand des Aquifers und potenzielle Einflussfaktoren verwendet werden. Eine Vorreiterrolle für die Entwicklung von biologischen Grundwasserindikatoren nimmt Australien ein, wo bereits 2009 erstmals ein Monitoringsystem und ein Index entwickelt wurde, um den Zustand des Grundwassers mithilfe eines Indexwertes zu erheben (GWHI, Korbel & Hose, 2011, 2017). Auch in Deutschland gibt es erste Ansätze, die Stygoфаuna bei der Bewertung von Grundwassersystemen einzubeziehen. Es wurde ein mehrstufiges Indikatorsystem getestet, das unter anderem biologische Komponenten wie das Verhältnis von Krebstieren zu Oligochaeten oder das Vorkommen von stygoxen Arten beinhalten, und damit eine Aussage über den Zustand zulässt (mehr als 70 % Krebstiere bedeutet dabei einen guten Zustand, das Vorkommen von Stygoxen ist ein Indikator für Störungen Griebler et al., 2014b). Mit den vorgeschlagenen Szenarien würden die Datengrundlagen geschaffen, um im Rahmen laufender Projekte wie dem NFP 82 FutureProof ein solches Indikatorsystem basierend auf der Biodiversität zu entwickeln und einzusetzen. Das ebenfalls laufende Projekt ARTS (Aquifer Reaction to Thermal Storage, <https://www.arts-energystorage.ch/>) wird Daten über den Einfluss von thermischen Nutzungen des Grundwassers, insbesondere Wärmezufuhr, liefern. Damit kann die Entwicklung eines thermisch sensitiven Indikators vorangetrieben werden.

Entwicklung der Roten Listen der Stygobiota der Schweiz

Parallel zum regelmässigen Monitoring wäre eine aktuelle Rote Liste ausgewählter Stygobiota in der Schweiz, insbesondere ausgewählter Grundwasserinvertebraten, wertvoll. Dieses Instrument hat sich für den angewandten Schutz der Lebensräume im rechtlichen Rahmen sehr bewährt. Wie oben erwähnt, wurden in den letzten Jahren umfangreiche Daten zu Grundwasserflohkrebsen etabliert. Diese Grundlagen könnten mit überschaubarem Aufwand und dem Vorbild der Roten Liste des Saarlandes folgend, aufgearbeitet werden, so dass erste Rote Listen für Grundwasserflohkrebs in der Schweiz innert 2–3 Jahre etabliert werden könnten. Aufgrund ihrer Häufigkeit und ihrer Position im Nahrungsnetz würde sich diese Gruppe ebenfalls sehr gut für die Etablierung einer Roten Liste eignen.

4.5 – Horizon Scanning über Entwicklungen der eDNA-Methode

Sind in den nächsten Jahren technische Entwicklungen/Änderungen bei der Probenahme vorgesehen?

Nein, grundsätzlich nicht. Die Probenahme (Wasserprobe mit anschliessender Filtration) ist breit etabliert und wird prinzipiell gleichbleiben. Momentan noch diskutiert werden spezifische Details (Anzahl Replikate, Volumina, Filtertyp), wobei klar ist, dass schon jetzt für eine Methode mit langfristiger Robustheit entschieden werden kann (d.h. im Speziellen, mind. 3 Replikate, Volumina von mindestens 15 L; Filtertyp ist weniger entscheidend). Weiter werden aktuell Internationale Normen und Leitlinien (z. B. ISO EN 17805, iESTF) für die Standardisierung und Vergleichbarkeit von eDNA-Daten entwickelt und in nationale Gesetzgebungen integriert. Neue Ansätze wie automatisierte Sampler oder passive Filtersysteme könnten die Probenahme effizienter machen. Sie sind aktuell jedoch noch nicht bereit für einen solchen Einsatz, unterscheiden sich aber vom Prinzip her nicht (liefern jedoch eine höhere zeitliche Auflösung). Die Laboranalysen sind insofern robust, als dass die Extraktion von DNA standardisiert ist, und die Vervielfältigung und Sequenzierung einfach standardisiert werden kann.

Zusätzlich zu den technischen Entwicklungen könnte ein nationales eDNA-Referenzzentrum Qualitätssicherung, Ringtests und Ausbildung zentralisieren, wodurch die Implementierung von eDNA-Methoden im Grund- und Oberflächenwasser erheblich gestärkt würde.

Weitere Standardisierung und Aufbau einer verbesserten rechtlichen Rahmenstruktur für eDNA

Schon jetzt sind für praktisch alle Schritte in der Probenahme und Analyse allgemein verbreitete Methoden verfügbar. Ein Monitoring kann deshalb schon jetzt anhand dieser bewährten Methoden entwickelt werden (dies geschieht momentan vor allem im Rahmen vom Austausch zwischen führenden Forschungsgruppen im Themenbereich eDNA; noch nicht implementiert/eingefordert werden diese Schritte teilweise bei der Ausführung durch kommerzielle Anbieter). Weiter schreitet die Standardisierung der eDNA-Methode international rasch voran, so dass hier innert weniger Jahren auch verbindliche Angaben vorliegen werden. Neben der bereits veröffentlichten Norm ISO EN 17805:2023 werden innerhalb der internationalen Taskforce zur Standardisierung von Umwelt-DNA (iESTF, <https://iestf.global/>) weitere Leitlinien entwickelt. Unter dem Dach von ISO TC 147/SC5/WG13 befinden sich derzeit mehrere Projekte in der Pipeline, darunter Normen zu Probenahme, Anreicherung und Konservierung von eDNA aus Wasser, zur Probenkonservierung und Laborbearbeitung von aquatischen Makroinvertebraten (ISO/NP 25806, ISO/NP 25807) sowie zu

Qualitätssicherungsprinzipien für molekularbiologische eDNA-Analysen (ISO/PWI 25605). Diese Entwicklungen werden künftig entscheidend zur Verbesserung der Qualitätskontrolle und zur internationalen Vergleichbarkeit von Monitoring-Daten beitragen, auch im Bereich des Grundwassers, wo eDNA-basierte Ansätze bislang nur eingeschränkt etabliert sind.

Neue eDNA-Beprobungsmethoden

Die aktuellen eDNA-Beprobungsmethoden bauen alle auf der aktiven Filtration eines bestimmten Volumens über einen bestimmten Zeitrahmen und unter Anwesenheit einer zuständigen Fachperson auf. Bei zeitlich hoch aufgelösten Beprobungskampagnen führt dies zu hohen Personalkosten. Hier könnten Autosampler-Maschinen den Zeitbedarf reduzieren, welche jeden Schritt der Probenahme, vom Gewinnen der Wasserprobe, über das Filtrieren bis hin zum Hinzufügen des Konservierungspuffer, automatisieren. Dabei bleibt das Prinzip der Probenahme und des Probetyps gleich, es geht hier also vor allem um eine zeitliche Skalierung.

Die Arbeitszeit für die Probenahme beschränkt sich bei diesen Geräten auf das Austauschen der vollen Filter und das Nachfüllen des Konservierungspuffers. Diese Geräte können mehrere Filter beinhalten, bei Mobilfunkempfang mit einer Sendeeinheit zur Fernüberwachung ausgestattet werden. Dadurch schaffen diese Geräte automatisch die richtigen Lagerbedingungen, was dazu führt, dass ein Vor-Ort Besuch lediglich monatlich oder vierteljährlich notwendig ist. Diese Geräte kommen in verschiedenen Formen und Funktionenvor, und vor allem in marinen Systemen sind bereits Erfahrungen mit diesen Systemen vorhanden. Im Süßwasser befinden sich diese Sampler in Erprobung und haben noch keine Marktreife (Hendricks et al., 2023). Zukünftig könnten solche fix installierten Geräte jedoch im Grundwassermonitoring, vor allem in passenden Quellwasserfassungen (z. B. mit vorhandenem Stromanschluss), eingesetzt werden. Aktuell werden durch die Forschungsgruppe Altermatt zwei Semi-Automatisierte Probenahmegeräte an zwei NAWA Standorten getestet, wo im 1–3-Tagesrhythmus eDNA aus Oberflächengewässern genommen werden. Wir sehen diese hohe zeitliche Auflösung vor allem relevant für Oberflächengewässer (v.a. Fließgewässer), und von geringerer Bedeutung für Grundwasser (dort sollten Probenahmen mit deutlich grösseren zeitlichen Abständen, im Bereich von wenigen Monaten) ausreichend sein.

Ein zweiter Ansatz für eine integrierte Probe zum Biodiversitätsmonitoring ist der Einsatz von passiven Filtersystemen (Bessey et al., 2022). Dabei handelt es sich um passende Membranen oder Kunststoffe, welche ohne Pumpe nur durch den Kontakt mit Wasser eine eDNA-Probe gewinnen. Dazu gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass diese Filter über längere Zeit im Medium verbleiben und eine über die Zeit integrierende Probe generieren. Das Prinzip hier ist ähnlich, es könnten solche passiven Filter in

Grundwassermessstellen integriert werden, was den Arbeitsaufwand des Monitorings minimiert. Passive Filter sind allerdings ebenfalls Gegenstand der aktuellen Forschung, da Fragen zu verwendetem Material, Probleme mit Biofilmbildungen und tatsächlicher zeitlicher Auflösung nach wie vor offen sind.

