



Band 6

*Cylindrospermopsis raciborskii*  
und Cylindrospermopsin  
in Gewässern der Berliner Region

-Vorkommen, Ursachen, Auswirkungen-

Claudia Wiedner, Jacqueline Rücker, Bodo Weigert (Hrsg.)

Projektfinanzierung



Schriftenreihe Kompetenzzentrum Wasser Berlin

Band 6

***Cylindrospermopsis raciborskii* und *Cylindrospermopsis*  
in Gewässern der Berliner Region**

**Vorkommen, Ursachen, Auswirkungen**

**CYLIN**

Claudia Wiedner<sup>a</sup>, Jacqueline Rücker<sup>b</sup>, Anke Stüken<sup>a</sup>,  
Karina Preußel<sup>c</sup>, Jutta Fastner<sup>c</sup>, Ingrid Chorus<sup>c</sup> und Brigitte Nixdorf<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Limnologie Geschichteter Seen, Alte Fischerhütte 2, 16775 Stechlin, Deutschland

<sup>b</sup> Brandenburgische Technische Universität Cottbus, Lehrstuhl für Gewässerschutz, Forschungsstation Bad Saarow, Seestraße 45, 15526 Bad Saarow, Deutschland

<sup>c</sup> Umweltbundesamt, FG II 3.3, Corrensplatz 1, 14195 Berlin, Deutschland

Projektfinanzierung



***Cylindrospermopsis raciborskii* und Cylindrospermopsin in Gewässern  
der Berliner Region - Vorkommen, Ursachen, Auswirkungen**

Claudia Wiedner<sup>a</sup>, Jacqueline Rücker<sup>b</sup>, Anke Stüken<sup>a</sup>,  
Karina Preußel<sup>c</sup>, Jutta Fastner<sup>c</sup>, Ingrid Chorus<sup>c</sup> und Brigitte Nixdorf<sup>b</sup>  
Berlin 2007

Schriftenreihe Kompetenzzentrum Wasser Berlin, 1.2004 ff., Band 6

Herausgeber:

Bodo Weigert, Claudia Wiedner, Jacqueline Rücker

<sup>a</sup> Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei,  
Abteilung Limnologie Geschichteter Seen, Alte Fischerhütte 2, 16775 Stechlin, Deutschland

<sup>b</sup> Brandenburgische Technische Universität Cottbus, Lehrstuhl für Gewässerschutz,  
Forschungsstation Bad Saarow, Seestraße 45, 15526 Bad Saarow, Deutschland

<sup>c</sup> Umweltbundesamt, FG II 3.3, Corrensplatz 1, 14195 Berlin, Deutschland

ISBN 978-3-00-021363-2

Alle Rechte vorbehalten

© Kompetenzzentrum Wasser Berlin gGmbH, Berlin 2007

Cicerostraße 24

10709 Berlin

[www.kompetenz-wasser.de](http://www.kompetenz-wasser.de)

Umschlag: Votum GmbH, Berlin

Druck: Papyrus-Druck GmbH, Berlin

## Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung .....	1
1. Einleitung .....	3
2. Ziele .....	8
3. Konzept .....	9
3.1 Erfassung der derzeitigen Verbreitung von <i>C. raciborskii</i> , weiteren potenziellen CYN-Produzenten sowie CYN .....	9
3.2 Abschätzung der weiteren Entwicklung von <i>C. raciborskii</i> und CYN .....	10
3.3 Identifizierung von CYN-Produzenten .....	10
4. Die Gewässer und Untersuchungsmethoden .....	12
4.1 Screening .....	12
4.2 Monitoring und saisonale Dynamik.....	13
4.2.1 Die Lichtbedingungen in den Gewässern.....	14
4.2.2 Temperatur, Sauerstoff und pH-Wert im Gewässer und Gewässerdurchmischung.....	15
4.2.3 Probenahme .....	15
4.2.4 Analyse von Nährstoff- und Chlorophyll <i>a</i> -Konzentrationen.....	15
4.2.5 Phytoplankton-Analyse .....	16
4.2.6 CYN-Analyse .....	16
5. Verbreitung von <i>C. raciborskii</i> und weiteren Neo-Cyanobakterien <i>Anke Stüken</i> .....	19
6. Populationsdynamik von <i>C. raciborskii</i> in gemäßigten Klimazonen und Ursachen ihre Ausbreitung <i>Claudia Wiedner</i> .....	27
7. Verbreitung von Cylindrospermopsin <i>Jutta Fastner</i> .....	36
8. Identifizierung von CYN-Produzenten <i>Karina Preußel</i> .....	42
9. Detektion von Cylindrospermopsin-produzierenden Cyanobakterien mittels PCR <i>Anke Stüken</i> .....	49
10. Gelöste und partikuläre CYN-Konzentrationen in verschiedenen Seen und im saisonalen Verlauf <i>Jacqueline Rücker</i> .....	54
11. Gefährdungspotenzial, Empfehlungen und Ausblick.....	70
12. Danksagung .....	74
13. Literatur .....	76
Anhang.....	86



## Kurzfassung

### ***Cylindrospermopsis raciborskii* und Cylindrospermopsin in Gewässern der Berliner Region: Vorkommen, Ursachen, Auswirkungen (CYLIN)**

Dauer: 2/2004 – 1/2007

Volumen: 470.000 €

Projektnehmer: Dr. C. Wiedner, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Limnologie Geschichteter Seen;  
Prof. Dr. B. Nixdorf, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, Lehrstuhl für Gewässerschutz;  
Dr. Ingrid Chorus, Umweltbundesamt

Finanzierung: Kompetenzzentrum Wasser Berlin und Veolia Water

Kontakt im KWB: Dr. Bodo Weigert

*Cylindrospermopsis raciborskii* ist ein Cyanobakterium (Blaualge) tropischen Ursprungs, das das Toxin Cylindrospermopsin (CYN) produzieren kann. Es hat sich bis in Gewässer der Berliner Region ausgebreitet. Dort wurde CYN in zwei Seen nachgewiesen, aber alle bisher analysierten Stämme von *C. raciborskii* aus diesen Gewässern produzieren kein CYN.

Ziel des CYLIN-Projektes war es, die Verbreitung und Regulation von *C. raciborskii* und CYN zu analysieren und die CYN-Produzenten zu ermitteln, um eine Basis zu schaffen, auf der die weitere Entwicklung dieser Art und die damit verbundene Gefährdung für den Menschen abgeschätzt werden kann.

Dies wurde in einem 3-Stufen-Untersuchungsprogramm umgesetzt: In einem Screening wurde ein Überblick zur Verbreitung von CYN und potenziellen CYN-Produzenten gewonnen (CYN und Cyanobakterien wurden 2004 in 142 Gewässern einmalig qualitativ erfasst). In einem Monitoring im Sommer 2005 wurden in 20 Seen je dreimal die Konzentrationen des gelösten und partikulären CYN sowie die Cyanobakterien und Umweltparameter quantitativ erfasst. Die saisonale Dynamik dieser Parameter wurde in 2 ausgewählten Gewässern in den Jahren 2004 - 2005 untersucht. Außerdem wurden für die Identifizierung der CYN-Produzenten verschiedene Cyanobakterienstämme isoliert, die chemisch und molekularbiologisch auf CYN und CYN-kodierende Gene analysiert wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass *C. raciborskii* und CYN deutlich weiter verbreitet sind als bisher bekannt war: *C. raciborskii* wurde in 22 % und CYN in 52 % der Seen qualitativ nachgewiesen. Außerdem wurden zwei weitere toxische Cyanobakterien tropischen Ursprungs, *Anabaena bergii* und *Aphanizomenon aphanizomenoides*,

erstmalig in der Region Berlin-Brandenburg nachgewiesen. Die Konzentrationen von CYN betragen im Mittel  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  und maximal  $12 \mu\text{g L}^{-1}$ , wobei die partikuläre Fraktion  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  nicht überschritt und hohe Konzentrationen durch die gelöste CYN-Fraktion bedingt waren. Ein empfohlener Grenzwert für CYN im Trinkwasser von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  wurde insgesamt 18mal in 8 verschiedenen Seen überschritten. *Aphanizomenon flos-aquae* konnte eindeutig als CYN-Produzent identifiziert werden, allerdings lassen sich die CYN-Vorkommen nicht allein durch diese nostocale Art erklären. Als weiterer möglicher CYN-Produzent konnte *Aphanizomenon gracile* herausgearbeitet werden.

Aufgrund der Projektergebnisse wird empfohlen, CYN in die Gefährdungsanalyse für Trinkwasserversorgungen und für Badegewässer aufzunehmen. Um CYN-Analysen auf Risikosituationen eingrenzen zu können, ist die weitere Aufklärung der CYN-Produzenten, der Regulation ihres Vorkommens sowie ihrer Toxinproduktion und des CYN-Abbaus notwendig.

Die Analyse der Populationsdynamik von *C. raciborskii* ergab, dass ihre Keimung temperaturreguliert ist und das Populationswachstum durch Licht limitiert wird. Der Zeitpunkt der Keimung bestimmt die Populationsgröße (je früher desto größer). Ein klimatisch bedingter früherer Anstieg der Wassertemperaturen im Jahresverlauf hat daher mit großer Wahrscheinlichkeit die Ausbreitung dieser Art in die gemäßigten Breiten begünstigt.

Für die weitere Entwicklung von Cyanobakterien und Toxinen in deutschen Gewässern wurde folgende Hypothese aufgestellt: Die Kombination von Trophieminderung und globaler Erwärmung begünstigt generell nostocale Cyanobakterien und führt zu Verschiebungen in der Artenzusammensetzung und den Toxinvorkommen. Dabei ist neben CYN auch mit zunehmenden Vorkommen von Neurotoxinen zu rechnen.

## 1. Einleitung

Das Cyanobakterium *Cylindrospermopsis raciborskii* stammt ursprünglich aus Seen und Flüssen tropischer und subtropischer Regionen. In den letzten Jahrzehnten hat es sich weltweit bis in Regionen mit gemäßigttem Klima ausgebreitet. *C. raciborskii* gehört taxonomisch in die Ordnung der Nostocales. Es bildet mikroskopisch kleine Zellfäden (Filamente), die durchschnittlich eine Länge von 0,15 mm und einen Durchmesser von 0,003 mm erreichen (Abb. 1). Wie alle Nostocales kann es außer vegetativen Zellen zwei weitere Zelltypen ausbilden: zum einen Heterozysten, in denen es molekularen Stickstoff fixieren kann, zum anderen Akineten (Dauerzellen), die zur Überdauerung unvorteilhafter Wachstumsbedingungen im Sediment dienen. *C. raciborskii* kann potente Toxine wie das Cylindrospermopsin (Abb. 1) oder Paralytic Shellfish Poisons (PSPs) produzieren. Daher ist es wichtig, dem Vorkommen dieser Art in Gewässern, die zur Trinkwassergewinnung oder zur Erholung genutzt werden, besondere Aufmerksamkeit zu widmen.



Abb. 1: Filamente von *C. raciborskii* (links) und chemische Formel von Cylindrospermopsin (rechts).

### Toxizität von Cylindrospermopsin

Die Gefährdung, die von diesem Cyanobakterium für den Menschen ausgeht, wurde erstmals in 1979 auf Palm Island in Australien deutlich. Dort wurden bei einer Bevölkerungsgruppe, die mit Cyanobakterien verunreinigtem Trinkwasser versorgt wurde, Erkrankungen (Hepatoenteritis) festgestellt (Bourke et al. 1983), die im Nachhinein auf *C. raciborskii* zurückgeführt werden konnten. Epidemiologische Untersuchungen zeigten damals, dass ein Stamm von *C. raciborskii*, der aus dem Trinkwasserreservoir isoliert wurde, ernsthafte hepatotoxische Effekte im Mausbioassay zeigte und daher für die Hepatoenteritis verantwortlich gemacht wurde (Hawkins et al. 1985). Von dem gleichen *C.-raciborskii*-Stamm wurde danach ein Alkaloid isoliert, das nach seinem Produzenten Cylindrospermopsin (CYN) benannt wurde (Ohtani et al. 1992).

Der Mechanismus der CYN-Toxizität ist erst teilweise verstanden. Eine entscheidende, in Laborversuchen (in vitro) gezeigte Komponente ist, dass CYN die Proteinsynthese rasch, vollständig und irreversibel blockiert (Froschio et al. 2003).

Versuche am lebenden Tier zeigten Schäden an Leber, Nieren, Lunge, Herz, Magen, Nebenniere, dem Kreislauf und dem lymphatischen System (Hawkins et al. 1985). Insbesondere erwiesen sich bei akuter (d.h. innerhalb von 1-2 Tagen schädlicher) Dosis die Leberschäden als sehr ausgeprägt und dosisabhängig. Daher wird CYN auch als Hepatotoxin eingeordnet, obwohl seine Wirkung deutlich breiter ist: Insbesondere bei chronischer (d.h. über mehrere Wochen hinweg täglicher) Belastung mit CYN stehen auch Nierenschäden im Vordergrund (Humpage und Falconer 2003). CYN hat sich ferner in mehreren Studien als genotoxisch erwiesen (siehe u.a. Humpage et al. 2005). Für eine Klärung, ob CYN als Human-carcinogen einzustufen ist, bewertete die IARC (International Agency for Research on Cancer) 2006 die Datenlage als ungenügend: lediglich eine Studie zeigte eine erhöhte Tumorfrequenz in lebenden Zellen nach Exposition gegenüber CYN in sehr hoher Dosis (Falconer und Humpage 2001).

Auch für die Ableitung eines Leitwertes aufgrund der Toxizität von CYN ist die Datenlage bislang ungenügend, und sie wird voraussichtlich von der WHO in Kürze im Hinblick auf diese Frage neu geprüft werden. Kriterium der WHO für die Ableitung eines Leitwertes ist die Verfügbarkeit von mindestens 2 unabhängigen Studien oder hinreichender Informationen aus suborganismischen Tests. Die eine verfügbare Tierstudie, eine 10 - 11wöchige Exposition von Mäusen (Humpage und Falconer 2003), schlägt einen Leitwert für CYN im Trinkwasser von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  vor (ähnlich dem vorläufigen WHO-Leitwert für Microcystin-LR). In Brasilien gilt ein Leitwert von  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ , und in Neuseeland gilt ein Leitwert von  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### **Vorkommen und Produzenten von Cylindrospermopsin**

Vorkommen von CYN wurden in tropischen Regionen wie Australien (z.B. Mc Gregor und Fabbro 2000) und Brasilien (Carmichael et al. 2001) aber auch in Nordamerika (Burns et al. 2002) und Europa (Fastner et al. 2003, Manti et al. 2005, Quesada et al. 2006) nachgewiesen. In natürlichen Gewässern wurde CYN bisher jedoch nur in sechs Studien quantitativ ermittelt, wobei die Konzentrationen überwiegend im Bereich von  $1\text{--}20 \mu\text{g L}^{-1}$  lagen und Spitzenwerte bis zu  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  auftraten (Manti et al. 2005, Quesada et al. 2006, Chiswell et al. 1999, Mc Gregor und Fabbro 2000, Hoeger et al. 2004, Burns et al. 2002). In einigen Studien wurde allerdings die gelöste CYN-Fraktion nicht berücksichtigt und die Gesamtkonzentration könnte daher unterschätzt worden sein. Insgesamt ist die Datengrundlage zu quantitativen CYN-Konzentrationen für eine Abschätzung des Gefährdungspotenzials bis heute sehr dürftig.

Klärungsbedarf besteht auch bezüglich der CYN-Produzenten. In ersten Studien zur Verbreitung von *C. raciborskii* und CYN entdeckte man weitere Cyanobakterien, die CYN produzieren können. Bis zum Beginn der vorliegenden Studie waren dies: *Umezakia natans* (Harada et al. 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker et al. 1997), *Anabaena bergii* (Schembri et al. 2001) und *Raphidiopsis*

*curvata* (Li et al. 2001a). Auch diese Arten haben eine überwiegend tropische und subtropische Verbreitung. Im Gegensatz zu *C. raciborskii* wurden sie bisher nicht für deutsche Gewässer beschrieben. Die ersten CYN Vorkommen in zwei deutschen Gewässern (Melangsee und Langer See) konnten nicht auf *C. raciborskii* zurückgeführt werden, weil alle bisher aus dem Melangsee isolierten *C. raciborskii*-Stämme kein CYN produzieren (Fastner et al. 2003). Auch *C.-raciborskii*-Stämme aus anderen europäischen Gewässern produzieren kein CYN (Bernard et al. 2003, Saker et al. 2003). Dies legt die Vermutung nahe, dass andere Arten in diesen Gewässern CYN produzieren oder die Populationen von *C. raciborskii* aus CYN-produzierenden und nicht-produzierenden Genotypen bestehen. Betont werden muss an dieser Stelle, dass die deutschen Stämme von *C. raciborskii* andere toxische Substanzen produzieren, die bisher noch nicht weiter aufgeklärt wurden (Fastner et al. 2003). Daher ist es wichtig, die Verbreitung und Regulation von *C. raciborskii* aufzuklären, auch wenn die Art hier nicht CYN produziert.

### **Ausbreitung und Ökologie von *C. raciborskii***

Erstmals ist *C. raciborskii* (Woloszynká) Seenaya & Subba Raju von Woloszynska (1912) aus einem See in Java beschrieben worden. Ihre Ausbreitung bis in Regionen mit gemäßigttem Klima, fand während der letzten Jahrzehnte statt und wurde zuerst von Padisák (1997) ausführlich dokumentiert. In Europa wurde *C. raciborskii* das erste Mal 1938 in einem See in Griechenland nachgewiesen (Skuja 1938). Danach wurde sie 1970 im Balaton in Ungarn (Padisák 1977), 1990 in der Lieps in Deutschland (Krienitz und Hegewald 1996), 1993 in der Alten Donau in Österreich (Dokulil und Mayer 1996), 1994 in mehreren Seen der Scharmütelseeregion in Deutschland (Rücker et al. 1997, Wiedner und Nixdorf 1997) und 1994 in einem kleinen See nördlich von Paris in Frankreich (Couté et al. 1997) entdeckt.