Schaffung eines eDNA-Referenzzentrums

Für die Qualitätssicherung könnte auch ein Nationales Referenzzentrum für eDNA-Anwendungen sowohl in Oberflächen wie auch im Grundwasser einen Mehrwert bieten. So ein Zentrum kann eDNA-Referenzmaterialien verwalten, Ring- oder Qualitätstests leiten eDNA-Labors überprüfen sowie Ausbildungsmaterialien erstellen. Dies würde der Anwendung eDNA-Methoden für das Monitoring in Grundwasser- und Oberflächengewässern einen enormen Schub bezüglich der Implementierung versetzen.(Trujillo-González et al., 2021).

5 – Schlussfolgerung und Empfehlung

Ein Monitoring zur Erfassung der Biodiversität im Grundwasser ist möglich und kann mit vorhandenen Methoden sofort umgesetzt werden. Wir empfehlen daher einen möglichst baldigen Start eines nationalen, eDNA-basierten Grundwassermonitorings, das auf dem in diesem Bericht vorgestellten Szenario 1 «NAQUA TREND – BIO» basiert. Dieses Szenario kann mit überschaubarem finanziellen sowie personellen Aufwand umgesetzt und in das bestehende Monitoringprogramm integriert werden. Die so gesammelten Erfahrungen zur Grundwasserbiodiversität in der Schweiz bilden eine starke Grundlage für die Erhebung eines ersten Referenzzustandes der Biodiversität im Schweizer Grundwasser.

Anfangs kann und sollte dieses Grundwassermonitoring mit Forschungsprojekten begleitet werden, um Referenzdaten zu schaffen, Methoden zu evaluieren und zu optimieren sowie Indizes zur Güte der Ökosysteme im Grundwasser zu etablieren. Mittelfristig sollte ein Biodiversitätsmonitoring in das nationale NAQUA-Monitoring integriert und unabhängig von Forschungsinstituten wie der Eawag umgesetzt werden können. Während wir für eine unmittelbare Umsetzung von Szenario 1 plädieren, sollte im Sinne der Schweizer Grundwasserbiodiversität langfristig das Szenarios 2 «NAQUA TREND – BIO+» angepeilt werden. Durch gezielte weitere Messstellen sind hiermit deutlich breitere und repräsentativere Aussagen möglich.

6 – Literaturverzeichnis

- Allanic, Y. (2012). Crustacés d'eau douce de France métropolitaine. *Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris*.
- Allford, A., Cooper, S. J. B., Humphreys, W. F., & Austin, A. D. (2008). Diversity and distribution of groundwater fauna in a calcrete aquifer: Does sampling method influence the story? *Invertebrate Systematics*, 22(2), 127–138. <https://doi.org/10.1071/IS07058>
- Altermatt, F., Alther, R., Fišer, C., Jokela, J., Konec, M., Küry, D., Mächler, E., Stucki, P., & Westram, A. M. (2014). Diversity and Distribution of Freshwater Amphipod Species in Switzerland (Crustacea: Amphipoda). *PLoS ONE*, 9(10), e110328.
- Altermatt, F., Alther, R., Fišer, C., & Švara, V. (2019). *Amphipoda (Flohkrebse) der Schweiz* (Vol. 32). info fauna CSCF & SEG.
- Altermatt, F., Carraro, L., Antonetti, M., Albouy, C., Zhang, Y., Lyet, A., Zhang, X., & Pellissier, L. (2023). Quantifying biodiversity using eDNA from water bodies: General principles and recommendations for sampling designs. *Environmental DNA*, 5(4), 671–682. <https://doi.org/10.1002/edn3.430>
- Alther, R., Bongni, N., Borko, Š., Fišer, C., & Altermatt, F. (2021). Citizen science approach reveals groundwater fauna in Switzerland and a new species of *Niphargus* (Amphipoda, Niphargidae). *Subterranean Biology*, 39, 1–31. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.39.66755>
- Antich, A., Palacin, C., Wangenstein, O. S., & Turon, X. (2021). To denoise or to cluster, that is not the question: Optimizing pipelines for COI metabarcoding and metaphylogeography. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 177.

- Aquilina, L., Stumpp, C., Tonina, D., & Buffington, J. M. (2023). Chapter 1—Hydrodynamics and geomorphology of groundwater environments. In F. Malard, C. Griebler, & S. Rétaux (Eds.), *Groundwater Ecology and Evolution (Second Edition)* (pp. 3–37). *Academic Press*.
- Arndt, H., Gierig, M., Griebler, C., Guderitz, I., Krauss, G., Marxsen, J., Näveke, R., Preuss, G., Schminke, H. K., Scholz-Muramatsu, H., & Toussaint, B. (2005). *Lebensraum Grundwasser* (Schriftenreihe der Vereinigung Deutscher Gewässerschutz, Band 68). Vereinigung Deutscher Gewässerschutz.
- Arndt, H. (2012). *Grundwasserbiologie: Grundlagen und Anwendungen*. DWA, Dt. Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall.
- BAFU. (2019a). Indikator-Set 6 – Makrozoobenthos. In *Wirkungskontrolle Revitalisierung – Gemeinsam lernen für die Zukunft*. Bundesamt für Umwelt BAFU.
- BAFU. (2019b). *Zustand und Entwicklung Grundwasser Schweiz. Ergebnisse der Nationalen Grundwasserbeobachtung NAQUA, Stand 2016*. Bundesamt für Umwelt.
- BAFU. (2022). *Gewässer in der Schweiz. Zustand und Massnahmen*. In Bundesamt für Umwelt (BAFU) (Ed.), *Umwelt-Zustand* (p. 90). Bundesamt für Umwelt (BAFU).
- BAFU. (2025). *Nitrat im Grundwasser*. Abgerufen am 30. September 2025.
- BDM coordination office, *Sample Design of Biodiversity Monitoring Switzerland (BDM)*, 2011, Biodiversity Monitoring Switzerland: Bern. p. 20
- Baird, D. J., & Hajibabaei, M. (2012). *Biomonitoring 2.0: A new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing*. Wiley Online Library.

- Bessey, C., Gao, Y., Truong, Y. B., Miller, H., Jarman, S. N., & Berry, O. (2022). Comparison of materials for rapid passive collection of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 22(7), 2559–2572. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13640>
- Behrmann-Godel, J., Nolte, A. W., Kreiselmaier, J., Berka, R., & Freyhof, J. (2017). The first European cave fish. *Current Biology*, 27(7), R257-R258.
- Bernasconi, R. (2010): Die Karstgebiete und die Höhlenfauna der Schweiz – Les karsts et la faune cavernicole de Suisse. *Stalactite* 60, 1, 2010, 53-71, La Chaux-de-Fonds. SZ ISSN 0038-9226
- Blackman, R., Walser, J.-C., Rüber, L., Brantschen, J., Villalba, S., Brodersen, J., Seehausen, O., & Altermatt, F. (2023). General principles for assignments of communities from eDNA: Open versus closed taxonomic databases. *Environmental DNA*, 5(2), 326–342. <https://doi.org/10.1002/edn3.382>
- Blaxter, M. (2003). Molecular systematics—counting angels with DNA. *Nature* 421, 122–124
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1935-1943.
- Borko, Š., Altermatt, F., Zgajmajster, M., & Fišer, C. (2022). A hotspot of groundwater amphipod diversity on a crossroad of evolutionary radiations. *Diversity and Distributions*, 28(12), 2765–2777. <https://doi.org/10.1111/ddi.13500>
- Botosaneanu, L. (Ed.). (1986). Stygofauna mundi: A Faunistic, Distributional, and Ecological Synthesis of the World Fauna Inhabiting Subterranean Waters (Including the Marine Interstitial). E.J. Brill.

- Boulton, A. J., Fenwick, G. D., Hancock, P. J., & Harvey, M. S. (2008). Biodiversity, functional roles and ecosystem services of groundwater invertebrates. *Invertebrate Systematics*, 22(2), 103–116.
<https://doi.org/10.1071/IS07024>
- Brantschen, J., & Altermatt, F. (2024). Contrasting strengths of eDNA and electrofishing compared to historic records for assessing fish community diversity and composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 81, 178–189.
- Brantschen, J., Fopp, F., Adde, A., Keck, F., Guisan, A., Pellissier, L., & Altermatt, F. (2024). Habitat suitability models reveal the spatial signal of environmental DNA in riverine networks. *Ecography*, 2024, e07267.
- Brantschen, J., Pellissier, L., Walser, J.-C., & Altermatt, F. (2022). Evaluation of primer pairs for eDNA-based assessment of Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera across a biogeographically diverse region. *Environmental DNA*, 4, 1356–1368.
- Brantschen, J., Blackman, R. C., Walser, J.-C., & Altermatt, F. (2021). Environmental DNA gives comparable results to morphology-based indices of macroinvertebrates in a large-scale ecological assessment. *PLOS ONE*, 16(9), e0257510.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257510>
- Brunke, Matthias, and Tom Gonser. “Hyporheic Invertebrates: The Clinal Nature of Interstitial Communities Structured by Hydrological Exchange and Environmental Gradients.” *Journal of the North American Benthological Society* 18, no. 3 (1999): 344–62.
<https://doi.org/10.2307/1468448>.
- BRGM. (2023). BRGM Annual Report 2023. Bureau de Recherches Géologiques et Minières.
- Bruce, K., Blackman, R., Bourlat, S. J., Hellström, A. M., Bakker, J., Bista, I., Bohmann, K., Bouchez, A., Brys, R., Clark, K., Elbrecht, V., Fazi, S., Fonseca, V., Hänfling, B., Leese, F., Mächler, E.,

- Mahon, A. R., Meissner, K., Panksep, K., ... Deiner, K. (2021). A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. *Advanced Books*, 1, e68634.
<https://doi.org/10.3897/ab.e68634>
- Burmeister, E. (2003). Rote Liste gefährdeter wasserbewohnender Krebse, exkl. Kleinstkrebse (limn. Crustacea) Bayerns. LfU (Bayerisches Landesamt Für Umweltschutz, Hrsg.): Rote Liste Gefährdeter Tiere Bayerns. Schriftenreihe, 166, 328–330.
- BUWAL. (2004). Wegleitung Grundwasserschutz. Vollzug Umwelt.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639–2643.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- CEN. (2023). EN 17805:2023 – Water quality – Sampling, capture and preservation of environmental DNA from water. CEN (European Committee for Standardization).
- Chappuis, P. A. (1948). Copépodes, Syncarides et Isopodes des eaux phréatiques de Suisse. *Revue suisse de zoologie*, 55, 549–566.
- Couton, M., Hürlemann, S., Studer, A., Alther, R., & Altermatt, F. (2023a). Groundwater environmental DNA metabarcoding reveals hidden diversity and reflects land-use and geology. *Molecular Ecology*, 32(13), 3497–3512. <https://doi.org/10.1111/mec.16955>
- Couton, M., Studer, A., Hürlemann, S., Locher, N., Knüsel, M., Alther, R., & Altermatt, F. (2023b). Integrating citizen science and environmental DNA metabarcoding to study biodiversity of

groundwater amphipods in Switzerland. *Scientific Reports*, 13(1), 18097.

<https://doi.org/10.1038/s41598-023-44908-8>

Culver, D. C., Pipan, T., & Fišer, Ž. (2023). Chapter 4—Ecological and evolutionary jargon in subterranean biology. In F. Malard, C. Griebler, & S. Rétaux (Eds.), *Groundwater Ecology and Evolution* (Second Edition) (pp. 89–110). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819119-4.00017-2>

Danielopol, D. L., Griebler, C., Gunatilaka, A., & Notenboom, J. (2003). Present state and future prospects for groundwater ecosystems. *Environmental Conservation*, 30(2), 104–130. <https://doi.org/10.1017/S0376892903000109>

Deharveng, L., Stoch, F., Gibert, J., Bedos, A., Galassi, D., Zgmaajster, M., Brancelj, A., Camacho, A., Fiers, F., Martin, P., Giani, N., Magniez, G., & Marmonier, P. (2009). Groundwater biodiversity in Europe. *Freshwater Biology*, 54(4), 709–726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.01972.x>

Delić, T., Di Batista Borko, Š., Premate, E., Rexhepi, B., Alther, R., Knüsel, M., Malard, F., Weber, D., Stoch, F., Flot, J.-F., Fišer, C., & Altermatt, F. (2025). Phylogenetic Origin of Morphologically Cryptic Species Shapes Co-Occurrence and Sympatry Patterns. *Freshwater Biology*, 70(2), e70000. <https://doi.org/10.1111/fwb.70000>

Di Giacinto, F., Berti, M., Carbone, L., Caprioli, R., Colaiuda, V., Lombardi, A., Tomassetti, B., Tuccella, P., De Iuliis, G., Pietroleonardo, A., Latini, M., Mascilongo, G., Di Renzo, L., D’Alterio, N., & Ferri, N. (2021). Biological Early Warning Systems: The Experience in the Gran Sasso-Sirente Aquifer. *Water*, 13(11), 1529. <https://doi.org/10.3390/w13111529>

Di Lorenzo, T., Di Marzio, W. D., Sáenz, M. E., Baratti, M., Dedonno, A. A., Iannucci, A., Cannicci, S., Messina, G., & Galassi, D. M. P. (2014). Sensitivity of hypogean and epigean freshwater

copepods to agricultural pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(6), 4643–4655.

<https://doi.org/10.1007/s11356-013-2390-6>

Di Lorenzo, T., Lunghi, E., Aanei, C., Altermatt, F., Alther, R., Amorim, I. R., .. & Mammola, S. (2024).

EU needs groundwater ecosystems guidelines. *Science*, 386(6726), 1103-1103.

Dole-Olivier, M.-J., Malard, F., Martin, D., Lefébure, T., & Gibert, J. (2009). Relationships between

environmental variables and groundwater biodiversity at the regional scale. *Freshwater Biology*,

54(4), 797–813. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02184.x>

Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union. (2000). Richtlinie 2000/60/EG des

Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines

Ordnungsrahmens für Massnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik.

Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union. (2006). Richtlinie 2006/118/EG des

Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Dezember 2006 zum Schutz des

Grundwassers vor Verschmutzung und Verschlechterung.

Ferguson, G., McIntosh, J. C., Warr, O., Sherwood Lollar, B., Ballentine, C. J., Famiglietti, J. S., Kim, J.-

H., Michalski, J. R., Mustard, J. F., Tarnas, J., & McDonnell, J. J. (2021). Crustal Groundwater

Volumes Greater Than Previously Thought. *Geophysical Research Letters*, 48(16), e2021GL093549.

<https://doi.org/10.1029/2021GL093549>

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental

DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425.

<https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>

Fillinger, L., Griebler, C., Hellal, J., Joulain, C., & Weaver, L. (2023). Chapter 9—Microbial diversity and

processes in groundwater. In F. Malard, C. Griebler, & S. Rétaux (Eds.), *Groundwater Ecology*

and Evolution (Second Edition) (pp. 211–240). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819119-4.00009-3>

Fišer, C., Zagmajster, M., Jemec Kokalj, A., Mali, N., Šumrada, T., Glavan, M., Hose, G. C., Schwartz, B., Lorenzo, T. D., Griebler, C., & Cvejić, R. (2025). Toward sustainable irrigation practices safeguarding groundwater biodiversity and ecosystem services. *BioScience*, biaf016. <https://doi.org/10.1093/biosci/biaf016>

Fuchs, A., Hahn, H. J., & Cho, J. L. (2012). *Parabathynella badenwuerttembergensis* n. sp., the first record of Parabathynellidae Noodt, 1965 (Malacostraca: Bathynellacea) from Germany. *Journal of Crustacean Biology*, 32(4), 655–663.

Gattlen, N., & Klaus, G. (2023). Biodiversität in der Schweiz: Zustand und Entwicklung. In Bundesamt für Umwelt (BAFU) (Ed.), *Umwelt-Zustand* (p. 95). Bundesamt für Umwelt (BAFU).

Galassi, D. M. P., Stoch, F., Fiasca, B., di Lorenzo, T., & Gattone, E. (2009). Groundwater biodiversity patterns in the Lessinian Massif of northern Italy. *Freshwater Biology*, 54(4), 830–847. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02203.x>

Gibert, J. (1986). *Ecologie d'un système karstique jurassien: Hydrogéologie, dérive animale, transits de matières, dynamique de la population de Niphargus* (Crustacé Amphipode) [PhD Thesis]. Lyon 1.

Gibert, J., & Culver, D. C. (2009). Assessing and conserving groundwater biodiversity: An introduction. *Freshwater Biology*, 54(4), 639–648. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02202.x>

Gibert, J., Culver, D. C., Dole-Olivier, M.-J., Malard, F., Christman, M. C., & Deharveng, L. (2009). Assessing and conserving groundwater biodiversity: Synthesis and perspectives. *Freshwater Biology*, 54(4), 930–941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02201.x>

- Gibert, J., Danielopol, D. L., & Stanford, J. A. (1994). Groundwater ecology (Vol. 1). *Academic Press*.
- Ginet, R. (1969). Rythme saisonnier des reproductions de *Niphargus* (Crust. Amphip. Hypogé). *Annls Spéleol.*, 24, 387–397.
- Gleeson, T., Befus, K. M., Jasechko, S., Luijendijk, E., & Cardenas, M. B. (2016). The global volume and distribution of modern groundwater. *Nature Geoscience*, 9(2), 161–167.
<https://doi.org/10.1038/ngeo2590>
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., Spear, S. F., McKee, A., Oyler-McCance, S. J., Cornman, R. S., Laramie, M. B., Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., Takahara, T., Herder, J. E., & Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299–1307.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>
- Griebler, C., & Avramov, M. (2015). Groundwater ecosystem services: A review. *Freshwater Science*, 34(1), 355–367. <https://doi.org/10.1086/679903>
- Griebler, C., Hug, K., Fillinger, L., Meyer, A., & Avramov, M. (2018). Der B-A-E Index – Ein mikrobiologisch-ökologisches Konzept zur Bewertung und Überwachung von Grundwasser. *Hydrologie Und Wasserbewirtschaftung*, 62(6), 378–386.
https://doi.org/10.5675/HyWa_2018.6_1
- Griebler, C., & Lueders, T. (2009). Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 54(4), 649–677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x>
- Griebler, C., Karwautz, C., Rasch, G., Fillinger, L., Veits, R., Junker, R., Gaviña-Melo, S., Fuchs, A., Scharhauser, F., Eisendle, U., & others. (2023). Inventory of a world hotspot of groundwater

fauna biodiversity-the Lobau wetland and the Danube Floodplain National Park (Austria) revisited. *Acta ZooBot Austria*, 159, 21–65.