Eine dermaßen drastische Ausbreitung wurde bisher für keine andere Phytoplanktonart beobachtet. Als Ursachen der Ausbreitung werden Klimawandel sowie Anpassung und Selektion bestimmter Ökotypen diskutiert. Briand et al. (2004) fanden keine ökophysiologischen Unterschiede zwischen Stämmen von *C. raciborskii* aus tropischen und gemäßigten Klimazonen und sehen in klimatischen Veränderungen die Ausbreitungsursache. Chonodomkul et al. (2004) dagegen fanden einige Stämme, die sich bei niedrigen Temperaturen entwickeln können, was auf Anpassungs- und Selektionsmechanismen hindeutet. Die Frage nach den Verbreitungsursachen ist daher bis heute nicht befriedigend geklärt.

In tropischen Regionen wurden die höchsten Biomassen von *C. raciborskii* in tiefen geschichteten Seen ermittelt, wohingegen die Art in den gemäßigten Breiten am häufigsten in polymiktischen Flachseen auftritt (Padisák 1997). Diese unterschiedlichen Habitatansprüche führte Padisák darauf zurück, dass in der gemäßigten Klimazone die mittleren Wassertemperaturen in Flachseen höher sind als

in tiefen Seen und daher den hohen Temperaturansprüchen dieser tropischen Art eher gerecht werden. In tropischen Gewässern kann die Art ganzjährig wachsen (Fabbro und Duivenvoorden 1996, Bouvy et al. 1999), während das Wachstum ihrer pelagischen Populationen in gemäßigten Breiten auf die Sommermonate beschränkt ist, und sie die kalte Jahreszeit im Sediment in Form von Akineten überdauert, aus denen sie im Frühjahr wieder auskeimt.

Untersuchungen an tropischen *C.-raciborskii*-Populationen ergaben, dass ihre Akineten bei Temperaturen über 22 °C keimen. Die Biomassemaxima der pelagischen Populationen wurden bei Wassertemperaturen zwischen 27 und 30 °C, hohen pH-Werten, einer großen Stabilität der Wassersäule, einer langen Aufenthaltszeit des Wassers sowie hoher Globalstrahlung beobachtet (Branco und Senna 1994, Fabbro und Duivenvoorden 1996, Souza et al. 1998, Bouvy et al. 1999, McGregor und Fabbro 2000). Auch in den gemäßigten Breiten wurden Keimungstemperaturen von mehr als 22 °C ermittelt (Górze 1987, in Padiśák 1997) und die Populationsmaxima fallen mit dem jährlichen Temperaturmaximum zusammen. Allerdings beginnen die pelagischen Populationen bereits bei Temperaturen zwischen 15 und 17 °C (Dokulil und Mayer 1996, Mischke 2003) zu wachsen. Außerdem wurde postuliert, *C. raciborskii* sei eine schattentolerante Art, die durch niedrige Lichtintensitäten, wie sie in eutrophierten Gewässern während der Sommermonate auftreten, begünstigt wird (Dokulil und Mayer 1996, Padiśák und Reynolds 1998) sowie durch niedrige Konzentrationen gelöster anorganischer Stickstoff- und Phosphorverbindungen (Mischke 2003, Briand et al. 2002a). Bisher sind überwiegend die Bedingungen charakterisiert worden, unter denen Populationen auftreten. Die eigentlichen Mechanismen, die das Wachstum und die Populationsdynamik regulieren, sind jedoch weitgehend unverstanden. Daher kann auch die weitere Entwicklung dieser Art in dieser Region derzeit nicht eingeschätzt werden.

Die derzeit nördlichsten bekannten Vorkommen von *C.-raciborskii*-Populationen sind jene in Seen der Scharmütelseeregion (südöstlich von Berlin) und in der Lieps (nördlich von Berlin). Es ist jedoch unklar, wie weit die Art in dieser Region verbreitet ist. Der Fund in der Lieps stammt aus der Analyse einer einzigen Phytoplanktonprobe von 1990 und es ist ungewiss, ob *C. raciborskii* dort auch vorher oder nachher auftrat und ob sie in benachbarten Seen der Region vorkommt. Die Beobachtungen aus den Seen der Scharmütelseeregion verdeutlichen, dass ihr Auftreten kein temporäres Ereignis war. Dort treten Populationen seit 1994 regelmäßig auf und können einen Anteil von bis zu 20 % am gesamten Phytoplanktonbiovolumen erreichen (Wiedner und Nixdorf, 1997; Mischke 2003, Nixdorf et al. 2003). Obwohl die Art in der Region bislang keine Massenvorkommen bildete oder als dominante Phytoplanktonart auftrat, ist ihre Häufigkeit für eine eingewanderte Art bemerkenswert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich Populationen der toxischen Cyanobakterienart *Cylindrospermopsis raciborskii* in Seen der Berliner Region etabliert haben. Über die Verbreitung ist bislang zu wenig bekannt, um das Risiko für Erholungszwecke und die Trinkwassergewinnung durch diese neue toxische Art einzuschätzen. Weiterhin ist es eindeutig, dass CYN in Seen der Berliner Umgebung vorkommt, jedoch sind weder die Verbreitung und der Konzentrationsbereich des Toxins noch dessen Produzent bekannt.

## 2. Ziele

Das übergeordnete Ziel des Forschungsprojektes bestand in der Ermittlung des derzeitigen sowie der Abschätzung des zukünftigen Gefährdungspotenzials durch das toxische Cyanobakterium *Cylindrospermopsis raciborskii* und das Toxin Cylindrospermopsin in Gewässern der Region Berlin und Brandenburg.

Die konkreten Arbeitsziele des Projektes lassen sich in drei Hauptpunkte gliedern:

- Ermittlung der Verbreitung von *C. raciborskii* sowie weiterer potenzieller CYN-Produzenten und CYN in Seen unterschiedlicher Trophie und Morphologie sowie Charakterisierung des Seentypus, der für CYN-Produzenten ein geeignetes Habitat darstellt.
- Aufklärung der Mechanismen, welche die saisonale Dynamik von *C. raciborskii* und anderen potenziellen CYN-Produzenten sowie CYN steuern zur Abschätzung der weiteren Entwicklung von CYN-Produzenten und CYN-Konzentrationen im Untersuchungsgebiet.
- Identifizierung der CYN-produzierenden Cyanobakterien im Untersuchungsgebiet und Abschätzung der Variabilität im Vorkommen von CYN-Produzenten.

### 3. Konzept

#### 3.1 Erfassung der derzeitigen Verbreitung von *C. raciborskii*, weiteren potenziellen CYN-Produzenten sowie CYN

Die räumliche und zeitliche Verbreitung wurde durch ein 3-Stufen-Untersuchungsprogramm ermittelt (Abb. 2).



Abb. 2: Schema des Untersuchungsprogramms.

**Screening:** Hierbei stand im Vordergrund, einen möglichst umfassenden Überblick zur räumlichen Verbreitung von *C. raciborskii* und weiteren potenziellen CYN-Produzenten sowie CYN zu gewinnen. Gewässer aus allen Teilgebieten der Region sollten dabei genauso berücksichtigt werden wie unterschiedliche Seetypen, die für die Region charakteristisch sind. Hierfür musste eine große Anzahl von Gewässern untersucht werden: 60 waren geplant, 142 wurden beprobt. Aus diesen wurde jeweils einmal eine Netzprobe entnommen, aus der die Cyanobakterienarten und die Konzentration des CYN qualitativ analysiert wurden.

**Monitoring:** Anhand der Ergebnisse aus dem Screening wurden 20 Gewässer ausgewählt, in denen entweder potenzielle CYN-Produzenten oder CYN ermittelt wurden. Diese Gewässer wurden je dreimal während der Sommermonate untersucht. Dabei wurden erstmals quantitative Daten zu gelösten und partikulären CYN-Konzentrationen pro Volumen Wasser ermittelt, anhand derer eine Risikoabschätzung vorgenommen werden konnte. Außerdem wurden quantitative Daten zum Biovolumen der Cyanobakterienarten sowie relevanter chemischer und physikalischer Umweltparameter ermittelt. Aus dem gesamten Datensatz wurden Zusammenhänge zwischen CYN-Konzentrationen und Cyanobakterien sowie Umweltparametern analysiert.

**Saisonale Dynamik:** Durch die quantitative Erfassung der saisonalen Variabilität von CYN-Konzentrationen, potenziell CYN-produzierenden Cyanobakterien und Umweltparametern wurde die Verbreitungsstudie abgerundet. Die quantitativen saisonalen Daten wurden sowohl hinsichtlich der Regulationsmechanismen der CYN- und Cyanobakterien-Dynamik als auch auf gewässerspezifische Zusammenhänge zwischen CYN-Konzentrationen und potenziellen CYN-Produzenten analysiert.

### 3.2 Abschätzung der weiteren Entwicklung von *C. raciborskii* und CYN

Hierzu wurden die Ergebnisse aus der Untersuchung zur saisonalen Dynamik auf Regulationsmechanismen analysiert. Im Fall von *C. raciborskii* wurden zusätzlich Datenreihen, die aus früheren Untersuchungsprogrammen hervorgegangen sind und bis 1993 zurückreichen, in die Analyse integriert. Zum einen wurden diese Datenreihen auf Langzeittrends analysiert, zum anderen wurde untersucht, welche Faktoren das Wachstum und die Populationsdynamik von *C. raciborskii* steuern. Aus den Kenntnissen zu den Regulationsmechanismen wurde eine Einschätzung ihrer weiteren Entwicklung abgeleitet.

### 3.3 Identifizierung von CYN-Produzenten

Von verschiedenen Cyanobakterienarten der Ordnung Nostocales (die bis dato alle als potenzielle CYN-Produzenten in Frage kommen) wurden Stämme aus unterschiedlichen Gewässern des Screening-Programmes isoliert und in Kultur genommen. Alle Kulturstämme wurden chemisch auf ihren CYN Gehalt analysiert und molekularbiologisch auf das Vorhandensein von CYN-kodierenden Genen untersucht. Zur Abschätzung des Anteils von CYN-produzierenden Genotypen innerhalb bestimmter Populationen sollte eine molekularbiologische Methode entwickelt werden, die es erlaubt, CYN-kodierende Gene in einzelnen Filamenten

(Zellfäden) nachzuweisen. Aus ausgewählten Proben des Monitoring-Programmes wurden für spätere Analysen eine repräsentative Anzahl einzelner Filamente potenzieller CYN-Produzenten isoliert.

## 4. Die Gewässer und Untersuchungsmethoden

### 4.1 Screening

Im Zeitraum von Juni bis September 2004 wurden 142 Gewässer untersucht. Bei der Auswahl wurde ein breites Spektrum von Seetypen berücksichtigt, die sich in ihrer Morphometrie (Tiefe, Fläche, Volumen), ihrem Durchmischungsregime (polymiktisch und dimiktisch) und ihrer Trophie (oligotroph bis hypereutroph) unterscheiden.



**Abb. 3:** Drei der Untersuchungsgewässer: Langer See (links), ein polymiktischer hypertropher Flachsee, der Scharmützelsee (Mitte), ein mesotropher tiefer geschichteter See und der Große Kossenblatter See (rechts), ein polymiktischer eutropher Flachsee.

Die morphometrischen Gewässerdaten wurden aus der Datenbank stehender Gewässer in Deutschland des Lehrstuhls für Gewässerschutz der BTU Cottbus (Nixdorf et al. 2004, Hemm und Jöhnk 2004) extrahiert. Eine Auflistung aller Seen ist im Anhang (Seite 84) zu finden und ihre Verteilung im Untersuchungsgebiet ist in den Karten im Ergebnisteil (Kapitel 5 und 7) dargestellt. Jeder See wurde einmal an der tiefsten Stelle beprobt, soweit diese bekannt war, andernfalls in der Seemitte. Fünf Seen waren nicht mit dem Boot befahrbar. In diesen Fällen wurde die Probenahme von Stegen oder vom Ufer aus durchgeführt.



**Abb. 4:** Planktonnetz

Mit Hilfe eines Planktonnetzes (Maschenweite 25  $\mu\text{m}$ ) wurden Schwebstoffe (Seston) aus der gesamten Wassersäule entnommen (Abb. 4). Die aufkonzentrierte Sestonprobe wurde in drei Teilproben aufgeteilt. Die erste Teilprobe wurde innerhalb eines Tages mikroskopisch bei 200 bis 400 facher Vergrößerung untersucht und eine Artenliste der Cyanobakterien erstellt. Der relative Anteil der einzelnen Arten wurde dabei folgendermaßen semi-quantitativ abgeschätzt: nicht vorhanden, selten, häufig, oder dominant. Die zweite Teilprobe wurde mit Formalin fixiert (Endkonzentration 4 % Formalin) und diente als Rückstellprobe für spätere Kontrolluntersuchungen. Der dritte Teil der Netzprobe wurde gefriergetrocknet und

zur späteren Analyse der CYN-Konzentration pro Trockengewicht Seston verwendet (siehe 4.2.6).



**Abb. 5:** Secchi-Scheibe zur Bestimmung der Sichttiefe.

Bei jeder Probenahme wurde des Weiteren mit einer Secchi-Scheibe von 25 cm Durchmesser die Sichttiefe bestimmt (Abb. 5), die für eine grobe Abschätzung der vegetationsbedingten Trübung und damit der Trophie verwendet wurde. (Hier sei angemerkt, dass zur exakten Bestimmung des Trophiegrades von Gewässern, z.B. nach dem Entwurf der LAWA-Richtlinie (LAWA, 1999) oder der EU-Wasserrahmenrichtlinie (EU, 2000), eine einzelne Probenahme nicht ausreichend ist und weitere Parameter wie die Gesamtphosphor- und Chlorophyll *a*-Konzentration bzw. die Phytoplanktonbiomasse und –zusammensetzung notwendig sind.)

Zur Aufklärung, welche Cyanobakterien CYN in deutschen Gewässern produzieren, wurde zusätzlich aus einigen Gewässern ein Teil der unfixierten Sestonproben für die Isolation von Stämmen verschiedener Cyanobakterienarten verwendet. Auf die Isolations- und Kulturprozedur wird in Kapitel 8 ausführlicher eingegangen, auf die chemische Analyse von CYN in Kapitel 4.2.6. und auf die molekularbiologischen Methoden in Kapitel 9.

## 4.2 Monitoring und saisonale Dynamik

Anhand der Screening Ergebnisse wurden für das Monitoring-Programm im zweiten Untersuchungsjahr 20 Seen ausgewählt, in denen CYN und potenzielle CYN-Produzenten 2004 ermittelt worden waren. Eine Auflistung dieser Gewässer ist in Tabelle 4 (Seite 55) zu finden. Die Monitoring-Gewässer wurden von Juni bis September 2005 mindestens dreimal im Abstand von zwei Wochen an der tiefsten Stelle untersucht und beprobt. Die saisonale Dynamik von Cyanobakterien und Cylindrospermopsin wurde im Melangsee und Langen See untersucht, weil dort CYN bereits im Jahr 2000 nachgewiesen wurde (Fastner et al. 2003) und für die Analyse der Populationsdynamik von *C. raciborskii* Daten aus früheren Studien (ab 1993) integriert werden konnten (Rücker et al. 1997; Mischke 2003). Melangsee und Langer See wurden 2004 und 2005 jeweils von April bis November alle zwei Wochen untersucht.

#### 4.2.1 Die Lichtbedingungen in den Gewässern



Abb. 6: Lichtsonde

Für die Cyanobakterien wie auch für die anderen, eukaryotischen, Photosynthese betreibenden Algen des Phytoplanktons ist das Sonnenlicht die primäre Energiequelle. Damit ist die Intensität des Unterwasserlichtes ein wichtiger Faktor, der das Wachstum begrenzen kann. Die aktuelle Intensität der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) wurde mit zwei sphärischen Quantensensoren (Li Cor SA 193), die im festen Abstand an ein Gestänge montiert sind, in 0,5-m-Schritten im Vertikalprofil gemessen (Abb. 6).

Der Anteil des Lichtes, der durch Absorption und Streuung in der Tiefe verloren geht, wird durch den Attenuationskoeffizienten ( $K_d$ ) ausgedrückt, der aus der jeweiligen Differenz der Werte des oberen und unteren Sensors nach der folgenden Formel von Kirk (1994) berechnet wurde:

$$K_d = \frac{\ln I_1 - \ln I_2}{z_1 - z_2}$$

wobei  $I_1$  die PAR in der Tiefe  $z_1$  und  $I_2$  die PAR in der Tiefe  $z_2$  ist. Die mittlere Strahlung (PAR) in der durchmischten Wassersäule ( $I_{mix}$ ) ergibt sich schließlich aus der Lichtattenuation im Gewässer und der einfallenden Globalstrahlung  $I_0$  und wurde nach Riley (1957) berechnet:

$$I_{mix} = 0.45 \cdot I_0 \cdot \left( \frac{1 - e^{-K_d \cdot z_{mix}}}{K_d \cdot z_{mix}} \right)$$

wobei  $z_{mix}$  die Tiefe der durchmischten Wasserschicht ist. Bei polymiktischen Flachseen wurde  $z_{mix}$  mit der mittleren Tiefe des Gewässers (Quotient aus Seevolumen und Seefläche) gleich gesetzt, bei dimiktischen Seen aus den Vertikalprofilen der Wassertemperatur abgelesen.  $I_0$  ist das 14tägige Mittel der Globalstrahlung vor dem Probenahmetermin. Die Globalstrahlungsdaten wurden vom Meteorologischen Observatorium des Deutschen Wetterdienstes in Lindenberg zur Verfügung gestellt. Der Anteil der photosynthetisch aktiven Strahlung an der Globalstrahlung sowie die Reflektion an der Gewässeroberfläche wurden nach Behrendt und Nixdorf (1993) mit einem Faktor von 0,45 berücksichtigt.

#### 4.2.2 Temperatur, Sauerstoff und pH-Wert im Gewässer und Gewässerdurchmischung



**Abb. 7:** Multiparametersonde H20

Vertikale Tiefenprofile von Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration und -sättigung wurden mit einer Multiparametersonde (H20, Hydrolab, Abb. 7) bzw. mit WTW Sonden in 0,5-m-Schritten gemessen. An Hand dieser Tiefenprofile wurde vor Ort die Tiefe der durchmischten Schicht ermittelt, aus der später die Mischprobe entnommen wurde. Im Gegensatz zu den tiefen, thermisch stabil geschichteten Seen, die im Sommer ein Epi-, Meta- und Hypolimnion aufweisen (dimiktische Seen), sind die flacheren Seen in der Regel bis zum Grund durchmischt (polymiktisch).