Griebler, C., Malard, F., & Lefébure, T. (2014a). Current developments in groundwater ecology—From biodiversity to ecosystem function and services. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 159–167.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.018>

Griebler, C., Stein, H., Hahn, H. J., Steube, C., Kellermann, C., Fuchs, A., Berkhoff, S., & Briemann, H. (2014b). Entwicklung biologischer Bewertungsmethoden und -kriterien für Grundwasserökosysteme. Umweltbundesamt.

Griebler, C., Stein, H., Kellermann, C., Berkhoff, S., Briemann, H., Schmidt, S., Selesi, D., Steube, C., Fuchs, A., & Hahn, H. J. (2010). Ecological assessment of groundwater ecosystems – Vision or illusion? *Ecological Engineering*, 36(9), 1174–1190.

Groh, K., Bössneck, U., Clewing, C., Albrecht, C., & Richling, I. (2020). A new pill clam from an unusual habitat: the interstitial *Pisidium interstitialis* n. sp.(Bivalvia: Sphaeriidae) from southwestern and central Germany. *Journal of Molluscan Studies*, 86(2), 104-119.

Haberthür M. Alvarez-Troncoso R. (2025): Résultats des 4ème relevés NAWATrend Lot 2, macrozoobenthos, 50 p.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.

Hendricks, A., Mackie, C. M., Luy, E., Sonnichsen, C., Smith, J., Grundke, I., Tavasoli, M., Furlong, A., Beiko, R. G., LaRoche, J., & Sieben, V. (2023). Compact and automated eDNA sampler for in situ monitoring of marine environments. *Scientific Reports*, 13(1), 5210.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-32310-3>

- Hirsch, P., & Rades-Rohkohl, E. (1983). Die Zusammensetzung der natürlichen Grundwasser-Mikroflora und Untersuchungen über ihre Wechselbeziehungen mit Fäkalbakterien. In DVGW-Schriftenreihe Wasser (Vol. 35, pp. 59–80). DVGW.
- Hleap, J. S., Littlefair, J. E., Steinke, D., Hebert, P. D. N., & Cristescu, M. E. (2021). Assessment of current taxonomic assignment strategies for metabarcoding eukaryotes. *Molecular Ecology Resources*, 21(7), 2190–2203. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13407>
- Hose, G. C., Chariton, A., Daam, M. A., Di Lorenzo, T., Galassi, D. M. P., Halse, S. A., Reboleira, A. S., Robertson, A. L., Schmidt, S. I., & Korbel, K. L. (2022). Invertebrate traits, diversity and the vulnerability of groundwater ecosystems. *Functional Ecology*.
- Hose, G. C., & Stumpp, C. (2019). Architects of the underworld: Bioturbation by groundwater invertebrates influences aquifer hydraulic properties. *Aquatic Sciences*, 81(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00027-018-0613-0>
- Hudoklin, A. (2016). The status of *Proteus* in the NATURA 2000 network in Slovenia. *Natura Sloveniae*, 18(1), Article 1. <https://doi.org/10.14720/ns.18.1.43-44>
- Humphreys, W. F. (2009). Hydrogeology and groundwater ecology: Does each inform the other? *Hydrogeology Journal*, 17(1), 5–21. <https://doi.org/10.1007/s10040-008-0349-3>
- Hunkeler, D., Goldscheider, N., Rossi, P., & Burn, C. (2006). Biozönosen im Grundwasser. *Umwelt-Wissen*, 0603, 113.
- Hutchins, B. T., Engel, A. S., Nowlin, W. H., & Schwartz, B. F. (2016). Chemolithoautotrophy supports macroinvertebrate food webs and affects diversity and stability in groundwater communities. *Ecology*, 97(6), 1530–1542. <https://doi.org/10.1890/15-1129.1>

- Jarman, S. N., Berry, O., & Bunce, M. (2018). The value of environmental DNA biobanking for long-term biomonitoring. *Nature Ecology & Evolution*, 2(8), 1192–1193.
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0614-3>
- Jimenez-Martinez, J. (2024). Review on the impact of water temperature changes due to geothermal activities on groundwater microbiology and associated geochemical processes (Im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt [BAFU]). Eawag, Department of Water Resources and Drinking Water & ETH Zürich, Department of Civil, Environmental and Geomatic Engineering.
- Johns, T. (2024, September 10). Developing the First National Monitoring Network for Groundwater Ecology in England. <https://www.abcdarkworld.com/icsb-conference/abstracts/abstract-t-johns-developing-the-first-national-monitoring-network-for-groundwater-ecology-in-england/>
- Keck, F., Brantschen, J., & Altermatt, F. (2023). A combination of machine-learning and eDNA reveals the genetic signature of environmental change at the landscape levels. *Molecular Ecology*, 32(17), 4791–4800. <https://doi.org/10.1111/mec.17073>
- Keck, F., Couton, M., & Altermatt, F. (2023). Navigating the seven challenges of taxonomic reference databases in metabarcoding analyses. *Molecular Ecology Resources*, 23(4), 742–755.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13746>
- Klaus, G., Cordillot, F., & Künzle, I. (2023). Gefährdete Arten und Lebensräume in der Schweiz: Synthese Rote Listen. In Bundesamt für Umwelt (BAFU) (Ed.), Umwelt-Zustand (p. 58). Bundesamt für Umwelt (BAFU).
- Knüsel, M. (2024a). Opening the Black Box: Biodiversity and Biogeography of Groundwater Amphipods in Switzerland [PhD Thesis]. University of Zurich.

- Knüsel, M., Alther, R., & Altermatt, F. (2024b). Pronounced changes of subterranean biodiversity patterns along a Late Pleistocene glaciation gradient. *Ecography*, 2024(8), e07321. <https://doi.org/10.1111/ecog.07321>
- Knüsel, M., Alther, R., Locher, N., Ozgul, A., Fišer, C., & Altermatt, F. (2024c). Systematic and highly resolved modelling of biodiversity in inherently rare groundwater amphipods. *Journal of Biogeography*, 51(11), 2094–2108. <https://doi.org/10.1111/jbi.14975>
- Knüsel, M., Alther, R., & Altermatt, F. (2024d). Terrestrial land use signals on groundwater fauna beyond current protection buffers. *Ecological Applications*, 34(8), e3040.
- Knüsel, M., Borko, Š., Alther, R., Salussolia, A., Flot, J.-F., Altermatt, F., Fišer, C., & Stoch, F. (2023). Phylogenetic structure and molecular species delimitation hint a complex evolutionary history in an Alpine endemic *Niphargus* clade (Crustacea, Amphipoda). *Zoologischer Anzeiger*, 306, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2023.07.001>
- Koch, F., Blum, P., Korbel, K., & Menberg, K. (2024). Global overview on groundwater fauna. *Ecohydrology*, 17(1), e2607. <https://doi.org/10.1002/eco.2607>
- Koch, F., Blum, P., Stein, H., Fuchs, A., Hahn, H. J., & Menberg, K. (2024). Temporal shift in groundwater fauna in southwestern Germany. *Hydrology and Earth System Sciences*, 28(22), 4927–4946. <https://doi.org/10.5194/hess-28-4927-2024>
- Korbel, K. L., & Hose, G. C. (2011). A tiered framework for assessing groundwater ecosystem health. *Hydrobiologia*, 661(1), 329–349. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0541-z>
- Korbel, K. L., & Hose, G. C. (2017). The weighted groundwater health index: Improving the monitoring and management of groundwater resources. *Ecological Indicators*, 75, 164–181. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.11.039>

- Korbel, K. L., Lim, R. P., & Hose, G. C. (2013). An inter-catchment comparison of groundwater biota in the cotton-growing region of north-western New South Wales. *Crop and Pasture Science*, 64(12), 1195–1208. <https://doi.org/10.1071/CP13176>
- Kretschmer, D., Wachholz, A., & Reinecke, R. (2023). Chapter 21—Global groundwater in the Anthropocene. In F. Malard, C. Griebler, & S. Rétaux (Eds.), *Groundwater Ecology and Evolution* (Second Edition) (pp. 483–500). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819119-4.00021-4>
- Leese, F., Woppowa, L., Bálint, M., Höss, S., Krehenwinkel, H., Lötters, S., Meissner, K., Nowak, C., Rausch, P., Rduch, V., Rulik, B., Weigand, A. M., Zimmermann, J., Koschorreck, J., & Züghart, W. (2023). DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung? Eine Handlungsempfehlung aus Forschung und Praxis. Bundesamt für Naturschutz.
- Loepfe, S., & Meier, R. (2023). Energetische Nutzung von Grundwasser. *Aqua & Gas*, 103(6).
- Lubini, V., Knispel, S., Sartori, M., Vicentini, H., & Wagner, A. (2012). Rote Listen Eintagsfliegen, Steinfliegen, Köcherfliegen. Gefährdete Arten der Schweiz, Stand 2010. Bundesamt für Umwelt, Bern, und Schweizer Zentrum für die Kartographie der Fauna, Neuenburg.
- LUBW (Ed.). (2025). Die Grundwasserfauna in Baden-Württemberg (1st ed.). LUBW-Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg.
- Madsen, E. L., Ghiorse, W. C., & Ford, T. (1993). *Aquatic Microbiology: An Ecological Approach*. *Blackwell Scientific Publications*, Boston.
- Magnabosco, C., Lin, L.-H., Dong, H., Bomberg, M., Ghiorse, W., Stan-Lotter, H., Pedersen, K., Kieft, T. L., van Heerden, E., & Onstott, T. C. (2018). The biomass and biodiversity of the

continental subsurface. *Nature Geoscience*, 11(10), 707–717. <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0221-6>

Mahé, F., Czech, L., Stamatakis, A., Quince, C., Vargas, C., Dunthorn, M., & Rognes, T. (2021). Swarm v3: Towards tera-scale amplicon clustering', *Bioinformatics* (I. Birol, Ed.; Vol. 38, Issue 1, pp. 267–269). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab493>.

Mammola, S., Meierhofer, M. B., Borges, P. A. V., Colado, R., Culver, D. C., Deharveng, L., Delić, T., Di Lorenzo, T., Dražina, T., Ferreira, R. L., Fiasca, B., Fišer, C., Galassi, D. M. P., Garzoli, L., Gerovasileiou, V., Griebler, C., Halse, S., Howarth, F. G., Isaia, M., ... Cardoso, P. (2022). Towards evidence-based conservation of subterranean ecosystems. *Biological Reviews*, 97(4), 1476–1510. <https://doi.org/10.1111/brv.12851>

Marmonier, P., Galassi, D. M. P., Korbel, K., Close, M., Datry, T., & Karwautz, C. (2023). Chapter 5—Groundwater biodiversity and constraints to biological distribution. In F. Malard, C. Griebler, & S. Rétaux (Eds.), *Groundwater Ecology and Evolution* (Second Edition) (pp. 113–140). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819119-4.00003-2>

Marmonier, P., Maazouzi, C., Foulquier, A., Navel, S., François, C., Hervant, F., Mermillod-Blondin, F., Vieney, A., Barraud, S., Togola, A., & Piscart, C. (2013). The use of crustaceans as sentinel organisms to evaluate groundwater ecological quality. *Ecological Engineering*, 57, 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.009>

Martinez, A., Anicic, N., & others. (2024, September 9). Stygofauna Mundi: A Comprehensive Global Biodiversity Database of Groundwater-Related Habitats across Marine and Freshwater Realms. 26th International Conference on Subterranean Biology and 6th International Symposium on Anchialine Ecosystems.

- Mermillod-Blondin, F., Hose, G. C., Simon, K. S., Korbel, K., Avramov, M., & Vorste, R. V. (2023). Chapter 11—Role of invertebrates in groundwater ecosystem processes and services. In F. Malard, C. Griebler, & S. Rétaux (Eds.), *Groundwater Ecology and Evolution* (Second Edition) (pp. 263–281). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819119-4.00008-1>
- Moeschler, P., & Rouch, R. (1984). Un nouveau genre de Canthocamptidae (Copepoda, Harpacticoidea) des eaux souterraines de Suisse. *Revue Suisse de Zoologie*, 91(4), 959-972.
- Moeschler, P., & Rouch, R. (1988). Découverte D'Un Nouveau Représentant De La Famille Des Gelyellidae (Copepoda, Harpacticoida) Dans Les Eaux Souterraines De Suisse. *Crustaceana*, 55(1), 1-16. <https://doi.org/10.1163/156854088X00203>
- Mori, N., Vehovar, Ž., Brad, T., Balázs, G., Englisch, C., Fišer, C., .. & Zagmajster, M. (2025). A Comprehensive Occurrence Dataset for European Ostracoda Inhabiting Groundwater and Groundwater-Dependent Ecosystems. *Global Ecology and Biogeography*, 34(6), e70065.
- Mouthon, J., Bertrand, A., & Audibert, C. (2021). A propos de la nouvelle espèce *Pisidium interstitialis* (Bivalvia: Sphaeriidae) et de sa présence en France. *Folia Conchyliologica*, 62, 3-8.
- Orghidan, T. (1959). A new habitat of subsurface waters: The hyporheic biotope. Fundamental and *Applied Limnology*, 176(4), 291–302. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2010/0176-0291>
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 29(22), 4258–4264. <https://doi.org/10.1111/mec.15643>
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Mächler, E., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA applications for biomonitoring and bioassessment in aquatic ecosystems. <https://doi.org/10.5167/UZH-187800>

- Pfannkuch, H.-O. (1969). Elsevier's dictionary of hydrogeology: In three languages; English, French, German.
- Pronk, M., Sinreich, M., Guhl, F., Egli, T., Felleisen, R., Koch, M., Köster, O., Kötzsch, S., Raetz, E., Ramseier, C., Rossi, P., & Schürch, N. (2010). Auftreten von Mikroorganismen im Grundwasser—Ein erster landesweiter Überblick. *Gas-Wasser-Abwasser*, 12, 1059–1071.
- Robertson, A., Brancelj, A., Stein, H., & Hahn, H. J. (2023). Chapter 2—Classifying groundwater ecosystems. In F. Malard, C. Griebler, & S. Rétaux (Eds.), *Groundwater Ecology and Evolution* (Second Edition) (pp. 39–60). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819119-4.00007-X>
- Rüetschi, J., Stucki, P., Müller, P., Vicentini, H., & Claude, F. (2012). Rote Liste Weichtiere (Schnecken und Muscheln). Gefährdete Arten der Schweiz, Stand 2010. Bundesamt für Umwelt, Bern, und Schweizer Zentrum für die Kartografie der Fauna, Neuenburg.
- Saccò, M., Elmasri, A., Tawal, M., Alther, R., Altermatt, F., Martínez, A., Mammola, S., Zagmajster, M., Saenz-Agudelo, P., Takahashi, M., Thornhill, J., Andouche, A., Baratti, M., Bilal, M., Bilandžija, H., Bolpagni, R., Boulamail, S., Celico, F., Chauveau, C. A., ... Guzik, M. T. (2025). Advancing subterranean conservation through Global Research on eDNA in Groundwaters (GReG). *Subterranean Biology*, 53, 31–40. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.53.165710>
- Saccò, M., Guzik, M. T., van der Heyde, M., Nevill, P., Cooper, S. J. B., Austin, A. D., Coates, P. J., Allentoft, M. E., & White, N. E. (2022). eDNA in subterranean ecosystems: Applications, technical aspects, and future prospects. *Science of The Total Environment*, 820, 153223. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153223>
- Saccò, M., Mammola, S., Altermatt, F., Alther, R., Bolpagni, R., Brancelj, A., Brankovits, D., Fišer, C., Gerovasileiou, V., Griebler, C., Guareschi, S., Hose, G. C., Korbel, K., Lictevout, E., Malard,

- F., Martínez, A., Niemiller, M. L., Robertson, A., Tanalgo, K. C., ... Reinecke, R. (2024). Groundwater is a hidden global keystone ecosystem. *Global Change Biology*, 30(1), e17066. <https://doi.org/10.1111/gcb.17066>
- Scarsbrook, M., Fenwick, G., & Radford, J. (2000). Living groundwater: studying the fauna beneath our feet. *Water & Atmosphere*, 8(3), 15-16.
- Schmidt, Susanne I., Nora Rütz, and Jürgen Marxsen. "Quantifying the Effect of Groundwater Fauna and Temperature on the Ecosystem Service of Microbial Carbon Degradation." Preprint, *bioRxiv*, July 27, 2025. <https://doi.org/10.1101/2025.07.26.665685>.
- Schneider, A. S., Knüsel, M., & Altermatt, F. (2023). Assessment of occurrence, diversity, and biomass of macroinvertebrates in Swiss groundwater systems using citizen science data. *Subterranean Biology*, 46, 147–164. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.46.112569>
- Sket, B. (2018). Collecting and processing crustaceans of subterranean habitats. *Journal of Crustacean Biology*, 38(3), 380–384
- Steube, C., Richter, S., & Griebler, C. (2009). First attempts towards an integrative concept for the ecological assessment of groundwater ecosystems. *Hydrogeology Journal*, 17(1), 23–35. <https://doi.org/10.1007/s10040-008-0346-6>
- Stoch, F., Artheau, M., Brancelj, A., Galassi, D. M. P., & Malard, F. (2009). Biodiversity indicators in European ground waters: Towards a predictive model of stygobiotic species richness. *Freshwater Biology*, 54(4), 745–755. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02143.x>
- Stoch, F., & Galassi, D. M. P. (2010). Stygobiotic crustacean species richness: A question of numbers, a matter of scale. *Hydrobiologia*, 653(1), 217–234. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0356-y>
- Strinati, P. (1966): Faune cavernicole de la Suisse. Thèse doctorat Faculté des Sciences de Toulouse. *Editions Centre National Recherche Scientifique. Ann. de spéléologie*, 21(1), pp. 5-268