#### 4.2.3 Probenahme



**Abb. 8:** Wasserschöpfer

In polymiktischen Flachseen wurde eine Wassermischprobe aus der gesamten Wassersäule erstellt und in geschichteten Seen eine Mischprobe aus dem Epilimnion. Dazu wurden mit einem Wasserschöpfer (LIMNOS 2.3 L, Abb. 8) Proben im Abstand von 0,5 m Schritten entnommen und in einem Fass zu einer Mischprobe vereint. Aus dieser Mischprobe wurden Teilproben für die chemischen und mikroskopischen Untersuchungen entnommen und bis zur Analyse entsprechend konserviert.

#### 4.2.4 Analyse von Nährstoff- und Chlorophyll *a*-Konzentrationen

Die Konzentrationen von Gesamtphosphor (TP) und Gesamtstickstoff (TN) wurden aus je 100 ml der mit Schwefelsäure angesäuerten Mischprobe im Labor mit der FIA-LAB II (MLE GmbH Radebeul) bestimmt (Lippert et al. 2004). Die angesäuerten Proben wurden bis zur Analyse eingefroren. Für die Ermittlung der Konzentrationen von gelöstem anorganischen Phosphat (DIP), Ammonium ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) sowie Nitrit plus Nitrat ( $\text{NO}_{\text{total}}\text{-N}$ ) wurde ein Teil der Mischprobe über Membranfilter ( $0,45\ \mu\text{m}$  Porenweite) filtriert und bis zur Analyse eingefroren. Die Nährstoffanalysen wurden mit einem Mehrkanal-Segmented-Flow-Analysis-Automaten (SFA; Perstorp, Abb. 9) entsprechend der Vorschriften der Deutschen Einheitsverfahren (DEV, 1976 - 1998) analysiert. Die Nachweisgrenzen betragen



**Abb. 9:** Mehrkanal-Segmented-Flow-Analyses-Automat

1,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  für DIP, 64  $\mu\text{g L}^{-1}$  für  $\text{NH}_4\text{-N}$  und 3,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  für  $\text{NO}_{\text{total-N}}$ . Lagen die Konzentrationen der gelösten Nährstoffe unterhalb der Nachweisgrenze, was häufig in den Sommermonaten der Fall ist, wurde für die statistischen Analysen die halbe Nachweisgrenze als Messwert für den entsprechenden Termin eingesetzt.

Zur Bestimmung der Konzentration von Chlorophyll a wurde entsprechend der Sichttiefe des Gewässers ein bestimmtes Volumen der Mischprobe über Glasfaserfilter (Whatman GF/C) filtriert und der in Alufolie gewickelte Filter bis zur Analyse, jedoch nicht länger als 10 Tage, eingefroren. Das Chlorophyll wurde in 96 %igem Ethanol extrahiert und in Anlehnung an die DIN 38412-L16 bestimmt (Nixdorf et al. 1995).

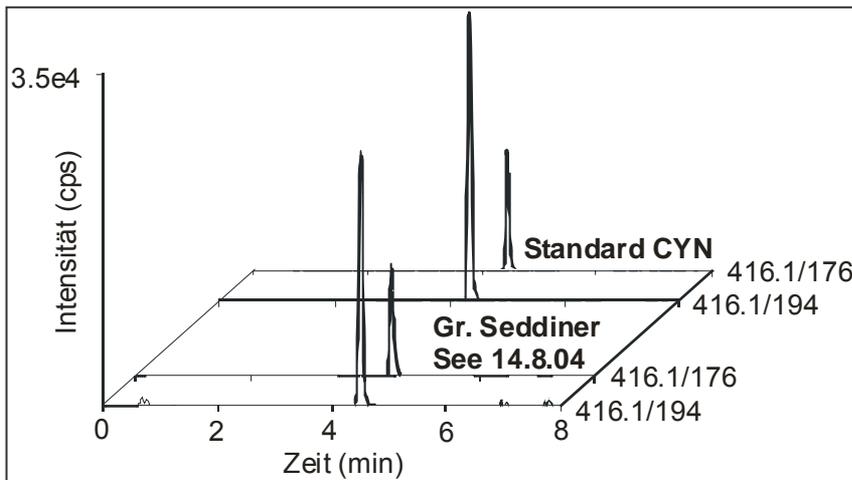
#### 4.2.5 Phytoplankton-Analyse

Für die qualitative Analyse (Erstellung einer Artenliste) des Phytoplanktons, insbesondere der Cyanobakterien, wurde eine aufkonzentrierte Netzprobe (25  $\mu\text{m}$ ) wie oben beschrieben verwendet. Die taxonomische Bestimmung der Cyanobakterien erfolgte überwiegend nach Geitler (1932), Huber-Pestalozzi (1938), Komárek und Ettl (1958), Horecká und Komárek (1979) und Hindák (1992, 2000). Für die quantitative Analyse des Biovolumens der einzelnen Arten wurden je 100 ml der Mischprobe mit Lugolscher Lösung fixiert. Diese Proben wurden in Planktonzählkammern (Hydrobios) gefüllt und nach dem Sedimentieren die am Boden der Kammer liegenden Organismen am Umkehrmikroskop entsprechend der Methode von Utermöhl (1958) und Rott (1981) ausgezählt und vermessen (siehe auch Rott et al. 2007).

#### 4.2.6 CYN-Analyse

Um auch geringste Spuren in komplexer Matrix zuverlässig nachweisen zu können, wurde CYN in dieser Studie mittels LC-MS/MS bestimmt, einem Verfahren, bei dem eine analytische HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) gekoppelt wird. Dabei werden zwei Massenspektrometer hintereinander geschaltet (MS/MS) und so die Selektivität drastisch erhöht. Im sog. SRM Modus (Selected Reaction Monitoring) wird im ersten Massenspektrometer der Analyt aus einem mehr oder weniger komplexen Substanzgemisch selektiert, anschließend in der Kollisionszelle fragmentiert und ausgewählte substanzspezifische Fragmente im zweiten Massenspektrometer analysiert.

Für die Bestimmung von partikulärem CYN wurden gefriergetrocknete oder filtrierte Sestonproben zweimal mit reinem Wasser extrahiert (Welker et al. 2002). Die Proben wurden während jedes Extraktionsvorganges 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 1 h geschüttelt. Danach wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die vereinigten Überstände wurden mittels Vakuumzentrifugation zur Trockne eingeeengt und bis zur Analytik bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor der Analyse wurden die Proben in 1 ml Wasser aufgenommen, zentrifugiert und über  $0,45\ \mu\text{m}$  filtriert. Für die Bestimmung von gelöstem CYN wurden die Proben vor der Messung filtriert ( $0,45\ \mu\text{m}$ ) und ohne weitere Aufarbeitung direkt injiziert.



**Abb. 10:** Selected Reaction Monitoring (SRM) Chromatogramm von Standard Cylindrospermopsin und der Probe aus dem Großen Seddiner See vom 14.08.2004. Gezeigt sind die für Cylindrospermopsin charakteristischen Übergänge von  $m/z$  416.1/194 und 416.1/176.

Die Bestimmung von CYN mittels LC-MS/MS erfolgte an einem 1100 HPLC System von Agilent (Waldbronn, Deutschland), das an ein API 4000 Triple-Quadrupole Massenspektrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Framingham, MA) mit Turboionspray Interface gekoppelt war. Der Extrakt wurde über eine Nova-Pak C18 Säule ( $150 \times 4.6\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$  Partikelgröße; Waters, USA) bei  $30^{\circ}\text{C}$  und einem Fluss von  $0,8\ \text{ml min}^{-1}$  mit dem folgenden Lösungsmittelgradienten getrennt: 1 min 100 % A, auf 100 % B in 5 min, 100 % B über 3 min und dann in 1 min wieder auf 100 % A (A: 1 % Methanol/Wasser, B: 60 % Methanol/Wasser, beide Lösungsmittel mit 5 mM Ammoniumacetat). Die Equilibrierungszeit betrug 7 min.

Das Massenspektrometer wurde im positiven SRM Modus mit einer Kollisionsenergie von 48 eV betrieben. Für den Nachweis von CYN ( $m/z$  416.1 [M+H<sup>+</sup>]) wurden die beiden charakteristischen Übergänge (Molekül/Fragment)  $m/z$

416.1/194 und 416.1/176 mit einer Verweilzeit von 0,2 Sekunden gemessen (Abb. 10). Die Quantifizierung von CYN wurde mit dem Übergang  $m/z$  416.1/194 durchgeführt. Die Nachweisgrenze betrug ca. 10 pg auf der Säule, das entspricht ausgehend von den eingesetzten Volumina (filtrierte Wassermenge, Aufnahmevolumen des Extraktes, Injektionsvolumen)  $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$  für das partikuläre und  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$  für das gelöste CYN.

## 5. Verbreitung von *C. raciborskii* und weiteren Neo-Cyanobakterien

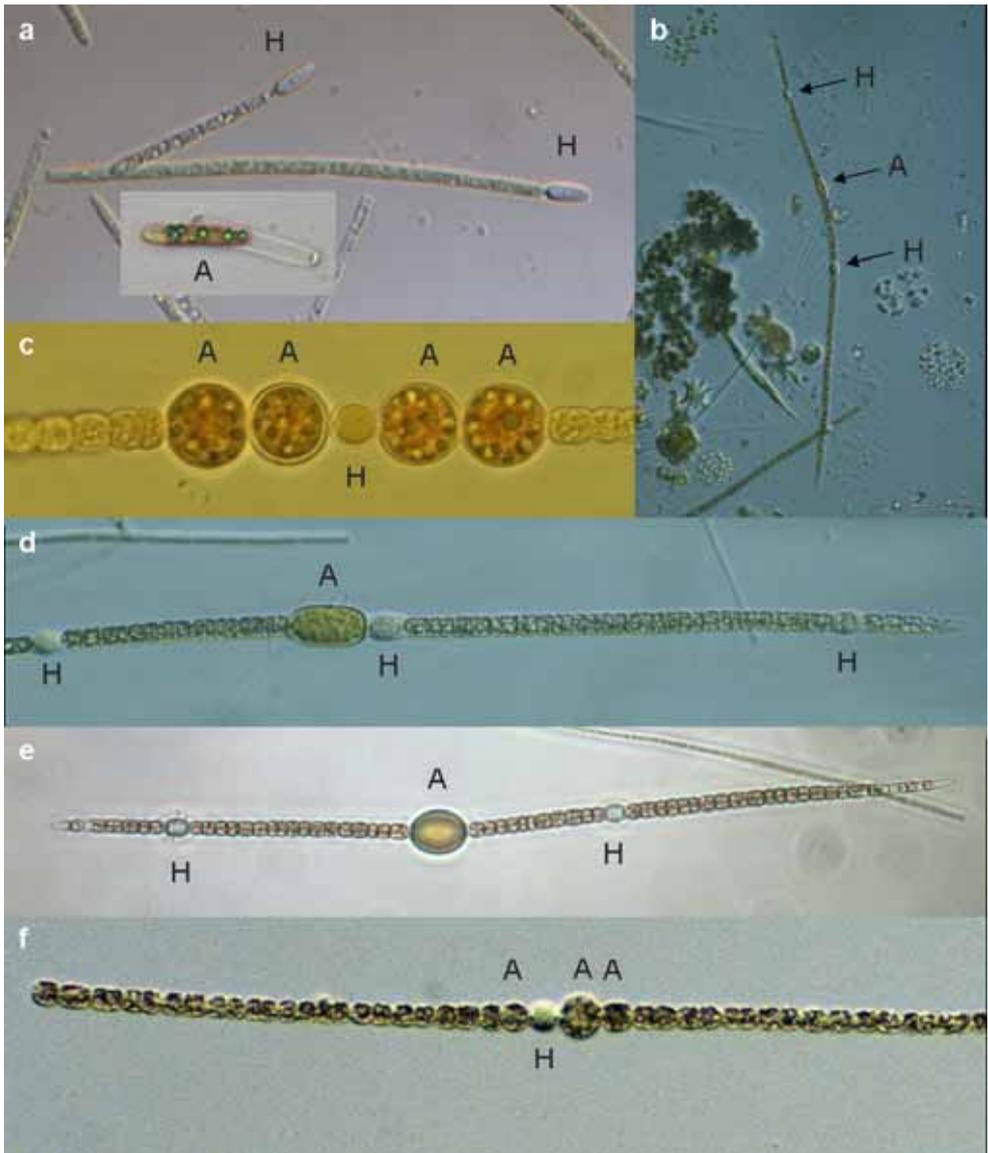
Anke Stüken

Mit dem Term Neo-Cyanobakterien bezeichnen wir Cyanobakterien, die ursprünglich nicht in Deutschland vorkamen, die jetzt aber in hiesigen Gewässern verbreitet sind. *C. raciborskii* wurde von anderen Autoren als Neophyt bezeichnet (Mischke 2003). Der Begriff suggeriert jedoch, dass *C. raciborskii* zum Phylum Phyta oder Viridiplantae, Kingdom Eukaryota gehört. Dies ist jedoch nicht richtig. *C. raciborskii* gehört wie alle Cyanobakterien zum Phylum Cyanobacteria, Kingdom Eubacteria. Daher finden wir den Begriff Neo-Cyanobacterium treffender.

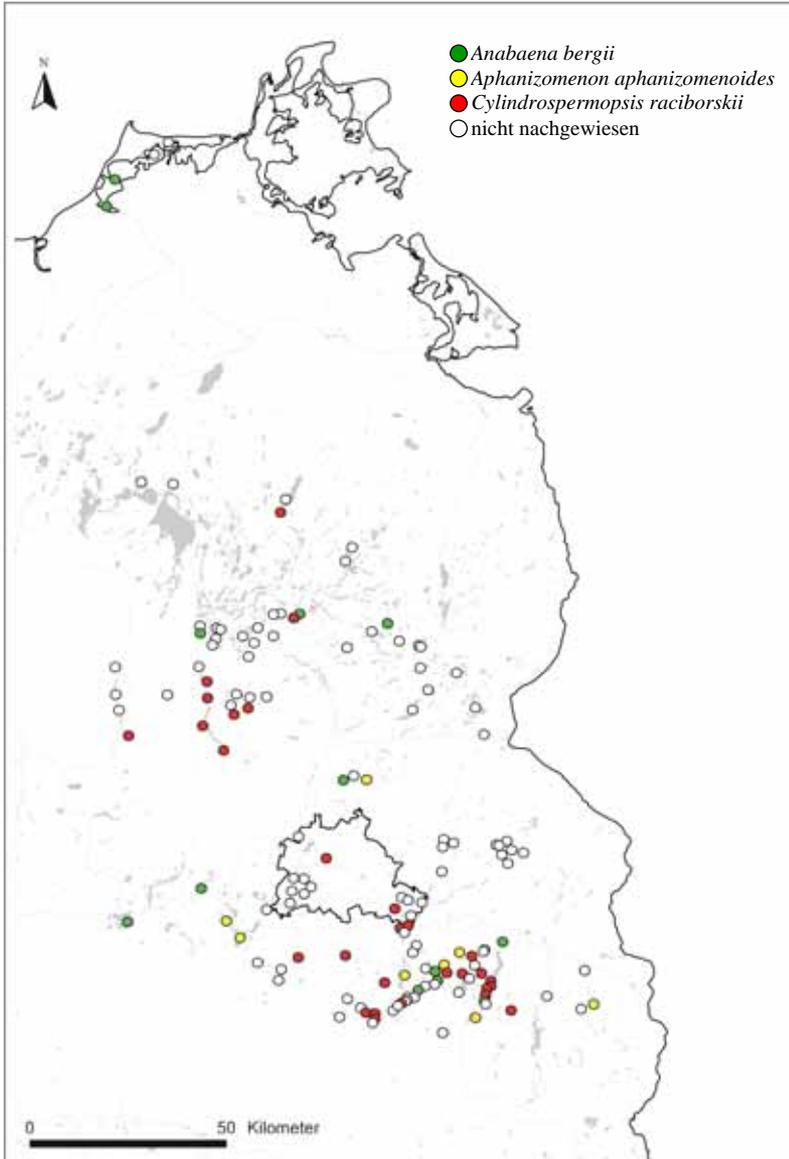
Im Jahr 2004 wurde das Screening-Programm durchgeführt, um einen Überblick über die räumliche Verbreitung und relative Häufigkeit von *C. raciborskii* und anderen potenziellen CYN-produzierenden Neo-Cyanobakterien zu bekommen. Dafür wurden 142 Seen in der Region Berlin-Brandenburg beprobt (siehe Kap. 3.1). Die Ergebnisse zeigen, dass *C. raciborskii* (Abb. 11) in deutschen Gewässern viel weiter verbreitet ist, als bisher bekannt war. Ihre regionale Verbreitung in der Region Berlin-Brandenburg ist in Abbildung 12 dargestellt. Im Sommer 2004 fanden wir das Cyanobakterium in 39 von 142 beprobten Gewässern. In der Mehrheit der Gewässer kam es vereinzelt vor, in neun Gewässern jedoch häufig (Abb. 13). Das Vorkommen der Art wies kein geographisches Muster auf und die statistische Auswertung der Umweltparameter zeigte, dass *C. raciborskii* in unterschiedlichsten Gewässern vorkam; in tiefen wie in flachen, in solchen mit einer hohen und solchen mit einer geringen Sichttiefe, und in kleineren als auch größeren (Oberfläche: 0.06 - 12.07 km<sup>2</sup>, Volumen: 0.20 - 108.23 Mio m<sup>3</sup>; Abb. 14). Die Gewässer, in denen *C. raciborskii* vorkam, unterschieden sich jedoch signifikant von jenen, in denen die Art nicht vorkam; sie waren flacher und hatten eine geringe Sichttiefe (Mann Whitney U test: maximale Tiefe n = 132, Z = -2,871, P = 0,004, Sichttiefe n = 136, Z = -3,861, P < 0, 001). Da Seetiefe und Sichttiefe stark miteinander korreliert waren (Spearman's rank-order correlation: n = 127, r<sub>s</sub> = 0,727, P < 0,001), konnten die Effekte von Tiefe und Trübe auf das Vorkommen von *C. raciborskii* in dieser Studie nicht separiert werden. Die Größe der Oberfläche und das Volumen der Gewässer hatten keine direkte Auswirkung auf das Vorkommen von *C. raciborskii*.