- Strona, G., Fattorini, S., Fiasca, B., Di Lorenzo, T., Di Cicco, M., Lorenzetti, W., Boccacci, F., & Galassi, D. M. P. (2019). AQUALIFE Software: A New Tool for a Standardized Ecological Assessment of Groundwater Dependent Ecosystems. *Water*, 11(12), 2574.
<https://doi.org/10.3390/w11122574>
- Stubbington, R., Dole-Olivier, M.-J., Galassi, D. M. P., Hogan, J.-P., & Wood, P. J. (2016). Characterization of Macroinvertebrate Communities in the Hyporheic Zone of River Ecosystems Reflects the Pump-Sampling Technique Used. *PLOS ONE*, 11(10), e0164372.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164372>
- Studer, A. (2022). Diversity and distribution of groundwater amphipods in the catchment area of the river Töss. Master Thesis.
- Takahashi, M., Frøslev, T. G., Paupério, J., Thalinger, B., Klymus, K., Helbing, C. C., Villacorta-Rath, C., Silliman, K., Thompson, L. R., Jungbluth, S. P., Yong, S. Y., Formel, S., Jenkins, G., Laporte, M., Deagle, B., Rajbhandari, S., Jeppesen, T. S., Bissett, A., Jerde, C., ... Berry, O. (2025). A Metadata Checklist and Data Formatting Guidelines to Make eDNA FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, and Reusable). *Environmental DNA*, 7(3), e70100.
<https://doi.org/10.1002/edn3.70100>
- Takahashi, M., Saccò, M., Kestel, J. H., Nester, G., Campbell, M. A., van der Heyde, M., Heydenrych, M. J., Juszkievicz, D. J., Nevill, P., Dawkins, K. L., Bessey, C., Fernandes, K., Miller, H., Power, M., Mousavi-Derazmahalleh, M., Newton, J. P., White, N. E., Richards, Z. T., & Allentoft, M. E. (2023). Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Science of The Total Environment*, 873, 162322.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322>

- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4–18.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Trontelj, P., Douady, C. J., Fišer, C., Gibert, J., Gorički, Š., Lefébure, T., Sket, B., & Zakšek, V. (2009). A molecular test for cryptic diversity in ground water: How large are the ranges of macro-stygobionts? *Freshwater Biology*, 54(4), 727–744.
- Trujillo-González, A., Villacorta-Rath, C., White, N. E., Furlan, E. M., Sykes, M., Grossel, G., Divi, U. K., & Gleeson, D. (2021a). Considerations for future environmental DNA accreditation and proficiency testing schemes. *Environmental DNA*, 3(6), 1049–1058.
<https://doi.org/10.1002/edn3.243>
- Trujillo-González, A., Villacorta-Rath, C., White, N. E., Furlan, E. M., Sykes, M., Grossel, G., Divi, U. K., & Gleeson, D. (2021b). Considerations for future environmental DNA accreditation and proficiency testing schemes. *Environmental DNA*, 3(6), 1049–1058.
<https://doi.org/10.1002/edn3.243>
- Tufenkji, N., Ryan, J. N., & Elimelech, M. (2002). Peer reviewed: The promise of bank filtration. *ACS Publications*.
- UNESCO World Water Assessment Programme. (2022). The United Nations World Water Development Report 2022: Groundwater: Making the invisible visible—UNESCO Digital Library. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000380721>
- Università di Bologna. (2024). The University of Bologna Takes Action to Protect Groundwater Resources. <https://magazine.unibo.it/archivio/2024/the-university-of-bologna-takes-action-to-protect-groundwater-resources>

- Venarsky, M., Simon, K. S., Saccò, M., François, C., Simon, L., & Griebler, C. (2023). Chapter 10—Groundwater food webs. In F. Malard, C. Griebler, & S. Rétaux (Eds.), *Groundwater Ecology and Evolution* (Second Edition) (pp. 241–261). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819119-4.00010-X>
- Wackett, L. P., & Robinson, S. L. (2020). The ever-expanding limits of enzyme catalysis and biodegradation: Polyaromatic, polychlorinated, polyfluorinated, and polymeric compounds. *Biochemical Journal*, 477(15), 2875–2891. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190720>
- Weber, D., & Flot, J.-F. (2020). Rote Liste und Gesamtartenliste der Grundwasserkrebse (Niphargidae) des Saarlandes. Rote Liste Gefährdeter Tiere Und Pflanzen Des Saarlandes; Ministerium Für Umwelt Und Verbraucherschutz Und DELATTINIA: Saarbrücken Und Landsweiler-Reden, Germany, 3–9.
- Weigand, H., Beermann, A. J., Čiampor, F., Costa, F. O., Csabai, Z., Duarte, S., Geiger, M. F., Grabowski, M., Rimet, F., Rulik, B., Strand, M., Szucsich, N., Weigand, A. M., Willassen, E., Wyler, S. A., Bouchez, A., Borja, A., Čiamporová-Zat'ovičová, Z., Ferreira, S., ... Ekrem, T. (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of The Total Environment*, 678, 499–524. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.247>
- Wilkinson, M. D., Dumontier, M., Aalbersberg, Ij. J., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg, N., Boiten, J.-W., da Silva Santos, L. B., Bourne, P. E., Bouwman, J., Brookes, A. J., Clark, T., Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C. T., Finkers, R., ... Mons, B. (2016). The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Scientific Data*, 3(1), 160018. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.18>
- Wüthrich, R. (2021): Biologischer Zustand der grossen Fließgewässer. Bundesamt für Umwelt BAFU, Bern, 27 S.

- Wüthrich, R., & Altermatt, F. (2019). Aquatische Monitoringprogramme NAWA und BDM. Synergien, Strategien und Visionen, Bundesamt für Umwelt BAFU, Bern. 74 S.
- Zagmajster, M., Malard, F., Eme, D., & Culver, D. C. (2018). Subterranean Biodiversity Patterns from Global to Regional Scales. In O. T. Moldovan, I. Kováč, & S. Halse (Eds.), *Cave Ecology* (pp. 195–227). *Springer International Publishing*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98852-8_9
- Zinger, L., Bonin, A., Alsos, I. G., Bálint, M., Bik, H., Boyer, F., Chariton, A. A., Creer, S., Coissac, E., Deagle, B. E., De Barba, M., Dickie, I. A., Dumbrell, A. J., Ficetola, G. F., Fierer, N., Fumagalli, L., Gilbert, M. T. P., Jarman, S., Jumpponen, A., ... Taberlet, P. (2019). DNA metabarcoding—Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology*, 28(8), 1857–1862. <https://doi.org/10.1111/mec.15060>

Appendix

Appendix 1: Leitfaden und Kriterienkatalog für die Vergabe von eDNA-Dienstleistungen

1. Einleitung und Zweck

Dieser Appendix dient als Leitfaden für die Ausschreibung, Offertanfrage und Qualitätsprüfung von Dienstleistungen im Bereich Umwelt-DNA (eDNA) und kann sowohl für Oberflächengewässer als auch Grundwasser herangezogen werden. Es basiert auf dem Anwendungsleitfaden “Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen” (Pawlowski et al., 2020, S60–61) sowie dem Bericht “Machbarkeitsstudie Monitoring der Biodiversität im Grundwasser” (Kirschner et al., 2025). Ziel ist es, die Vergleichbarkeit, Reproduzierbarkeit und Qualität der Ergebnisse sicherzustellen. Der Leitfaden beinhaltet in Kurzform wichtige Punkte, die bei eDNA Projekten vom Anbieter bedacht oder eingehalten werden müssen, und soll bei der Bewertung von Angeboten als Hilfe dienen.

2. Eignungskriterien an das Labor/den Anbieter

Das beauftragte Labor muss nachweisen, dass es nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft und Technik arbeitet. Die Qualitätssicherung soll sich an den etablierten europäischen und internationalen Standards, sowie den für die Schweiz verfassten Leitfäden (Pawlowski et al., 2020) orientieren, die im Rahmen der **DNAqua-Net Initiative (Leese et al., 2016)** und durch das **CEN (European Committee for Standardization)** entwickelt wurden.

Geforderte Standards und Nachweise:

Anwendung spezifischer CEN-Normen: Der Anbieter bestätigt die Einhaltung der folgenden Normen und Vorgaben in ihrer jeweils aktuellen Fassung:

- Für **eDNA-Probenahmen aus Wasser** (allgemein): **CEN EN 17805** (Probenahme, Konservierung und Analyse von eDNA aus Wasser).

Infrastrukturelles Schutzkonzept: Das Labor muss sicherstellen, dass ein etabliertes Kontaminations-Management-System existiert, das die Anforderungen dieser Normen erfüllt. Dies beinhaltet zwingend:

- Die strikte räumliche Trennung von „sauberen“ (Pre-PCR) und „belasteten“ Arbeitsbereichen (Post-PCR).
- Einen unidirektionalen Arbeitsfluss (One-Way-Workflow), um Kontaminationen zu verhindern.
- Ein Dekontaminationskonzept für die Arbeitsbereiche (UV-C, Bleiche o.ä.)

Der Nachweis der Infrastruktur sollte auf Anfrage erbracht werden.

Eignung und Erfahrung: Hat das Labor bereits Erfahrung mit der Analyse von eDNA-Daten (gibt es Referenzprojekte)?

3. Anforderungen an die Probenahme

Dieser Abschnitt ist nur relevant, wenn die Probenahme Teil des Auftrags ist oder durch den Anbieter angeleitet wird.

Um die Integrität der Proben vor der Analyse zu gewährleisten, sind folgende Richtlinien einzuhalten:

- **Personal:** Die durchführenden Personen müssen für eDNA-Probenahmen geschult sein (z. B. sauberes Arbeiten im Feld, Reinigungsprotokolle etc.).
- **Dokumentation:** Das Verfahren (Filtertyp, Volumen, Methode) sowie die geografischen Koordinaten und ggf. Probentyp (z. B. Grundwasser, Fluss) sind detailliert zu protokollieren. Je nach Anwendung ist der Filtertyp vom Auftraggeber vorzugeben (für Grundwasser z. B. Sterivex oder Sylphium-Filter).
- **Replikate:** Es ist sicherzustellen, dass genügend biologische Replikate gesammelt werden. Im Grundwasser sind mindestens drei Filter-Replikate pro Messstelle empfohlen.
- **Material:** Die Verwendung von Einwegmaterial ist, wo möglich, zu bevorzugen und im Protokoll von wiederverwendbarem Material zu unterscheiden.

- **Dekontamination von Mehrweg-Ausrüstung:** Dies ist ein kritischer Punkt.
 - *Grundsätzlich:* Gegenstände, die im Feld verwendet werden, sollten regelmässig gereinigt werden. Im besten Fall sollten alle Gegenstände regelmässig mit Chlorbleiche (NaOCl, min. 1,5 %) gereinigt und danach mit DNA-freiem Wasser gespült werden.
 - Wenn Mehrwegprodukte verwendet werden, müssen vermehrt Negativkontrollen (“Handling”-Kontrollen) genommen werden.
- **Feld-Kontrollen:** Es müssen geeignete Negativkontrollen (Blindproben) direkt im Feld genommen und durch den gesamten Laborprozess parallel analysiert werden. Dies stellt sicher, dass das Feldteam genügend sauber arbeitet und etwaige Verunreinigungen nachverfolgt werden können.
- **Transport:** Die Probenkonservierung (Tiefkühlung oder Pufferlösung) muss lückenlos dokumentiert sein.

4. Methodik und Arbeit im Molekularlabor und Interpretation

Der Anbieter muss Transparenz über die verwendeten Methoden schaffen, um die Belastbarkeit der generierten Daten und Aussagen zu garantieren. Dies umfasst die eingesetzte Sequenziertiefe, die verwendeten Primer und die eingesetzten Bioinformatischen Auswertungsschritte.

- **Protokolle:** Detaillierte Laborprotokolle für jeden Schritt (Extraktion bis Sequenzierung, inkl. Primer und PCR-Bedingungen) müssen vorliegen oder referenziert werden. Diese sollten detailliert im Bericht/Resultaten aufgeführt sein.
- **Sequenzierung:** Eine **Sequenziertiefe** von mind. 50‘000–100‘000 Sequenzen pro Filter-Replikat. Zusätzlich sollte paired-end-sequencing (jedes DNA fragment wird einmal von vorn, und einmal von hinten gelesen, was Sequenzierfehler minimiert) der Standard sein, da dies die Qualität der Daten stark verbessert.
- **Validierung:** Für artenspezifische Nachweise ist das Validierungsniveau anzugeben (Referenz: www.edna-validation.com).
- **Interne Kontrollen:** Neben den Feld-Kontrollen müssen im Labor Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt und im Ergebnisbericht ausgewiesen werden. Als

Positivkontrolle kommen sowohl künstliche DNA-Sequenzen wie auch Mischproben in Frage.

- **Replikate:** Die Anzahl der technischen Replikate pro Probe sowie deren Verarbeitung sind zu dokumentieren. Es werden minimal drei Filter-Replikate und für jedes Filter-Replikat drei PCR-Replikate empfohlen.
- **Lagerung:** Es ist eine Vereinbarung über die langfristige Lagerung der DNA-Extrakte (Rückstellproben) zu treffen. Die gesamten Sequenzierdaten (Rohdaten Sequenzierung) sollten langfristig archiviert und mitgeliefert werden; ebenso sollte eine Archivierung der extrahierten DNA (Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) geprüft werden.

5. Datenverarbeitung, Reporting und Speicher

Die Eigentumsrechte an den Daten und die Genauigkeit der Berichterstattung müssen vertraglich fixiert werden. Es ist essenziell, die Eigentümerschaft und Rechte an den Rohdaten von Anfang an vertraglich klären. Es sollte dabei sichergestellt werden, dass Rechte an Rohdaten dem Auftraggeber zustehen (d.h. ausgehändigt werden).

Zu liefernde Datenformate (ggf. über offene Datenbanken):

- Vollständige Sequenz-Rohdaten (Output des Sequenzierers): FastQ (entweder pro Sample oder pro Projekt) drei Filterreplikate pro Messstelle zu unterscheiden sind.
- Begleitende Metadaten: Verwendete Tags, Laborprotokoll, verwendete Primer.
- Gefilterte Sequenzdaten (nach bioinformatischer Bereinigung): Fasta und/oder .csv
- Ergebnistabellen (OTUs/ASVs) mit relativen Häufigkeiten und taxonomischer Zuordnung: .csv (gefilterte “Finale” Liste UND ungefilterte Liste)
 - Diese Liste muss zwingend enthalten:
 - Konfidenz der Zuweisung zu einer taxonomischen Klasse (oder Sequenzähnlichkeit zu Referenz).
 - Anzahl der Reads.
- Kurzbericht/Analysebericht.

Inhalt des Analyseberichts: Der Bericht sollte folgende Informationen enthalten, um die Ergebnisse interpretierbar zu machen

- Verwendete Chemie im Labor (Extraktionschemie, Primer).
- Laborprotokoll (Anzahl PCRs, Tags, Primer, Typ der Negativ- und Positivkontrollen).
- Dokumentation der verwendeten bioinformatischen Pipeline (insb. Parameter und Schwellenwerte für das Filtern der Daten):
 - **Wichtig:** Die finale Artenliste sollte bereinigt sein. Offensichtliche Kontaminanten (z.B. Human-DNA, Haustiere, etc.) sind zu kennzeichnen oder in eine separate Kontaminations-Liste auszulagern. Die Schwellenwerte für diese Filterung (z. B. minimale Anzahl Reads pro Probe) müssen dokumentiert werden.
- Dokumentation und Erklärung, wie Nachweise in den Negativ- und Positivkontrollen für die Interpretation der Daten verwendet werden.
- Detaillierte Angabe über den Ausschluss von Sequenzen während der bioinformatischen Analyse.
- Referenz zur verwendeten Datenbank für die taxonomische Zuordnung (Name und Version, ggf. Information zur Erstellung).
 - Der Auftragnehmer muss offenlegen, welche Referenzdatenbank (inkl. Version, z.B. SILVA v138, PR2, BOLD, Custom-Database) genutzt wird. **Wichtig:** Es ist im Bericht anzugeben, wie gut die für das Projekt relevanten Zielgruppen in der Datenbank abgedeckt sind (Gap-Analyse). Beispiel: “Von den 50 in der Schweiz heimischen Fischarten sind 48 in unserer Referenzdatenbank enthalten“.
- Dokumentation und Interpretation etwaiger statistischer Analysen.

Referenzen:

Leese, F., Altermatt, F., Bouchez, A., Ekrem, T., Hering, D., Meissner, K., Mergen, P., Pawlowski, J., Piggott, J., Rimet, F., Steinke, D., Taberlet, P., Weigand, A., Abarenkov, K., Beja, P., Bervoets, L., Björnsdóttir, S., Boets, P., Boggero, A., ... Zimmermann, J. (2016) DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes*, 2: e11321. <https://doi.org/10.3897/rio.2.e11321>

Kirschner, D. Knüsel, M., Altermatt, F. & Alther, R. (2025): Machbarkeitsstudie Monitoring der Biodiversität im Grundwasser: Wissensstand – Methodik – Szenarien. Bundesamt für Umwelt BAFU, Bern, Schweiz. 117 S.

Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Mächler, E., & Altermatt, F. (2020): Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen. Richtlinien. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Wissen Nr. 2010: 77 S.

Appendix 2: Ausgewählte Ökosystemdienstleistungen des Grundwassers und Beispiele für verschiedene anthropogene Risiken, denen sie ausgesetzt sind. Übernommen und übersetzt aus Griebler et al., 2019

Gefährdete Grundwasser-Ökosystemdienstleistung(en)	Risiko	Ursache(n)	Beteiligte Mechanismen
→ Speicherung und Bereitstellung von sauberem Wasser (für häusliche, landwirtschaftliche und industrielle Nutzung) → Mineralwasser, Thermalquellen, Erholung und Tourismus, Kurorte, Höhlen und Quellen von kultureller Bedeutung	Kontamination mit Chemikalien	Kontamination von Aquiferen	Eintrag in das Grundwasser aus verschiedenen Quellen und über unterschiedliche Eintrittspfade; Anstieg der Chemikalienkonzentrationen
		Absenkung des Grundwasserspiegels infolge von Übernutzung Klimawandel	Geringeres Wasservolumen im Aquifer zur Verdünnung von Schadstoffen Verringerte Grundwasserneubildung infolge von Dürren; kontaminiertes Regenwasser bei Hochwasser
	Persistenz von Chemikalien im Grundwasser	Niedrige Konzentrationen von Mikroschadstoffen	Ineffiziente biologische Abbaubarkeit durch Mikroorganismen aufgrund thermodynamischer, enzymatischer und transportbedingter Limitierungen
	Änderung des Redox-Zustandes (Sauerstoffzehrung)	Nährstoffeintrag (DOC)	Sauerstoffzehrung durch mikrobiellen Abbau
	Mobilisierung von Schwermetallen und anderen Schadstoffen	- Sauerstoffzehrung/ Änderung des Redox-Zustandes - Änderungen des pH-Wertes	- Mikrobieller Abbau organischer Schadstoffe - Verschiebung des Kalk-Kohlensäure-Gleichgewichts infolge von Temperaturänderungen (z. B. durch Nutzung geothermischer Energie)
	Nährstoffeintrag (Nitrat)	Kontamination von Aquiferen aus landwirtschaftlich genutzten Flächen	Eintrag in das Grundwasser über unterschiedliche Eintrittspfade