Umfangreiche Recherchen zu unpublizierten und in nicht referierten Veröffentlichungen und Berichten („graue Literatur“) publizierten Funden von *C. raciborskii* ergaben 24 schriftliche Berichte über das Vorkommen dieser Art in deutschen Gewässern zwischen 1994 und 2003 (Zippel 1996; Weithoff 1998; Mischke 2001; Täuscher 2003a, b, 2004a, b; Teubner et al. 2004). Weitere neun Funde aus dem gleichen Zeitraum wurden uns mündlich mitgeteilt (U. Mischke, L. Täuscher). Bei einigen dieser Berichte gab es Überschneidungen mit Gewässern, die 2004 im

Zuge des Screening-Programmes beprobt wurden. Insgesamt ist *C. raciborskii* bisher in 62 unterschiedlichen deutschen Gewässern nachgewiesen worden.

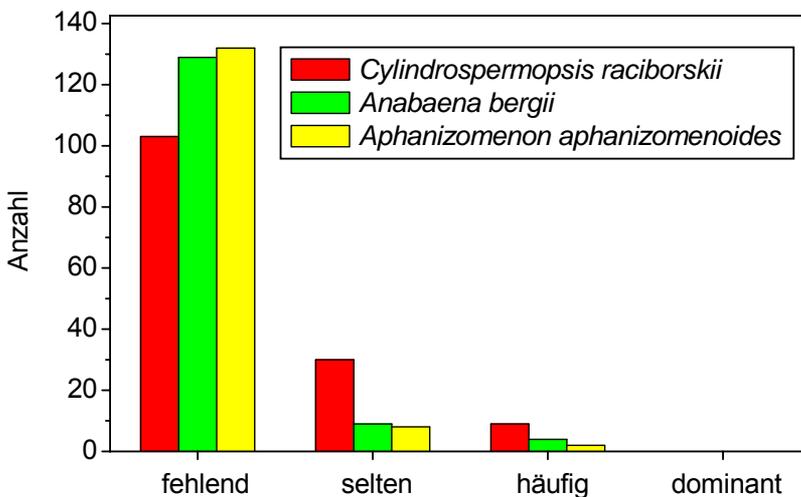


**Abb. 11:** Fotografien von drei tropischen Cyanobakterien-Arten, die in Seen Nordost-Deutschlands gefunden wurden. (a) *C. raciborskii*; Inlet: keimende Akinete. (b) *Anabaena bergii* in Freilandprobe. (d & e) *Anabaena bergii*. (c & f) *Aphanizomenon aphanizomenoides*. A: Akinete. H: Heterozyste. Foto (c) wurde uns von H. Täuscher zur Verfügung gestellt.



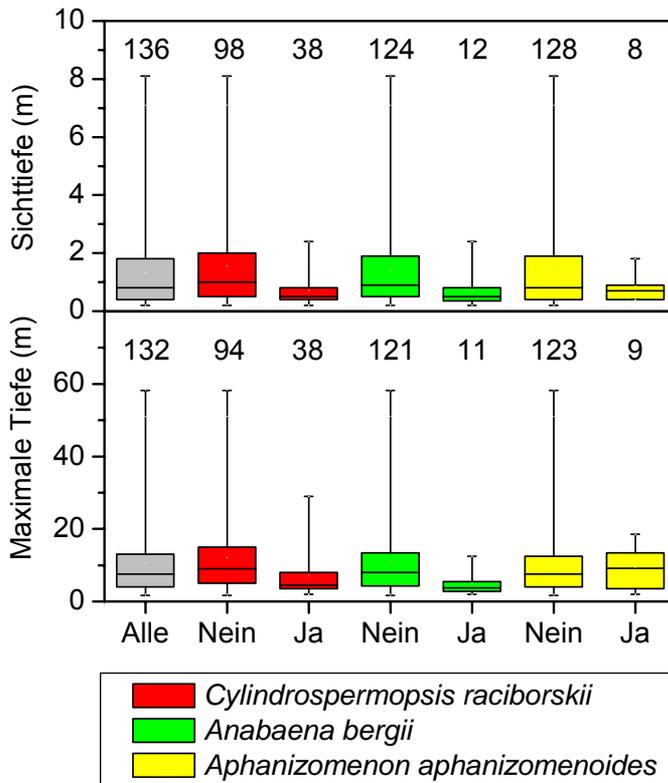
**Abb. 12:** Funde von *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii* und *Aphanizomenon aphanizomenoides* in der Region Berlin-Brandenburg während des Screening-Programmes 2004.

Zusätzlich zu *C. raciborskii* haben wir noch zwei weitere Neo-Cyanobakterien der Region Berlin-Brandenburg identifizieren können: *Anabaena bergii* Ostenfeld 1908 (Abb. 11b, d, e) und *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Forti) Horécka und Komárek 1979 (Abb. 11 c, f). Dies sind die ersten dokumentierten Funde dieser Arten in Deutschland. Bisher waren beide Arten aus wärmeren Klimaregionen, wie den Tropen, Subtropen und Süd-Ost Europa beschrieben worden (Komárek und Ettl 1958; Horecká und Komárek 1979; Cirkaltindag et al. 1992). Nur in den letzten Jahren gab es auch Berichte aus gemäßigten Breitengraden: *A. aphanizomenoides* wurde in der Flussmündung der Neuse, Nordamerika (Moisander et al. 2002), *A. bergii* in einem Teich in Bratislava, Slowakei (Hindák und Hindáková 2003) nachgewiesen.



**Abb. 13:** Häufigkeiten von *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii* und *Aphanizomenon aphanizomenoides* in den beprobten Gewässern aufgrund einer semi-quantitativen Einteilung.

Die Verbreitung von *A. bergii* und *A. aphanizomenoides* in der Region Berlin-Brandenburg ist gemeinsam mit der Verbreitung von *C. raciborskii* in Abbildung 12 dargestellt. Auch bei diesen beiden Arten konnte kein geographisches Verbreitungsmuster festgestellt werden. *A. bergii* kam in 13 der 142 beprobten Gewässer vor, darunter in zwei leicht salzigen Gewässern der Darß-Zingst Boddenkette. Wie bei *C. raciborskii* waren die Gewässer, in denen *A. bergii* vorkam, signifikant flacher und trüber als jene, in denen sie nicht gefunden wurde (Mann Whitney U test: maximale Tiefe  $n = 132$ ,  $Z = -2,590$ ,  $P = 0,010$ , Sichttiefe  $n = 136$ ,  $Z = -2,281$ ,  $P = 0,023$ ) und wieder hatten weder die Größe der Oberfläche noch das Volumen einen Effekt auf das Vorkommen dieser Art. *A. aphanizomenoides* wurde in 10 Proben nachgewiesen (Abb. 13), aber keine der analysierten Parameter hatte einen signifikanten Effekt auf ihr Vorkommen.



**Abb. 14:** Vergleich von maximaler Seetiefe und Sichttiefe zwischen den Seen, in denen *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii* und *Aphanizomenon aphanizomenoides* auftraten und solchen, in denen sie nicht gefunden wurden. Balken zeigen die maximalen und minimalen Werte, Zahlen über den Balken die Anzahl der Probenahmen, die Rechtecke 95 % der Werte. Die Rechtecke sind durch den Median unterteilt.

Beide Arten gehören wie *C. raciborskii* zu der Cyanobakterienordnung Nostocales, das heißt, sie können Heterozysten und Akineten ausbilden. Filamente von beiden Arten mit Heterozysten und Akineten sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Abbildungen 11 b, d & e zeigen unterschiedliche Filamente von *A. bergii*. Die Lage der Akinete in Abbildung 11 d ist für *A. bergii* untypisch; normalerweise liegen Akinete und Heterozyste nicht direkt nebeneinander. Die Form der Akinete, der Heterozysten, vegetativen und insbesondere der Endzellen sind jedoch eindeutig *A.-bergii*-typisch. Abbildung 11 b & f zeigen Filamente von *A. aphanizomenoides* mit den typischen kugeligen Akineten, die direkt neben den Heterozysten liegen. Tabelle 1 stellt die Filamentformen und –größen vergleichend dar.

Die taxonomische Zuordnung ist bei beiden ‚neuen‘ Neo-Cyanobakterien problematisch; *Aphanizomenon sphaericum* Kiselev und *Anabaena aphanizomenoides* Forti (Horéka & Komárek) sind Synonyme für *A. aphanizomenoides*, und die Bezeichnung *Anabaena aphanizomenoides* ist in der Literatur noch weit verbreitet (z.B. Moisaner et al. 2002). Es ist unklar, zu welchem Genus diese Art gehört; ob zu *Anabaena* oder zu *Aphanizomenon*. Bei *A. bergii* ist die taxonomische Zuordnung noch unklarer. *Anabaena minderi* Huber-Pestalozzi [= *A. bergii* var. *limnetica* Couté & Preising (Hindák 2000)] und *Aphanizomenon ovalisporum* Forti sind *A. bergii* morphologisch sehr ähnlich. *Anabaena minderi* und *A. bergii* unterscheiden sich nur in Form und Größe ihrer Akineten (Hindák 2000) und es wurde vorgeschlagen, dass *A. bergii* und *A. ovalisporum* unterschiedliche Morphotypen einer Art sind (Komarék und Ettl 1958). Das gleiche gilt für *A. minderi* und *A. ovalisporum* (Shaw et al. 1999, Fergusson und Saint 2000). Welche Schwierigkeiten auftreten, Filamente aus Gewässeruntersuchungen einer dieser Arten zuzuordnen, ist gut dokumentiert (Bazzichelli und Abdelahad 1994). Aufgrund dieses Problems ist es nicht auszuschließen, dass die Art, die in dieser Studie gefunden wurde, an anderer Stelle als *A. minderi* oder *A. ovalisporum* bezeichnet wird.

Massenentwicklungen von *A. ovalisporum* sind bisher aus Israel (Banker et al. 1997) und Australien (Shaw et al. 1999) berichtet worden. Hinzu kommt, dass Stämme von *A. ovalisporum* und *A. bergii* das Toxin Cylindrospermopsin synthetisieren können (Banker et al. 1997, Schembri et al. 2001, Fergusson und Saint 2003). Auch Stämme von *A. aphanizomenoides* sind toxisch, jedoch wurde das Toxin, das sie bilden, noch nicht identifiziert (Hiripi et al. 1998).

Das Screening-Programm hat gezeigt, dass a) in Deutschland neben *C. raciborskii* noch mindestens zwei weitere Neo-Cyanobakterienarten auftreten, und b) alle drei Arten weit verbreitet und potenziell toxisch sind. Mehr Informationen, insbesondere über die beiden ‚neuen‘ Neo-Cyanobakterien sind notwendig, um das Gefahrenpotenzial, das von ihnen ausgeht, abschätzen zu können.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Zu diesem Themenkomplex sind folgende weiterführende Publikationen aus dem Projekt hervorgegangen: Stüken et al. (2006), Stüken et. al. (eingereicht).

**Tab. 1:** Vergleich der Filamentformen und -größen der in Deutschen Gewässern vorkommenden Neo-Cyanobakterien *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii* und *Aphanizomenon aphanizomenoides*.

Art	<i>C. raciborskii</i>	<i>A. bergii</i>	<i>A. aphanizomenoides</i>
<b>Abbildung</b>	11a	11b, d & e	11c & f
<b>Filament</b>	solitär, keine Koloniebildung; gerade, gebogen oder gewunden; in Europa bisher nur gerade Form beobachtet	solitär, keine Koloniebildung; gerade oder leicht gebogen; meist zu den Enden hin verjüngt; mindestens eine Endzelle auffallend spitz zulaufend und keilförmig	solitär, keine Koloniebildung; gerade oder leicht gebogen; zu den Enden hin leicht verjüngt
<b>vegetative Zellen</b>	zylindrisch; länger als breit; 4-12µm lang, 2-4µm breit	gedrungen tönchenförmig; kürzer als breit; 3-5µm lang, 4-6µm breit	sehr variabel in Zellform und -größe; meistens rundlich-tönchenförmig; kürzer als breit; 3-6µm lang, 4-6µm breit; Endzellen abgerundet
<b>Heterozysten</b>	einzel; immer endständig; fast immer entfernt von den Akineten; flammenförmig; 3,5-6µm lang, 1,5-2,5µm breit	einzel; 1-3 pro Filament; interkalar; meist entfernt von den Akineten; rundlich; 5-7µm Durchmesser	einzel; 0-3 pro Filament; kugelig bis ellipsoid; 5-6,5µm lang, 5-6µm breit
<b>Akineten</b>	meist einzeln; langgezogen zylindrisch bis leicht oval; 8-15µm lang, 2,5-4µm breit	einzel, meist entfernt von den Heterozysten; oval bis zylindrisch; 11-20µm lang, 10-16µm breit	einzel oder zu mehreren nebeneinander; direkt auf einer oder auf beiden Seiten neben den Heterozysten; kugelig; 8-14µm Durchmesser

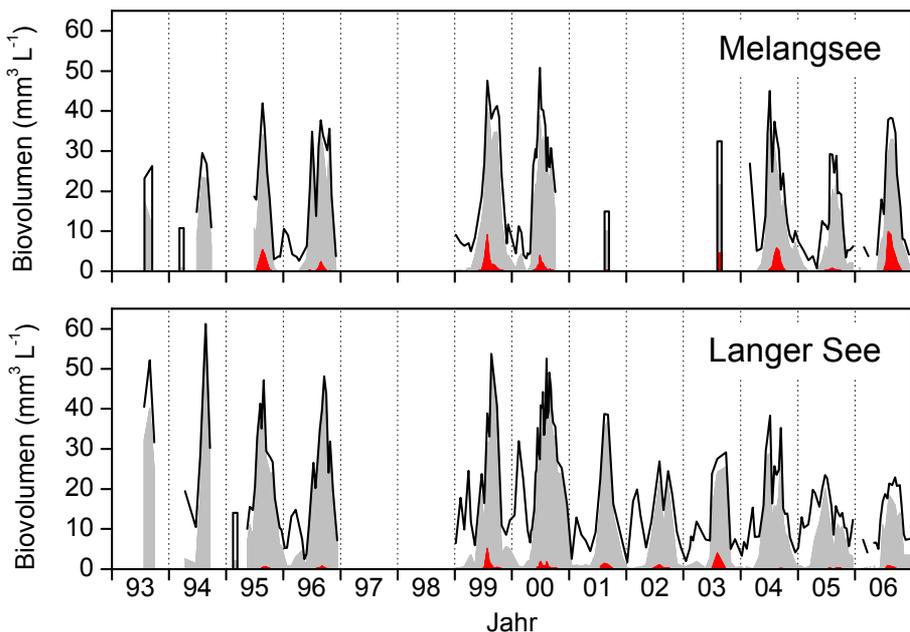
## 6. Populationsdynamik von *C. raciborskii* in gemäßigten Klimazonen und Ursachen ihre Ausbreitung

Claudia Wiedner

In der Einleitung wurde deutlich, dass wichtige Fragen zu den Ursachen der Ausbreitung von *C. raciborskii*, der Regulation ihrer Populationsdynamik sowie ihre Langzeitentwicklung in gemäßigten Breiten unklar sind. Diesen Fragen wurde exemplarisch anhand von Datenreihen aus zwei eutrophierten polymiktischen Flachseen, dem Melangsee und dem Langer See, nachgegangen. Detaillierte Hintergrundinformationen zu den Gewässern sind u.a. bei Rücker et al. (1997), Mischke (2003) und Nixdorf et. al. (2003) zu finden.

### Langzeitentwicklung von *C. raciborskii*

Beide Gewässer wurden seit 1993 untersucht. *C.-raciborskii*-Populationen traten seit 1995 in allen Untersuchungsjahren in beiden Gewässern auf (Abb. 15) und erreichten bis zu 23 % des Biovolumens der Cyanobakterien bzw. 19 % des Biovolumens des gesamten Phytoplanktons. Das ist für ein Neo-Cyanobakterium ein beträchtlicher Anteil und es erscheint durchaus berechtigt, hier von einer invasiven Art zu sprechen.



**Abb. 15:** Biovolumen von *C. raciborskii* (rot), allen Cyanobakterien (grau) und des gesamten Phytoplanktons (schwarze Linie).

Im Zusammenhang mit einer invasiven Art stellen sich zunächst folgende Fragen: Wann ist *C. raciborskii* eingewandert? Wie lange dauerte es, bis sich Populationen in deutschen Gewässern etablieren konnten? Haben diese ihre maximale Populationsgröße bereits erreicht oder nehmen sie weiter zu und ist in Zukunft mit Massenentwicklungen dieser Art zu rechnen?

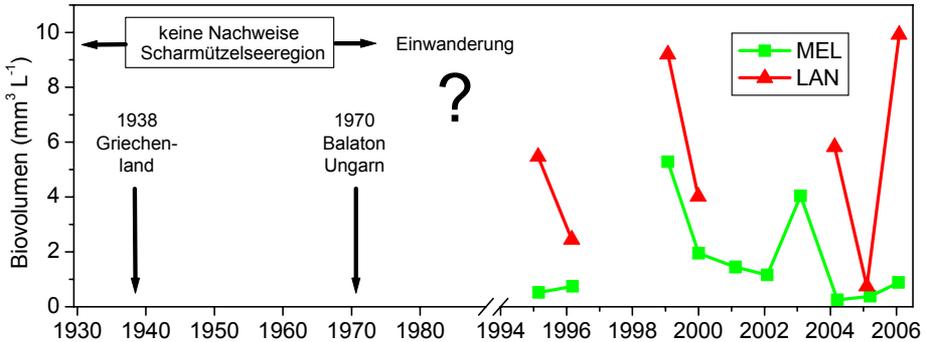


Abb. 16: Schema zur Einwanderung von *C. raciborskii* in Europa und Höhe ihrer jährlichen Populationsmaxima im Melangsee (MEL) und Langen See (LAN).

Diese Fragen können heute nur teilweise beantwortet werden, wie das Beispiel aus den beiden Fallstudien hier zeigt. In Abbildung 16 sind die wichtigsten europäischen Stationen während der Ausbreitung der Art im zeitlichen Verlauf zusammen mit den jährlichen maximalen Biovolumina im Melangsee und im Langen See dargestellt. Das Zeitfenster für ihre Einwanderung lässt sich auf die Periode zwischen 1940 und 1990 eingrenzen. Vor diesem Zeitraum trat sie im Untersuchungsgebiet nicht auf. Dies belegen frühe limnologische Studien aus den 30er und 40er Jahren (Czensny 1938, Wundsch 1940, Schäperclaus 1941). Da sie 1990 in der Lieps (Krienitz und Hegewald 1996) und ab 1995 im Melangsee und Langen See bereits mit beträchtlichen Biovolumina auftrat, muss man davon ausgehen, dass die Einwanderung zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden hatte. Die maximale Populationsgröße in beiden Gewässern zeigt eine große interannuelle Schwankung. Der Untersuchungszeitraum ist daher noch zu kurz für eine Trendanalyse, und es kann anhand dieser Daten nicht prognostiziert werden, ob die Art ihre maximale Populationsgröße bereits erreicht hat oder noch weiter zunimmt.