	Salzwasserintrusion in Küstengebieten	Steigender Grundwasserbedarf während Dürren infolge des Klimawandels	Absenkung des Grundwasserspiegels infolge von Übernutzung
	Kontamination mit Pathogenen	Kontamination von Aquiferen	Eintrag in das Grundwasser aus verschiedenen Quellen und über unterschiedliche Eintrittspfade
	Verringerte Fließgeschwindigkeit und Aquifer-Permeabilität	Sedimentverstopfung infolge verminderter Bioturbation durch Grundwasserfauna	Störung oder Verlust der Grundwasserfauna (z. B. durch toxische Verschmutzung, Änderungen des natürlichen Temperaturregimes, Sauerstoffzehrung etc.)
→ Biologischer Abbau von Schadstoffen und Eliminierung von Pathogenen	Verminderte Effizienz	Überlastung, kurzzeitige und extreme Belastungspulse	Abbauergemeinschaften besitzen nicht genügend Potenzial und Zeit zur Reaktion
→ Pufferung von Hochwasser und Dürren → Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts grundwasserabhängiger Ökosysteme (GDEs)	Verringerte Wasserspeicherkapazität // Unzureichende Menge an verfügbarem Wasser	Dürren; Flächenversiegelung // Übernutzung des Grundwassers; Flächenversiegelung	Verringerte Wasseraufnahmefähigkeit trockener Böden während Dürren // Übernutzung; reduzierte Grundwasserneubildung durch Versiegelung

→ Biodiversität (seltene und endemische Arten, Funktionsvielfalt, Potenzial zur Entdeckung neuer Prozesse/Zukunftswissen etc.) → Bereitstellung von Bioindikator-Arten (z. B. für Biomonitoring) und Arten für ökotoxikologische Tests → Bioturbation (zur Aufrechterhaltung der Sedimentpermeabilität)	Artenverlust	• Toxische Verschmutzung • Sauerstoffzehrung • Änderungen des natürlichen Temperaturregimes • Habitatverlust • Konkurrenz durch einströmende Oberflächenwasserarten	• Akute und chronische toxische Effekte auf Grundwasserorganismen • Mikrobieller Abbau organischer Schadstoffe • Erwärmung und Abkühlung infolge geothermischer Nutzung; Klimawandel • Grundwasserspiegel-Schwankungen/Absenkung durch Entnahme • Eindringen von Oberflächenwasserarten während Hochwasserereignissen
---	---------------------	---	---

Appendix 3: Sammelanleitung für Quellwasserfassungen (konventionell)

Methode für Grundwasserfauna-Probenahme:

Einlaufrohr in Wasserfassung mit Filternetz beproben

Vorgehen

1. Vorbereitung: Rundes Filternetz zwei Wochen vor der Probenahme am Einlaufrohr der Quellwasserfassung befestigen.

- Naht des Filternetzes nach aussen, um Tiere im Filternetz nicht zu verletzen
- Netz mit Kabelbinder am Rohr fixieren (Foto 1)
- Falls Filternetz zu klein: Ring mit einer Schere aufschneiden oder ganz entfernen (Foto 2)
- Datum und Uhrzeit notieren



2. Probenahme (nach 2 Wochen): Filternetz auf Tiere untersuchen

- Ein Gefäß mit flachem Boden (bestenfalls schwarze Sortierschale) einige Zentimeter hoch mit Wasser füllen
- Filternetz vorsichtig vom Einlaufrohr entfernen und den Inhalt ins vorbereitete Gefäß ausstülpen und sanft ausschwenken (Foto 3)
- Gefäß auf Tiere untersuchen (z. B. Würmer, Krebse, Insekten – auch weisse/transparente Tiere suchen):
Wenn keine Tiere: protokollieren,
Wenn Tiere gefunden: Diese mit der Pinzette greifen (Foto 4) und zusammen in ein Alkohol-gefülltes Proberöhrchen geben (Foto 5). Zugehörige Etikette direkt zu den Tieren ins Proberöhrchen geben (Foto 6). Unbedingt alle Tiere einsammeln.
- Datum und Uhrzeit protokollieren.
- Filternetz nochmals kontrollieren (keine verbleibenden Tiere mehr darin?) und danach gründlich mit Wasser ausspülen für den nächsten Gebrauch.



Materialliste

- Filternetz (0,8 mm Maschenweite oder feiner)
- Lange Kabelbinder
- Schwarze Sortierschale
- Federstahlpinzette
- Proberöhrchen mit 85% nicht denaturiertem Ethanol
- Etiketten

Appendix 4: Sammelanleitung für Grundwasserfassungen (eDNA)

Dieses Protokoll dient der Illustration, fasst die wichtigsten Punkte zusammen und gibt einen Überblick über den allgemeinen Ablauf der Probenahme. Aufbauend darauf kann eine detaillierte Arbeitsanweisung für ein zukünftiges Monitoring erstellt werden, das auf den bestehenden Ablauf des NAQUA Monitorings abgestimmt ist.

1. Vorbereitung der Materialien

Pro Standort:

- 3 × 3 m flexibler Kunststoffschlauch (PVC/Silikon) mit Luer-Lock-Anschluss (Einweg oder autoklaviert)
- 3 × 50 ml Röhrchen (falls als Gewicht/Adapter benötigt)
- 3 × 10-Liter Messbehälter (z. B. Kanister oder Eimer; sauber/DNA-frei)
- 3 × Filter (z. B. Sterivex 0,45 µm) + Ersatzfilter
- 1 × Spritze (50–60 ml, um den Filter trocken zu drücken)
- 6 × Luer-Lock-Verschlusskappen (3 × männlich für Auslass, 3 × weiblich für Einlass)
- 3 × kleine Beutel zur Filteraufbewahrung (z. B. Zipper-Bags)
- 1 × grosser Beutel zur Sammlung der Triplikate

Allgemeines Equipment:

- Pumpe für Probenahme (z. B. Vampire Sampler oder Athena). Hinweis: Bei Peristaltikpumpen muss nur der Schlauch gewechselt werden.
- Kabelbinder
- 3 (Parallelfiltration) resp. 1 (Einzelfiltration) × 10-Liter Messbehälter mit feiner Skalierung (zur Volumenbestimmung)
- Kühltasche/Styroporbox mit Kühlelementen (oder Trockeneis)
- Verbrauchsmaterial: Latex- oder Nitrilhandschuhe, Abfallbeutel, Beutel für nasse Schläuche, Papierrolle.
- Reinigung/Desinfektion: Javel oder DNA-Exitus, Ethanol, Sprühflasche.
- Werkzeug: Stift (permanent), Marker, Zange, Klebeband, Rettungsdecke (als UV- und Hitzeschutz für die Proben), Pinzette.

2. Probenahme (Alle Messstationen)

Jeweils in Triplikaten (3 Filter pro Standort).

a. Vorbereitung am Standort:

- Drei Probenbehälter (Kanister) nacheinander mit dem Quellwasser befüllen (exaktes Vorgehen dafür unterscheidet sich je nach Ausführung der Messstelle).
- Frische Handschuhe anziehen.
- Pumpe und Schläuche vorbereiten: Jeder Filter erhält ein neues, sauberes Schlauchset. Die Pumpe selbst bleibt gleich (vorausgesetzt, das Wasser berührt keine Pumpenteile).
- Schläuche kurz mit dem Probenwasser vorspülen (ca. 10–20 Sekunden).

b. Filtration (Triplikate als Parallel- oder Einzelfiltration):

- Handschuhe wechseln.
- Filter vorbereiten (Beschriften, Filter an den Schlauch anschliessen, Vorsicht beim Umgang mit EtOH).
- Startzeit notieren.
- Filtration aus dem Probenbehälter (Kanister) starten.
- Volumenkontrolle: Den Abfluss des Filters in die/in den Behälter mit der feinen Skalierung leiten, um das gefilterte Volumen genau zu messen.
- Ziel: Minimum 5 Liter pro Filter oder filtern, bis der Filter verstopft ist.

c. Abschluss der Filtration:

- Nach der Probenahme den Filter trockenlaufen lassen:
 - Entweder durch Weiterlaufen der Pumpe an der Luft.
 - Oder mittels der Spritze 1–2-mal Luft durch den Filter drücken.
 - *Ziel:* Es sollte sich keine oder nur minimale Flüssigkeit in der Filterkapsel befinden.
- Handschuhe wechseln.
- Filter verschliessen: Beide Enden mit den passenden Luer-Lock-Kappen (bzw. bei Sylphium gemäss Herstellerangaben) abdichten.
- Endzeit und gefiltertes Gesamtvolumen notieren.

d. Verpackung:

- Filter einzeln in kleine Plastikbeutel verpacken.
- Alle drei Triplikate eines Standorts in einen grossen Sammelbeutel geben und gut verschliessen.

3. Nach der Probenahme & Transport

Gültig für trockenes Sampling ohne Pufferlösung.

- Kühlung: Proben sofort lichtgeschützt in der Kühltasche/Styroporbox auf Eis/Kühlakkus lagern.
- Reinigung: Probenahmegeräte (Oberflächen der Pumpe, Arbeitsflächen) mit Javel/Bleiche abwischen und ggf. mit Wasser nachspülen, um Kreuzkontaminationen für den nächsten Standort zu verhindern.
- Lagerung: Nach Rückkehr ins Labor die Proben umgehend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ einfrieren.