### Regulation der Populationsdynamik von *C. raciborskii*

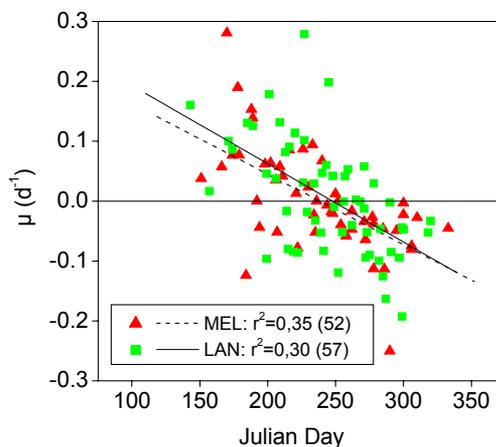
Für die Abschätzung der weiteren Entwicklung der Art sind fundierte Kenntnisse zu den Regulationsmechanismen ihrer Populationsdynamik essentiell. Für eine Analyse dieser Mechanismen wurden Zusammenhänge zwischen der spezifischen Wachstumsrate der Population ( $\mu$ ) und relevanten Wachstumsparametern

analysiert. Die spezifische Wachstumsrate wurde aus den Biovolumina nach folgender Formel berechnet:

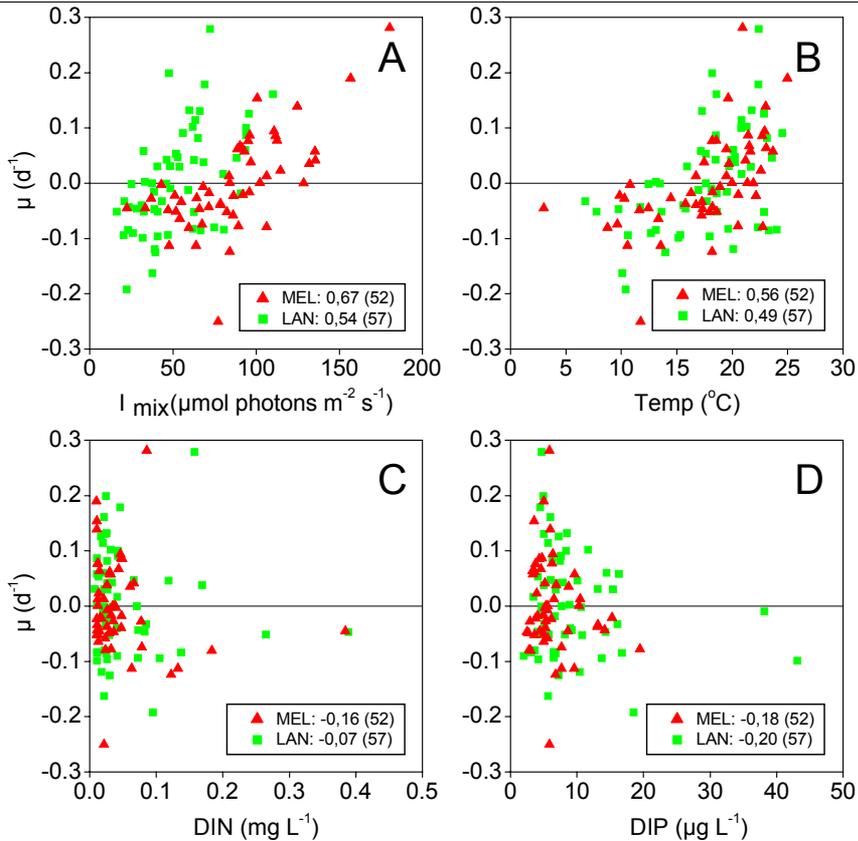
$$\mu = \frac{\ln C_{\text{bio}v_2} - \ln C_{\text{bio}v_1}}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

wobei  $C_{\text{bio}v_1}$  das Biovolumen zum Zeitpunkt  $t_1$  und  $C_{\text{bio}v_2}$  das Biovolumen zum Zeitpunkt  $t_2$  ist. Somit stellt  $\mu$  eine Nettowachstumsrate der Population dar, die Verlustprozesse, beispielsweise durch Fraß oder Verdünnung beinhaltet. Zusammenhänge zwischen der Wachstumsrate und Umweltparametern wurden auf zweierlei Weise analysiert: Zum einen statistisch mittels einer Pearson-Korrelationsanalyse (SPSS 12.0 für Windows, SPSS Inc.), wobei die berechneten Werte für  $\mu$  in der Datenmatrix dem Zeitpunkt  $t_2$  zugeordnet wurden, zum anderen durch einen Vergleich des mittleren jährlichen Verlaufs der Wachstumsrate mit dem der Umweltparameter. Hierfür wurden mittlere Jahressgänge von  $I_{\text{mix}}$ , Wassertemperatur, DIN, DIP und dem Biovolumen von *C. raciborskii* aus den gepoolten Daten der gesamten Untersuchungsperiode (1993 - 2005) für beide Seen getrennt mit Hilfe der Funktion polynomialer Fit des Grafik-Programmes Origin Pro 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) berechnet. Die Ordnung des polynomialen Fits wurde so gewählt, dass ein optimales statistisches Ergebnis und eine gute Kurvenanpassung erreicht wurden. Da im Falle der spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\text{trend}}(t)$  nichtlineare Kurvenanpassungen (exponentiell oder quadratisch) keine besseren statistischen Ergebnisse ergaben, wurden sie durch lineare Regression aus den gepoolten Daten berechnet (Abb. 17):

$$\mu_{\text{trend}} = a \cdot t + b \quad (2)$$



**Abb. 17:** Wachstumsrate ( $\mu$ ) von *C. raciborskii* versus Julian Day im Melangsee (MEL) und Langen See (LAN) und Ergebnisse der linearen Regression (Stickprobenumfang  $n$ ).

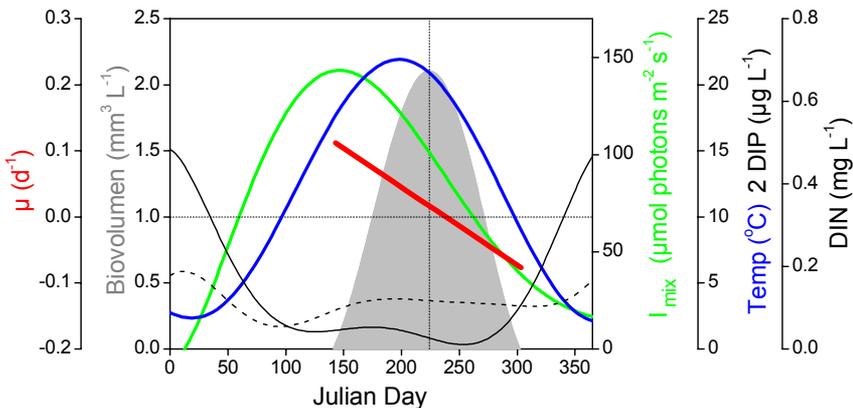


**Abb. 18:** Wachstumsrate ( $\mu$ ) von *C. raciborskii* versus  $I_{\text{mix}}$  (A), Temperatur (B) und den Konzentrationen der anorganischen gelösten Phosphor- (DIN, C) und Stickstofffraktionen (DIP, D) im Melangsee (MEL) und Langen See (LAN) und Ergebnisse der Korrelationsanalyse: Korrelationskoeffizienten und (Stichprobenumfang n).

Die Korrelationsanalyse ergab, dass die Wachstumsrate signifikant positiv mit der mittleren Lichtintensität ( $I_{\text{mix}}$ ) und der Temperatur korreliert ist, während keine signifikanten Zusammenhänge zu den Konzentrationen des gelösten Phosphors (DIP) und Stickstoffs (DIN) vorlagen (Abb. 18). Hieraus würde sich ableiten, dass das Populationswachstum mit steigenden Werten von  $I_{\text{mix}}$  und Temperatur zunimmt. Die Temperatur kann jedoch als wachstumsregulierender Faktor bis zum Erreichen des Populationsmaximums, ausgeschlossen werden, was der saisonale Verlauf von  $\mu$  im Vergleich zu dem der Temperatur verdeutlicht (Abb. 19). Die Wachstumsraten nehmen im Jahresverlauf linear ab, die Temperatur dagegen steigt während der ersten Hälfte der Wachstumsphase an und kann sich daher in dieser Phase nicht positiv auf das Wachstum auswirken. Die Lichtintensität

erreicht dagegen die höchsten Werte vor dem Beginn der Wachstumsphase und nimmt parallel zur Wachstumsrate ab, weshalb sie als die wichtigste wachstumsregulierende Größe angenommen werden kann.

Die Temperatur spielt jedoch eine bedeutende Rolle bei der Steuerung des Startpunktes der jährlichen pelagischen Populationen. Die ersten Filamente von *C. raciborskii* traten jeweils bei Temperaturen zwischen 15 und 17°C auf. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Keimung der Akineten von *C. raciborskii* temperaturreguliert ist.

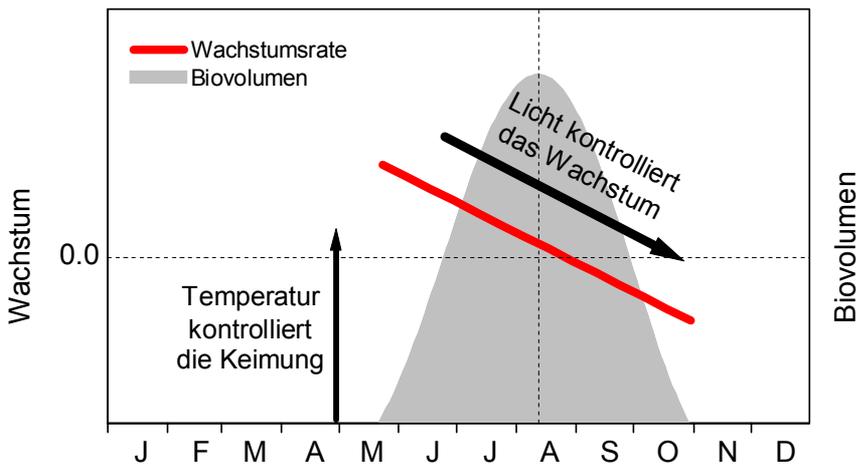


**Abb. 19:** Mittlere Jahresgänge des Biovolumens (grau) und der spezifischen Wachstumsrate ( $\mu$ , rot) von *C. raciborskii* sowie der mittleren Intensität der photosynthetisch aktiven Strahlung in der durchmischten Schicht ( $I_{\text{mix}}$ , grün), der Wassertemperatur (Temp, blau), der Konzentration von gelöstem anorganischen Phosphat (DIP, schwarz, gestrichelt) und Stickstoff (DIN, schwarz, durchgezogen) ermittelt aus den gepoolten Daten des Melangsees von 1993 – 95.

Zusammenfassend lässt sich aus der Kombination der Analysen derzeit folgendes Bild zur Regulation der Populationsdynamik zeichnen: Die Keimung der Akineten wird durch die Temperatur reguliert und findet bei Temperaturen unter 15 °C statt. Das Wachstum der pelagischen Population wird durch die Lichtintensität reguliert und ist von Beginn an lichtlimitiert (Abb. 20). Außerdem muss man aufgrund der niedrigen Konzentrationen des gelösten Stickstoffs und Phosphors (Abb. 19) davon ausgehen, dass die Phytoplankter in den Sommermonaten um diese Nährstoffe konkurrieren. Im Fall von Stickstoffmangel hat *C. raciborskii* einen Konkurrenzvorteil, weil sie gasförmigen Stickstoff fixieren kann.

Diese Ergebnisse werfen ein neues Licht auf die Regulation einer tropischen Art in gemäßigten Breiten. Bisher war man der Meinung, dass das Wachstum von *C. raciborskii* in gemäßigten Klimazonen temperaturlimitiert ist, was im Fall eines tropischen Cyanobakteriums durchaus plausibel erschien und anhand des Zu-

sammentreffens der Populations- und Temperaturmaxima begründet wurde (z.B. Hamilton et al. 2005). Auch in unserer Studie fallen Populations- und Temperaturmaxima zeitlich zusammen. Dies scheint jedoch zufällig zu sein, da unsere Ergebnisse belegen, dass die Temperatur das Wachstum nicht limitiert. Außerdem ging man davon aus, dass *C. raciborskii* eine schattenadaptierte Art ist und durch niedrige Lichtbedingungen begünstigt wird (z.B. Dokulil und Mayer 1996, Padisák und Reynolds 1998, Bouvy et al. 1999, Briand et al. 2002a, Mischke 2003). Dies wird durch unsere Ergebnisse eindeutig widerlegt. Das Wachstum von *C. raciborskii* ist von Beginn an lichtlimitiert. Dies wurde bisher nicht aufgedeckt, weil zur Abschätzung der Lichtintensität Parameter verwendet wurden, die entweder nur die Lichtattenuation berücksichtigen (z.B. Attenuationskoeffizient oder Sichttiefe), wobei die einfallende Strahlung unberücksichtigt bleibt oder nur die einfallende Strahlung, wobei die Lichtattenuation im Wasser unberücksichtigt bleibt. Zudem gab es bisher wenig Datensätze mit einer zeitlichen Auflösung, die es erlaubten, Wachstumsraten zu berechnen. Deshalb wurden in den meisten Fällen Zusammenhänge zwischen Umweltparametern und Biovolumen analysiert, woraus eine Zustandsanalyse der Bedingungen resultiert, unter denen die Art auftritt, aber die Steuerung des Wachstumsprozesses unberücksichtigt bleibt.



**Abb. 20:** Schema der Populationsentwicklung von *C. raciborskii* im Jahresverlauf mit dem Einfluss der wachstumsbegrenzenden Faktoren Licht und Temperatur.

Ein wichtiges Ergebnis unserer Studie ist, dass die Keimung temperaturreguliert ist, und das Populationswachstum durch Licht limitiert wird. Da die Lichtintensität vor dem Beginn der pelagischen Population am höchsten ist, bedeutet jede

Verschiebung des Lebenszyklus in eine frühere Phase verbesserte Licht- und folglich verbesserte Wachstumsbedingungen für die betrachtete Art.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass sich klimatische Veränderungen häufig auf die Phänologie von Arten, d.h. den jährlichen Ablauf ihres Lebenszyklus, auswirken. Allgemein wird seit den 60er Jahren beobachtet, dass Frühlingsaktivitäten vorzeitiger eintreten (Walther et al. 2002). In aquatischen Systemen der nördlichen gemäßigten Breiten werden besonders Änderungen in der Phänologie von Planktonorganismen beobachtet, die man auf erhöhte Winter- und Frühjahrstemperaturen zurückführt. Beispielsweise treten im Bodensee oder dem Müggelsee *Daphnia*-Populationen zwei Wochen eher auf als früher (Straile 2000, Gerten und Adrian 2000). Typische Frühlingsphytoplankter erscheinen 20 Tage eher im Lake Washington (USA, Winder und Schindler 2004), 30 Tage früher im Lake Erken (Sweden, Weyhenmeyer et al. 1999) und 30 Tage früher im Müggelsee (Deutschland, Gerten und Adrian 2000). Bei der Analyse der Regulationsmechanismen von Nordseeplankton fand man heraus, dass bei Lebenszyklen, die einer Lichtsteuerung unterliegen, keine saisonale Verschiebung stattfindet, während temperaturgesteuerte Lebenszyklen in eine frühere Jahreszeit verschoben werden (Edwards und Richardson 2004).

Wenn wir uns an dieser Stelle vergegenwärtigen, dass der Start der pelagischen Phase im Lebenszyklus von *C. raciborskii* temperaturreguliert ist, dann muss man davon ausgehen, dass ihre Populationen von den klimatischen Veränderungen ebenfalls begünstigt wurden. Daher wurde analysiert, welchen Einfluss eine Verschiebung des Lebenszyklus von *C. raciborskii* auf ihre Populationsgröße hat. Hierzu wurde ein mathematisches Modell entwickelt, mit dem die Populationsgröße für verschiedene Keimzeitpunkte simuliert wurde:

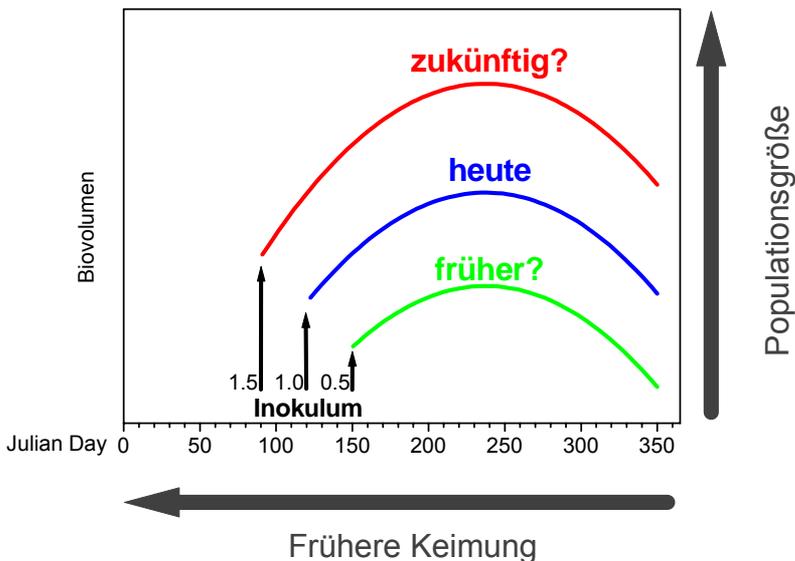
$$d C_{biov} / dt \sim \mu(t) \quad (3)$$

wobei  $d C_{biov}$  die Änderung des Biovolumens von *C. raciborskii* ist und  $dt$  die Änderung in der Zeit. Das Modell basiert auf der spezifischen Wachstumsrate ( $\mu$ ) als Funktion der Zeit ( $t$ ), die dem aus den gepoolten Daten für den Melangsee ermittelten  $\mu_{trend}$  entspricht (Gleichung 2). Als Anstieg  $a$  für die lineare Regressionsfunktion wurde  $-1,177 \cdot 10^{-3}$  und für das absolute Glied  $b$   $0,28$  ermittelt. Beide Werte waren hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Unter Einführung eines Proportionalitätsfaktors  $skal$  ( $= 0.15$ ) wurde das folgende Modell entwickelt:

$$\frac{d C_{biov}}{dt} = \begin{cases} skal \cdot \mu_{trend}(t) & \text{if } t \geq t_{begin} \\ 0 & \text{else} \end{cases} \quad (4)$$

Die Simulationen wurden mit Model Maker 3.0 durchgeführt. Die Populationsgröße wurde für drei Keimungszeitpunkte im Jahresverlauf simuliert:  $t_{\text{begin}} =$  Julian Day 90, 120 und 150. Dabei wurden zwei Szenarien simuliert: In dem ersten Szenario wurde von einer gleich großen Akinetenzahl (mit einem Biovolumen von  $1 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ ) bei allen drei Julian Days ausgegangen. In dem zweiten Szenario wurde berücksichtigt, dass die Keimung aufgrund früher ansteigender Wassertemperaturen von Jahr zu Jahr früher stattfand, wodurch die Populationsgröße und die Akinetenzahl von Jahr zu Jahr zunahm. Hier wurde eine lineare Zunahme der Akinetenzahl bzw. des Biovolumens der Akineten angenommen mit:  $1.5 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$  bei  $t_{\text{begin}} =$  day 90;  $1.0 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$  bei  $t_{\text{begin}} =$  day 120 und  $0.5 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$  bei  $t_{\text{begin}} =$  day 150.

Die Ergebnisse der Simulation zeigen, dass bei gleichen Akinetenzahlen eine Verdopplung der Populationsgröße erreicht wird, wenn die Keimung 60 Tage früher stattfindet. Berücksichtigt man zusätzlich jährlich steigende Akinetenzahlen, dann verdoppelt sich die Populationsgröße bereits, wenn die Keimung 30 Tage früher stattfindet (Abb. 21).



**Abb. 21:** Modellierung der Populationsgröße von *C. raciborskii* unter der Annahme, dass die Akineten am 120. Kalendertag (Julian Day) keimen bei einer Inokulumgröße (Menge der Akineten) von 1,0 (Situation heute) sowie eines Szenarios in Vergangenheit und Zukunft unter der Annahme eines späteren bzw. früheren Termins der Keimung und geringerer bzw. größerer Inokulumgröße.

Ein klimatisch bedingter früherer Anstieg der Wassertemperaturen im Jahresverlauf hat daher mit großer Wahrscheinlichkeit die Ausbreitung der Art begünstigt. Für den Fall, dass dieser Trend anhält, kann man prognostizieren, dass die Populationsgröße von *C. raciborskii* weiter zunehmen wird.

Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, dass die hier ermittelten Regulationsmechanismen der Populationsdynamik auch auf die beiden anderen Neo-Cyanobakterien, *Aphanizomenon aphanizomenoides* und *Anabaena bergii*, zutreffen sowie auf heimische Nostocales. Für eine Abschätzung der Entwicklung des Phytoplanktons in unseren Gewässern gilt es, diese Hypothese zu prüfen. Des Weiteren müssen die Wissenslücken zum Lebenszyklus von Nostocales geschlossen werden, und es ist zu prüfen, in wie weit bei der Ausbreitung tropischer Arten Anpassungs- und Selektionsmechanismen zusätzlich eine Rolle spielen.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Zu diesem Themenkomplex sind folgende weiterführende Publikationen aus dem Projekt hervorgegangen: Wiedner et al. (2007), Tingwey et al. (2007), Rucker et al. (2006), Haande et al. (eingereicht).

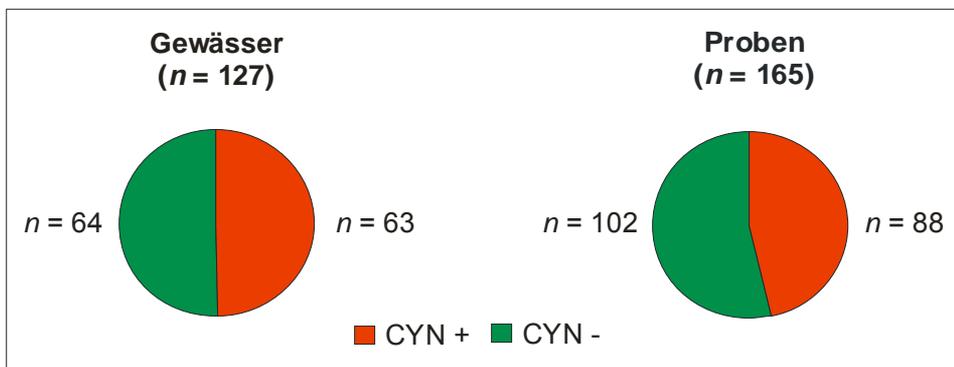
## 7. Verbreitung von *Cylindrospermopsis*

Jutta Fastner

Die Verbreitung von *Cylindrospermopsis* (CYN) in Deutschland wurde exemplarisch im Berlin-Brandenburger Raum an 127 Gewässern unterschiedlicher Trophie und Morphologie untersucht. Eine Übersicht der untersuchten Gewässer ist im Anhang gegeben, die Probenahme in 4.2.3, die Phytoplanktonanalysen in 4.2.5 und die CYN-Analytik in 4.2.6 beschrieben.

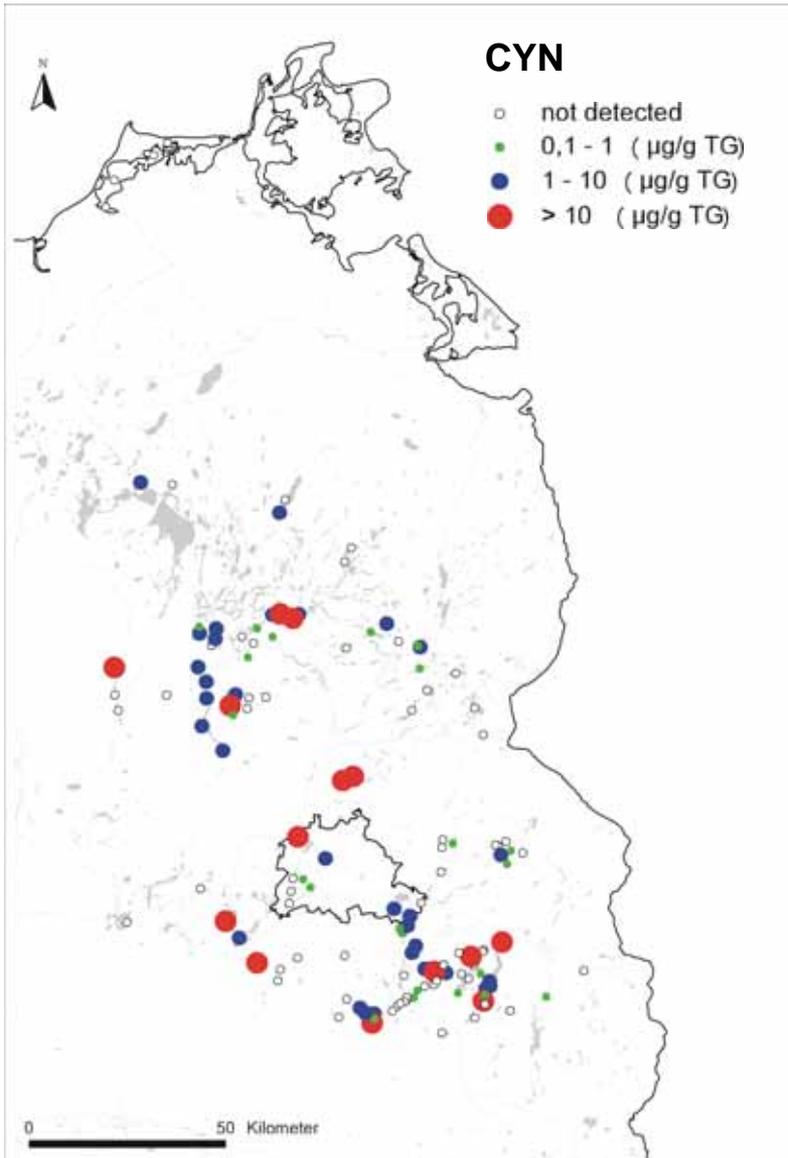
CYN wurde bislang in Europa (und Deutschland) nur sporadisch nachgewiesen, wobei einschränkend erwähnt werden muss, dass umfassende Arbeiten zur Verbreitung von CYN bislang nicht vorliegen. In dieser Hinsicht ist der vorliegende Datensatz derzeit nicht nur für Deutschland, sondern auch für Europa einmalig.

CYN kam häufig im Untersuchungsgebiet vor: in etwa der Hälfte der untersuchten Gewässer und den Proben daraus konnte CYN nachgewiesen werden (Abb. 22). Damit ist CYN im Nordosten Deutschlands ähnlich weit verbreitet wie in Australien und Nordamerika (McGregor und Fabbro 2000, Burns et al. 2002), und zudem ebenso häufig wie Microcystin, das bisher als das in Deutschland am häufigsten vorkommende Cyanotoxin galt (Fastner et al. 1999).



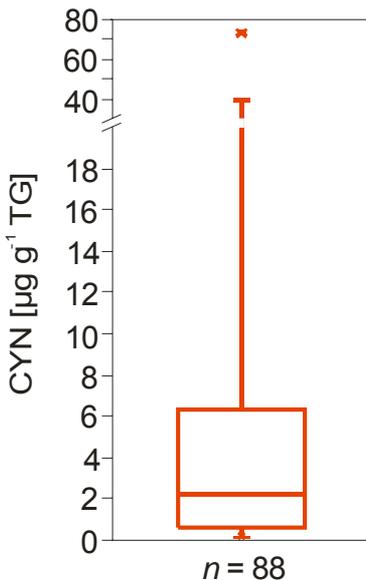
**Abb. 22:** Häufigkeit von CYN in 127 Gewässern (und 165 Proben daraus) der Region Berlin-Brandenburg.

CYN konnte im gesamten Untersuchungsgebiet nachgewiesen werden, und war nicht auf bestimmte Regionen beschränkt (Abb. 23). Dies traf gleichermaßen auch für die gemessenen Konzentrationen zu und in keiner Region wurden schwerpunktmäßig nur hohe oder niedrige Werte gefunden (Abb. 23).



**Abb. 23:** Verbreitung von CYN im Untersuchungsgebiet

Die CYN Konzentrationen im Untersuchungsgebiet lagen im Bereich von 0,1 bis maximal 73,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  TG (Gr. Plessower See) mit einem Median von 2,3  $\mu\text{g g}^{-1}$  TG (Abb. 24). Über 80 % der Proben hatten Konzentrationen unter 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  TG und nur 18 % höhere Werte. Die Konzentrationen lagen damit im Bereich der ersten CYN Funde im Langen See und Melangsee aus dem Jahr 2000 (Fastner et al. 2003). Isolierte CYN-produzierende Stämme verschiedener Arten jedoch - so auch die *Aphanizomenon-flos-aquae*-Stämme aus dem Untersuchungsgebiet (Kapitel 8) - zeigen in der Regel deutlich höhere CYN-Konzentrationen von ca. 0,5 – 6  $\text{mg g}^{-1}$  TG (Banker et al. 1997, Hawkins et al. 1997, Preußel et al. 2006). Die eher niedrigen Freilandkonzentrationen lassen sich entweder durch eine geringe Abundanz CYN-produzierender Arten oder Genotypen im Gewässer (toxin-produzierende und nicht-produzierende Genotypen einer Art liegen in der Regel zeitgleich vor) und / oder durch geringere CYN-Konzentrationen der toxin-produzierenden Genotypen im Vergleich zu den isolierten Stämmen erklären. Schließlich ist es auch wahrscheinlich, dass nicht in jedem Fall alles im Wasser vorhandene CYN erfasst wurde, da CYN, wie auch diese Studie zeigt (Kapitel 10), zu über 90 % in der gelösten Fraktion vorliegen kann und gelöstes CYN bei der Probenahme mittels Planktonnetz nicht erfasst wird.



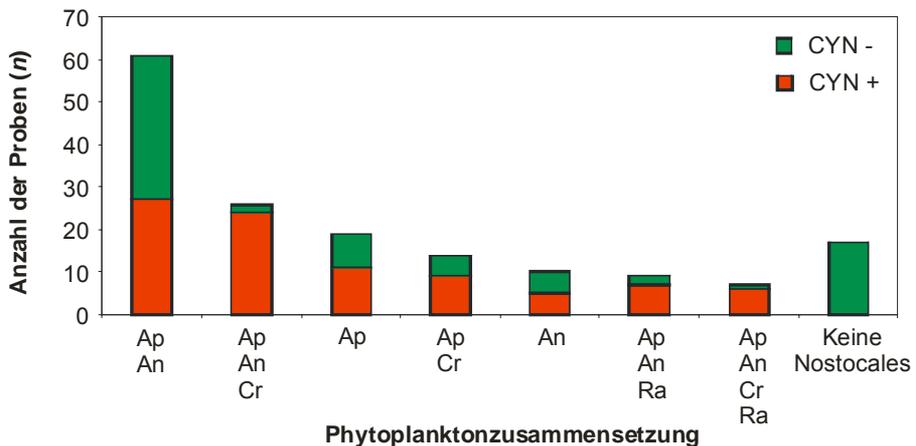
**Abb. 24:** Box-Whiskers-Plot der CYN-Konzentrationen ( $\mu\text{g g}^{-1}$  TG) in 88 Sestonproben.

Box-Whiskers-Plot: Das Rechteck beinhaltet 50 % der Werte zwischen der 25. und 75. Perzentile, die Extensionslinien stellen die Minimal- und Maximalwerte dar. Der Median ist durch einen horizontalen Balken innerhalb des Rechtecks angegeben. Extremwerte sind als Sterne eingetragen.

Um Hinweise auf potenzielle CYN-Produzenten zu erhalten, wurden in den Proben die Cyanobakterien der Ordnung Nostocales bestimmt, da die meisten der bislang bekannten CYN-Produzenten zu dieser Ordnung gehören. In den Unter-

suchungsgewässern wurden verschiedene Arten von *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis* sowie *Cylindrospermopsis raciborskii* gefunden. Zumeist waren in den Proben mehr als eine Gattung und im Falle von *Anabaena* und *Aphanizomenon* mehr als eine Art vorhanden. Da die Artbestimmung nicht in allen Fällen eindeutig war, wurde die folgende Gruppierung der Proben auf Gattungsebene vorgenommen.

In den meisten Proben ( $n = 61$ ) wurde eine Kombination verschiedener *Aphanizomenon*- und *Anabaena*-Arten gefunden, in 26 Proben eine Mischung von *Aphanizomenon*- und *Anabaena*-Arten sowie *C. raciborskii* und in 14 Proben *Aphanizomenon*-Arten und *C. raciborskii* (Abb. 25). In insgesamt 17 Proben kam *Raphidiopsis* in verschiedenen Kombinationen mit *Aphanizomenon*, *Anabaena* und/oder *C. raciborskii* vor, einige Kombinationen jedoch nur einmal, so dass diese aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 25 nicht dargestellt sind. In all diesen Gruppen konnte in 50 – 90 % der Proben CYN nachgewiesen werden, es gab aber keinen Hinweis auf besonders hohe oder niedrige CYN-Konzentrationen in einzelnen Gruppen.



**Abb. 25:** Gruppierung der Proben nach dem Vorkommen verschiedener Gattungen der Ordnung Nostocales. Gezeigt ist die Gesamtprobenzahl für einzelne Gruppen und die Anzahl der Proben mit und ohne CYN. Ap: *Aphanizomenon*, An: *Anabaena*, Cr: *C. raciborskii*, Ra: *Raphidiopsis*.

In nur einer Probe kam ausschließlich *Raphidiopsis* als Vertreter der Nostocales vor, und diese Probe enthielt kein CYN (nicht dargestellt). Für die Gattung *Raphidiopsis* ist es deshalb noch unklar, ob heimische Arten CYN produzieren wie dies für einen thailändischen Stamm von *Raphidiopsis curvata* beobachtet wurde (Li et al. 2001a).

In den anderen Proben kamen entweder nur *Aphanizomenon*- ( $n = 19$ ) oder *Anabaena*- ( $n = 10$ ) Arten vor, von denen etwa die Hälfte CYN enthielt (Abb. 25). Dies ist als deutlicher Hinweis auf *Aphanizomenon*- und *Anabaena*-Arten als potenzielle CYN-Produzenten in Deutschland zu werten, und wird durch die Identifizierung von *Aphanizomenon flos-aquae* als CYN-Produzent in den hier untersuchten Gewässern bestätigt (Preußel et al. 2006). Andere bekannte CYN-Produzenten aus diesen Gattungen sind *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker et al. 1997, Shaw et al. 1999), *Anabaena bergii* (Schembri et al. 2001) und *Anabaena lapponica* (Spoof et al. 2006). Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft noch weitere Arten dieser Ordnungen als CYN-Produzenten identifiziert werden.

Neben den Nostocales wird CYN auch von einem Vertreter der Stigonematales, *Umezakia natans*, und sehr wahrscheinlich auch von *Lyngbya wollei* (Oscillatoriales) produziert (Harada et al. 1994, Seifert et al. 2007). Ob CYN eine ähnlich weite taxonomische Verbreitung wie andere Cyanotoxine (z.B. Anatoxin-a oder Microcystin) mit Produzenten in verschiedenen Ordnungen wie Chroococcales, Oscillatoriales und Nostocales hat, kann derzeit nicht abschließend beantwortet werden. Keine der 17 Proben aus dieser Untersuchung, in denen Nostocales nicht vorkamen, enthielt CYN, jedoch zumeist auch keine anderen Cyanobakterien.

Ebenso ist die Rolle von *C. raciborskii* als CYN-Produzent in Deutschland noch immer unklar und konnte auch in diesem Screening nicht geklärt werden, da keine Freilandprobe mit ausschließlichem Vorkommen dieser Art vorhanden war. Wie in 2000 konnte auch in diesem Projekt kein CYN-produzierender Stamm von *C. raciborskii* aus den Untersuchungsgewässern isoliert werden (Fastner et al. 2003, Kapitel 8), ebenso wenig wie in anderen europäischen Ländern (Saker et al. 2003; Bernard et al. 2003). Der Nachweis von CYN in zwei italienischen Seen ist zwar dem Vorkommen von *C. raciborskii* zugeschrieben worden, wurde aber nicht durch Isolate verifiziert (Manti et al. 2005). Angesichts der weiteren Verbreitung von *C. raciborskii* muss der Frage der CYN-Produktion dieser Art in Europa weiter nachgegangen werden.

Angesichts der Häufigkeit des CYN-Nachweises in dieser Untersuchung sowie dem Hinweis von *Aphanizomenon* und *Anabaena* als CYN-Produzenten sollte dem Vorkommen von CYN in Deutschland und Europa vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt werden. *Aphanizomenon* und *Anabaena* sind häufiger Bestandteil des sommerlichen Phytoplanktons in unseren Breiten und die quantitativen Daten (Kapitel 10) zeigen, dass auch in Deutschland wie in Spanien und Italien die CYN-Konzentrationen deutlich über dem vorgeschlagenen WHO-Leitwert von  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  liegen können (Humpage und Falconer 2003, Manti et al. 2005, Quesada et al. 2006). Auch sehr viel höhere Konzentrationen von bis zu (mehreren)  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  wie in Australien und Nord Amerika während Blüten von *C. raciborskii* oder *A. ovalisporum* sind nicht auszuschließen, da auch *Aphanizomenon flos-aquae* in

gemäßigten Klimazonen unter geeigneten Bedingungen persistierende Blüten bilden kann (Kann und Welch 2005).<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Zu diesem Themenkomplex ist folgende weiterführende Publikation aus dem Projekt hervorgegangen: Fastner et al. (2007).

## 8. Identifizierung von CYN-Produzenten

Karina Preußel

1999 wurde erstmals in Planktonproben zweier Seen in Brandenburg (Melangsee und Langer See) CYN detektiert (Fastner et al. 2003). Dieser Fund galt gleichzeitig als erster Nachweis des Toxins in Europa. Da in den beiden Seen auch die als CYN-produzierende Art bekannte *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani et al. 1992) auftrat, galten erste Stammissolationen der Verifizierung des CYN-Vorkommens aus diesem Cyanobakterium. Allerdings konnte in keinem der isolierten *C.-raciborskii*-Stämme aus dem Melangsee CYN nachgewiesen werden. Auch konnten keine Genabschnitte detektiert werden, für die eine Beteiligung an der CYN-Synthese in tropischen *C.-raciborskii*-Stämmen angenommen werden (Schembri et al. 2001). Die Tatsache, dass alle bisher aus europäischen Gewässern isolierten *C.-raciborskii*-Stämme kein CYN produzieren (Bernard et al. 2003, Saker et al. 2003), bestärkte zusätzlich die Vermutung, dass andere Arten für die Toxinwirkung in unseren Gewässern verantwortlich sind.

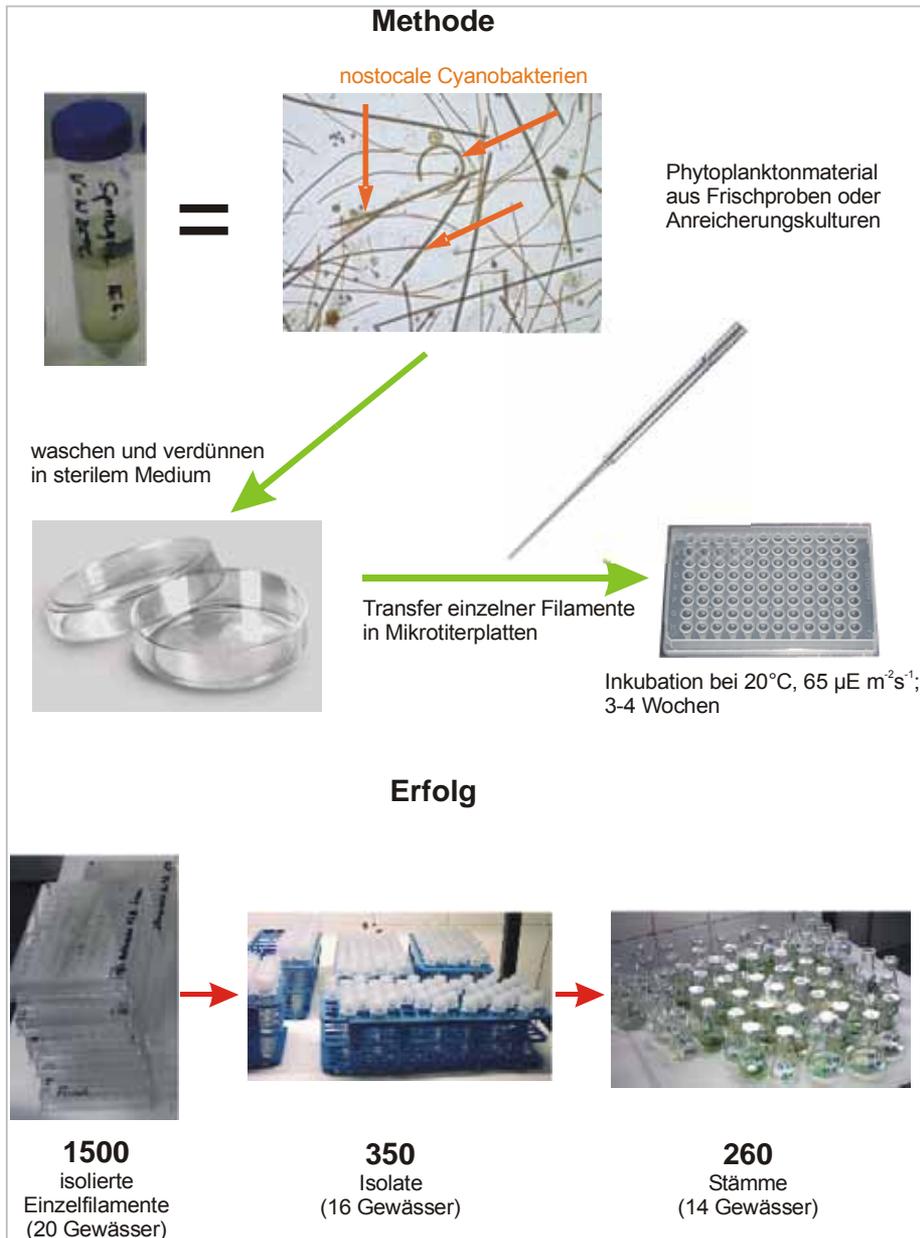
In sub-/tropischen Regionen ist die CYN-Produktion für weitere Cyanobakterien-Arten belegt (siehe Kap. 1). Da die bisher bekannten CYN-Produzenten größtenteils den nostocalen Cyanobakterien zuzuordnen sind, wurde der Schwerpunkt bei der anstehenden Isolation potenzieller Kandidaten aus den beprobten Gewässern auf diese Cyanobakteriengruppe gelegt.

### Isolation von potenziellen CYN-Produzenten

Bei der Isolation wurden verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurden aus Planktonproben von Gewässern mit hohen Abundanzen nostocaler Cyanobakterien direkt aus der Frischprobe einzelne Filamente isoliert. Zum anderen wurden Planktonproben mit geringerer Dichte an Kandidaten-Spezies mit stickstofffreiem Nährmedium versetzt. Die zur Fixierung von atmosphärischem  $N_2$  befähigten nostocalen Cyanobakterien können in diesem Mangelmedium bevorzugt wachsen, wurden so angereichert und anschließend isoliert. Eine solche Anreicherungskultur wurde ebenfalls für eine Sedimentprobe des Langen Sees angesetzt. Die Anreicherungskulturen wuchsen ca. 2 Wochen in klimatisierten Räumen bei 20 °C bzw. 25 °C und einer Lichtintensität von  $65 \mu E m^{-2} s^{-1}$  in einem 12 h/12 h Tag/Nacht-Rhythmus.

Für die Isolierung einzelner Stämme wurde ausschließlich steriles Equipment verwendet. Phytoplanktonmaterial (frisch oder aus Anreicherungskulturen) wurde in eine Petrischale überführt und so lange mit Z8-Medium gewaschen und verdünnt, bis ein Transfer einzelner Filamente mit Hilfe einer ultradünn ausgezogenen Pasteurpipette unter einem Stereomikroskop in eine Mikrotiterplatte möglich war. Die mit jeweils 300  $\mu L$  Z8-Medium pro Vertiefung gefüllten Mikrotiterplatten wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert wie die Anreicherungs-

kulturen. Erfolgreich angewachsene Isolate wurden in 5 ml-Reaktionsgefäße und anschließend in 50-ml-Erlenmeyerkolben überführt (Abb. 26).



**Abb. 26:** Isolationsprozedur zur Isolierung von nostocalen Cyanobakterien.

Auf diese Weise wurden ca. 1500 Einzelfilamente isoliert, die aus 24 Planktonproben von 20 verschiedenen Gewässern stammten. Allerdings erwiesen sich im Nachhinein nur 50 % der für die Isolation verwendeten Planktonproben als CYN-haltig, so dass aus den restlichen Proben eine Identifizierung von CYN-Produzenten nahezu unwahrscheinlich war. Nach einer Inkubationsphase von 3 - 4 Wochen waren ca. 350 Isolate aus 16 verschiedenen Seen für eine weitere Kultivierung geeignet. Anschließend konnten 240 Stämme dauerhaft zur Gewinnung von Zellmaterial für die Toxinanalytik kultiviert werden, deren taxonomische Zuordnung und die Variabilität ihrer Herkunft in Tabelle 2 dargestellt ist.

**Tab. 2:** Anzahl der Isolate einzelner Taxa und Variabilität ihrer Herkunft, d.h. Anzahl von Gewässern, aus denen die jeweilige Art isoliert werden konnte.

Anzahl Stämme	Taxon	Anzahl Gewässer
32	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	9
18	<i>Anabaena</i> sp. / <i>Anabaenopsis</i> sp. davon als Art eindeutig bestimmt:	5
4	<i>Anabaena crassa</i>	1
2	<i>Anabaena viguieri</i>	1
2	<i>Anabaena affinis</i>	1
1	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	1
200	<i>Aphanizomenon</i> sp. davon als Art eindeutig bestimmt:	16
19	<i>A. gracile</i>	6
2	<i>A. aphanizomenoides</i>	1
57	<i>A. flos-aquae</i>	11

Bei der Isolation der Einzelfäden unter dem Stereomikroskop konnten die Cyanobakterien zunächst nur auf Gattungsebene bestimmt werden. Nach dem Anwachsen und Transfer in größere Kultivierungsgefäße erfolgte eine mikroskopische Sichtung der Isolate zur taxonomischen Bestimmung der Cyanobakterienart. Neben den aufgrund distinkter Merkmale leicht identifizierbaren Arten wie z.B. *C. raciborskii* und *A. aphanizomenoides* konnten eine Reihe von Stämmen nicht eindeutig bestimmten Arten zugeordnet werden. Dies resultierte entweder aus dem Fehlen von Merkmalen, die zur sicheren Einordnung nötig sind, wie z.B. dem Fehlen von Akineten bei vielen *Anabaena*-Isolaten oder aus dem Auftreten von

sogenannten Übergangsformen, die Merkmale verschiedener Arten aufweisen. Das war häufig bei der Gattung *Aphanizomenon* zu beobachten. Da für diese Cyanobakterienarten bzw. -gattungen auch von Spezialisten eine Überarbeitung der Taxonomie gefordert wird, wurde in Zweifelsfällen auf eine Artbestimmung verzichtet. Außerdem konnte beobachtet werden, dass sich ursprünglich eindeutig identifizierte Isolate während der Kultivierung so veränderten, dass diese Klassifizierung später nicht mehr zweifelsfrei nachzuvollziehen war. Dieses Phänomen ist für viele Cyanobakterienstämme hinlänglich bekannt.

### Identifikation der CYN-Produzenten und Toxinquantifizierung durch LC-MS/MS

Das geerntete Zellmaterial wurde lyophilisiert (gefriergetrocknet), 5 mg von jedem Stamm in Extraktionsgefäße gefüllt und wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben extrahiert und analysiert. Die Identifizierung des CYN in den Isolaten erfolgte durch den Vergleich mit einer CYN-Standardsubstanz.

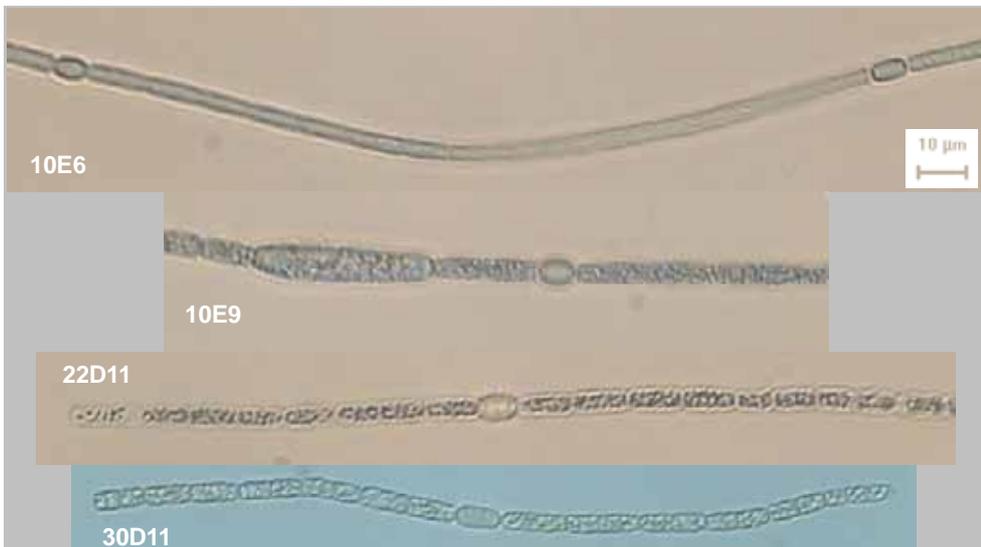
In 4 der insgesamt 240 verschiedenen Isolate konnte CYN nachgewiesen werden. Das entspricht einem Anteil von 1,7 %. Alle Produzenten sind *Aphanizomenon*-Arten und stammen aus 3 Seen (Tab. 3, Abb. 27). Wie in früheren Untersuchungen von Fastner et al. (2003) bilden auch die aktuell isolierten *C.-raciborskii*-Stämme kein CYN. Ebenso fand sich kein CYN in den *Anabaena*-Stämmen. Obwohl sich herausstellte, dass die Hälfte des Ausgangsmaterials der Isolationsprozedur kein CYN enthielt (Tab. 2), erstaunt der geringe Anteil CYN-produzierender Stämme an der Gesamtzahl dennoch. Die CYN-Produzenten scheinen demnach eher einen geringen Anteil am Phytoplankton der Gewässer zu haben. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die gewählten Kultivierungsbedingungen das Wachstum der Nicht-Produzenten mehr fördern als das der CYN-Produzenten und diese somit im Isolationsprozess unterdrückt bzw. ausgesondert werden.

Tab. 3: Identifizierte CYN-Produzenten.

Stamm	CYN-Gehalt (mg g <sup>-1</sup> TG)	isoliert als	Herkunft
10 E 6	2,3	<i>Aph. flos-aquae</i>	Melangsee
10 E 9	3,2	<i>Aph. flos-aquae</i>	Melangsee
22 D11	6,6	<i>Aph. flos-aquae</i>	Heiliger See / Potsdam
30 D 11	1,6	<i>Aphanizomenon</i> sp.	Petersdorfer See

Die Stämme wiesen CYN-Gehalte von 0,16 - 0,66 % ihres Trockengewichtes auf. Diese Konzentrationen sind im Vergleich zu den bisher publizierten Daten anderer Produzenten (Übersicht bei Spooft et al. 2006) als recht hoch zu bewerten und vergleichbar mit den höchsten Toxingehalten von *C. raciborskii* (0,55 % - Hawkins et al. 1997). Allerdings variieren die Toxingehalte verschiedener *C.-raciborskii*-Stämme wesentlich stärker als bei den in diesem Projekt identifizierten Produzenten. Für verschiedene australische Isolate werden beispielsweise CYN-Gehalte von 0,00012 - 0,46 % unter identischen Wachstumsbedingungen angegeben (Saker und Neilan 2001). Geht man aufgrund ihrer geografischen Herkunft davon aus, dass es sich bei unseren Stämmen um mindestens 3 verschiedene Genotypen handelt, scheint die interspezifische Variabilität der CYN-Gehalte kleiner zu sein als bei *C. raciborskii*. Außerdem wird für *C. raciborskii* ein starker Einfluss von Umweltfaktoren auf die CYN-Produktion beschrieben. Saker und Griffith (2000) berichten von drastischen Abnahmen des CYN-Gehaltes bis hin zur Einstellung der CYN-Synthese im Temperaturbereich von 20 – 35 °C. Es gilt also auch für *A. flos-aquae* zu prüfen, wie groß der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur und Nährstoffe auf die Toxinproduktion ist.

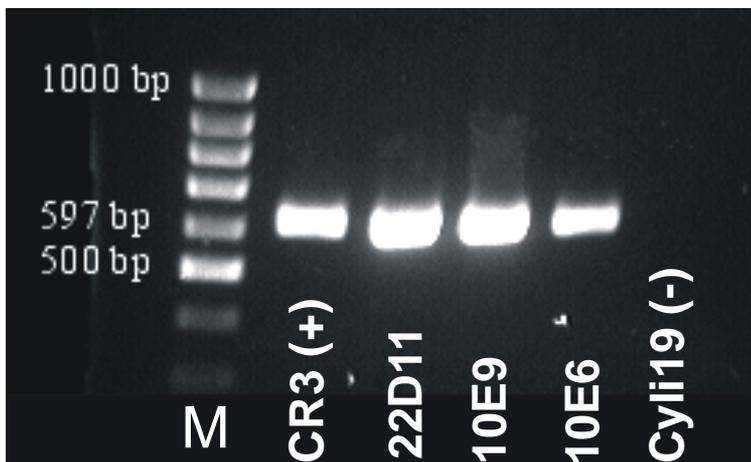
Insgesamt lässt sich aus der Vielzahl der CYN-negativen Isolate und den recht hohen CYN-Gehalten der Produzenten schlussfolgern, dass die CYN-Funde in den Untersuchungsgewässern wahrscheinlich auf einige wenige toxinproduzierende Genotypen zurückzuführen sind. Da diese in der Lage sind, vergleichsweise große Toxinmengen zu bilden, sind bei Dominanz dieser Stämme im Gewässer hohe CYN-Konzentrationen zu erwarten.



**Abb. 27:** Typische Filamente der CYN-produzierenden Stämme (mikroskopische Aufnahmen bei ca. 400facher Vergrößerung). Der Stamm 10E6 bildet keine Gasvesikel.

## Molekularbiologische Detektion der CYN-kodierenden Gene

Obwohl die Biosynthese des CYN noch nicht vollständig aufgeklärt ist, weiß man, dass es sich hierbei um ein integriertes System einer Polyketidsynthetase (PKS)-Komponente (Burguone et al. 2000) und einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) (Shalev-Alon et al. 2002) handelt. Schembri et al. (2001) und Fergusson und Saint (2003) zeigten für *C.-raciborskii*- und *A.-ovalisporum*-Stämme eine direkte Verbindung zwischen der Detektion bestimmter PKS- und NRPS-Gene und dem Vorhandensein von CYN. Es ist deshalb anzunehmen, dass diese Gene tatsächlich in die CYN-Biosynthese involviert sind. Die in der Literatur für die Detektion der Biosynthesegene verwendeten Primerpaare M13/M14 für die NRPS-Komponente und M4/K18 für den PKS-Teil des Multienzymkomplexes wurden auch an den identifizierten CYN-Produzenten 10 E 6, 10 E 9 und 22 D 11 getestet.



**Abb. 28:** Nachweis des Peptidsynthetase-PCR-Fragments im Australischen *Cylindrospermopsis-raciborskii*-Stamm CR3, der in dieser Analyse als Positivkontrolle eingesetzt wurde, und in den von uns isolierten *Aphanizomenon flos-aquae* Stämmen 22D11, 10E9 und 10E6. Der Deutsche nicht-CYN-produzierende *C.-raciborskii*-Stamm Cyl19 wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Eine PS-Bande ist nicht vorhanden, d.h. dieses Fragment war im Genom von Cyl19 nicht vorhanden, eine CYN-Synthese folglich nicht möglich.

Bei Applikation der M13/M14 Primer in einer PCR (für eine detaillierte Beschreibung des PCR-Prinzips siehe Kapitel 9) entstand in den Stämmen,

ebenso wie in dem als CYN-Produzent bekannten Kontrollstamm CR3, ein 597 bp großes Fragment, welches in der Negativkontrolle Cyl19 fehlte (Abb. 28). Die Peptidsynthetase-Komponente konnte demnach zweifelsfrei nachgewiesen werden - im Gegensatz zur PKS-Domäne. Das Fehlen eines DNA-Fragmentes bei Verwendung des für die Detektion der PKS-Komponente geeigneten Primerpaares M4/K18 deutet auf einen möglicherweise variablen Aufbau des CYN-Biosynthesystems bei den verschiedenen Produzentenarten hin. Solche interspezifischen Unterschiede im modularen Aufbau und den Sequenzen der Synthesysteme sind beispielsweise für das cyanobakterielle Toxin Microcystin bekannt, wo in den Gattungen *Microcystis*, *Planktothrix* und *Anabaena* sehr unterschiedlich aufgebaute Multienzymkomplexe identische Moleküle (Microcystine) bilden (Tillet et al. 2000, Christiansen et al. 2003, Rouhiainen et al. 2004, Mbedi et al. 2005).

Derartige Variabilitäten im genetischen Code der CYN-Synthetase verschiedener Cyanobakterienarten oder gar verschiedener Stämme einer Art sind gut geeignet, um globale Ausbreitungsmuster von CYN-Produzenten bzw. deren evolutionsbiologische (phylogenetische) Verwandtschaft zu untersuchen. Weiterführende molekularbiologische Analysen unserer identifizierten CYN-Produzenten und der Vergleich mit (sub-)tropischen Toxinbildnern könnten Aufschluss darüber geben, auf welchem Wege sich das Toxin in gemäßigte Klimazonen ausgebreitet hat und welche weitere Expansion in den nächsten Jahren zu erwarten wäre.<sup>4</sup>

---

<sup>4</sup> Zu diesem Themenkomplex ist folgende weiterführende Publikation aus dem Projekt hervorgegangen: Preußel et al. (2006).

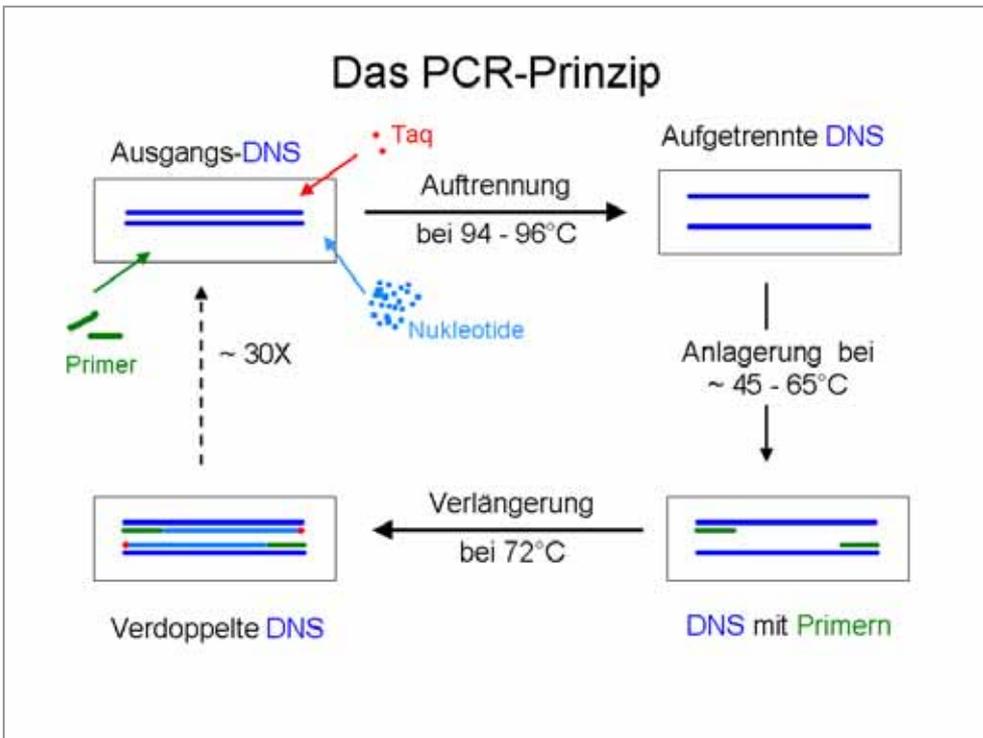
## 9. Detektion von *Cylindrospermopsin*-produzierenden Cyanobakterien mittels PCR

Anke Stüken

PCR ist die Abkürzung für Polymerase-Chain-Reaction, zu Deutsch: Polymerase-Ketten-Reaktion. Die PCR ist eine gentechnische Methode zur Vermehrung eines definierten DNA-Fragments, der folgendes Prinzip zugrunde liegt:

Zuerst werden DNA-Abschnitte identifiziert, die jeweils vor und hinter dem zu vervielfältigenden DNA-Fragment liegen. Komplementär zu den Basensequenzen dieser Abschnitte werden dann zwei kurze (~ 15 – 30 Basen lange) DNA-Sequenzen synthetisiert; die so genannten Primer. Als nächstes wird die DNA, die untersucht werden soll, extrahiert, d.h. vom restlichen Zellmaterial isoliert. Die extrahierte DNA wird dann unter Zugabe der Primer, einem Enzym (in unserem Fall: Taq), der vier unterschiedlichen Nukleotide (den Bausteinen der DNA) und einigen PCR-Chemikalien auf 94 – 96 °C erhitzt. Dieses Erhitzen trennt die beiden Stränge der DNA auf, so dass sie anschließend als Einzelstränge vorliegen (Abb. 29). Das Gemisch wird dann auf ~ 45 – 60 °C abgekühlt, wobei sich die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte anlagern. Die dafür notwendige Temperatur hängt von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer ab. Nachdem sich die Primer an die DNA angelagert haben, wird die Temperatur auf 72 °C erhöht. Dies ist die optimale Temperatur für die Taq. Die Taq verlängert nun die Primer in Richtung des zu vervielfältigenden DNA-Fragments, indem sie die Nukleotide nach den Regeln der Basenpaarung „einbaut“. Im Ergebnis sind nun zwei Exemplare des ursprünglichen DNA-Fragments vorhanden. Der Kreislauf des Erhitzens und Abkühlens wird ~ 30x wiederholt, so dass am Ende der PCR das zu vervielfältigende DNA-Fragment in einer Vielzahl von identischen Kopien vorliegt.

Nach der PCR wird das PCR-Produkt auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarose-Gel aufgetragen und Spannung angelegt. Durch die Spannung „wandert“ das PCR-Produkt durch das Gel, vom Minus- zum Pluspol. Zusätzlich zum PCR-Produkt wird eine „Leiter“ aufgetragen. Eine „Leiter“ ist ein Gemisch von PCR-Produkten mit unterschiedlicher aber definierter Länge. Da kleinere DNA-Fragmente schneller als größere durch das Gel wandern, trennen sich die Fragmente der Größe nach auf. Als letztes wird das Gel unter UV-Licht fotografiert. Das Ethidiumbromid im Gel lagert sich an die DNA-Fragmente an und fluoresziert unter UV-Licht, dadurch können alle DNA Fragmente, also PCR-Produkte und Leiter, sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der Leiter kann abgeschätzt werden, wie lang das vervielfältigte PCR-Produkt ist. Abbildung 30 zeigt ein Foto von einem Gel.

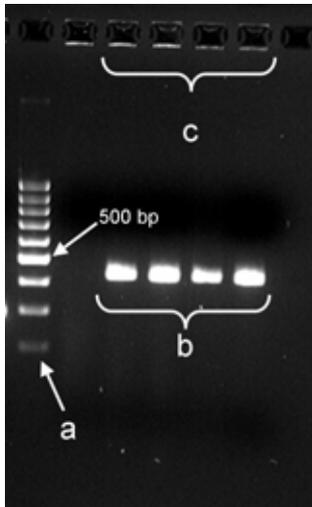


**Abb. 29:** Das PCR-Prinzip. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Text.

Sinn der PCR in diesem Projekt war es, CYN-Produzenten zu identifizieren. Zum einen sollten alle isolierten Cyanobakterien Stämme auf das Vorhandensein der Gene, die an der CYN-Synthese beteiligt sind, überprüft werden, zum anderen, sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, einzelne Cyanobakterien-Filamente auf das Vorhandensein dieser Gene hin zu prüfen.

Vor Beginn des Projekts, waren bereits Primer und eine PCR für die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten entwickelt und veröffentlicht worden, die eine Polyketidsynthetase (PKS) und eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS) kodieren, beide wahrscheinlich essentiell für die CYN-Synthese und gekoppelt (Schembri et al. 2001, Fergusson und Saint 2003). Siehe hierzu auch Kapitel 8. Darüber hinaus war eine Multiplex-PCR veröffentlicht, die spezifisch für *C.-raciborskii*-Stämme entwickelt worden war und CYN-produzierende von nicht-CYN-produzierenden *C.-raciborskii*-Stämmen unterscheiden sollte (Fergusson und Saint 2003). In einer Multiplex PCR werden mehrere Genfragmente gleichzeitig vervielfältigt (amplifiziert). Diese Fragmente sind unterschiedlich lang und können daher wie eine Leiter auf einem Gel aufgetrennt werden. In diesem Fall wurden drei Fragmente vervielfältigt, ein Teil der PKS, ein Teil der NRPS und ein C.-

*raciborskii*-spezifisches Fragment. Fehlen das PKS und das NRPS-Fragment auf dem Gel, bedeutet dies, dass es ein Nicht-Produzent ist. Fehlt das *C.-raciborskii*-spezifische Fragment, heißt es, dass es kein *C. raciborskii* ist.



**Abb. 30:** Foto von einem mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegel. a ist die Leiter, der dicke Balken in der Mitte ist 500 Basenpaare (bp) lang, der oberste ist 1000 bp lang. b sind vier PCR-Produkte, mit einer Länge von ca. 450 bp. c sind die „Taschen“, kleine Vertiefungen im Gel, in denen am Anfang die PCR-Produkte und Leiter eingefüllt werden.

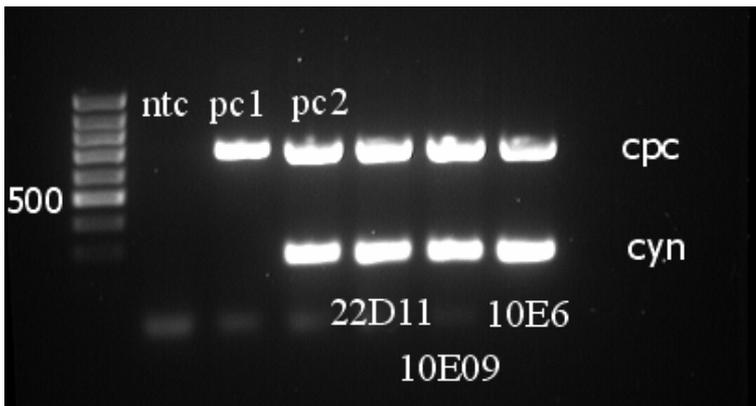
Beide Methoden wurden an tropischen Stämmen zu einem Zeitpunkt entwickelt, als es noch gar keine CYN-produzierenden Stämme aus gemäßigten Breiten-graden gab. Die erste Methode funktionierte in unserem Labor an den CYN-produzierenden Stämmen CR3 und ILC-146. CR3 ist ein australischer *C.-raciborskii*-Stamm, der uns von Martin Saker und ILC-146 ein israelischer *A.-ovalisporum*-Stamm, der uns von Aaron Kaplan zum Etablieren unserer Methoden zur Verfügung gestellt wurde. Die 100 %ige Übertragung dieser Methode auf unsere CYN-produzierenden *A. flos-aquae* Stämme war leider nicht möglich. Wir konnten nur das NRPS-Fragment in unseren vier CYN-produzierenden *A.-flos-aquae*-Stämmen zuverlässig nachweisen. Beim Nachweis des PKS-Fragments haben wir entweder keine oder multiple Banden erhalten. Multiple Banden bedeuten, dass die Primer nicht spezifisch genug binden und daher mehrere Fragmente vervielfältigen. Die zweite Methode funktionierte in unserem Labor an keinem Stamm zuverlässig. Wir haben festgestellt, dass die Primer für das *C.-raciborskii*-spezifische Fragment nicht bei allen *C.-raciborskii*-Stämmen, die aus unseren Breiten-graden isoliert wurden, passen. In vielen Fällen fehlte die entsprechende Bande. Darüber hinaus vervielfältigten die *C.-raciborskii*-spezifischen Primer auch Fragmente von Nicht-*C.-raciborskii*-Stämmen.

Die oben beschriebenen Probleme beruhen sehr wahrscheinlich darauf, dass sich die untersuchten DNA-Sequenzen zwischen den tropischen und den gemäßigten Stämmen sowie zwischen unterschiedlichen Arten unterscheiden und daher die

Primer nicht oder nur schlecht passen, i.e. keine oder multiple Banden amplifizieren.

Aufgrund dieser Probleme haben wir eigene, neue Primer entwickelt. Wir haben Primer zur Amplifikation eines Abschnitts des PKS-Fragments sowie Primer zur Amplifikation eines Abschnitts eines Cyanobakterien-spezifischen Gens entwickelt. Diese beiden Primerpaare sind so gewählt, dass sie zwei unterschiedlich lange Abschnitte vervielfältigen und ähnliche Temperatureigenschaften haben, d.h. in einer Multiplex-PCR eingesetzt werden können. An allen getesteten Kulturen funktioniert diese Methode zuverlässig. Bei CYN-produzierenden Kulturen erscheinen beide Banden auf dem Gel, bei Nicht-Produzenten nur die Cyanobakterien-spezifische Bande (Abb. 31).

Für den Nachweis der CYN-kodierenden Gene in Cyanobakterien Stämmen ist die Cyanobakterien-spezifische Bande nicht notwendig. Zum Nachweis der potenziellen CYN-Produktion reicht theoretisch der Nachweis von PKS und NRPS aus. Eigentlich sogar nur der Nachweis einer der beiden Abschnitte, denn diese scheinen nur gemeinsam oder gar nicht vorzukommen (Schembri et al. 2001; Fergusson und Saint, 2003). Für die SF-PCR (Single Filament-PCR) ist die Cyanobakterien-spezifische Bande jedoch unverzichtbar.



**Abb. 31:** Multiplex-PCR. Ganz links ist die Leiter aufgetragen, daneben die Negativkontrolle (ntc), in der nur Wasser als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Rechts daneben die erste Positivkontrolle (ptc1), in die DNA-Material vom nicht-CYN-produzierenden *C.-raciborskii*-Stamm Cyl19 eingesetzt wurde. Nur das Cyanobakterien-spezifische Fragment (cpc), die obere Bande, wurde amplifiziert. Für ptc2 wurde der CYN-produzierende *C.-raciborskii*-Stamm CR3 eingesetzt. Zwei Banden wurden amplifiziert, sowohl die obere Cyanobakterien-spezifische, als auch die untere CYN-spezifische. In den letzten drei Bahnen wurde DNA der CYN-produzierenden *A.-flos-aquae*-Stämme 22D11, 10E9 und 10E6 eingesetzt. Doppelbanden bei allen drei Stämmen zeigen, dass sie sowohl das Cyanobakterien-spezifische als auch das für die CYN-Synthese notwendige Genfragment besitzen.

In der SF-PCR werden nur einzelne Cyanobakterien-Filamente als Ausgangsmaterial eingesetzt, d.h. die anfängliche DNA-Menge ist sehr gering. Um sicher zu gehen, dass das Nichtvorhandensein der PKS-Bande ein Zeichen für das Nichtvorhandensein des PKS-Fragments und nicht ein Zeichen für eine fehlgeschlagene PCR ist, wird das Cyanobakterien-spezifische Fragment als Kontrolle mitamplifiziert. Fehlen beide Banden, hat die PCR nicht funktioniert, oder das Filament ist beim Isolieren doch nicht im PCR-Gefäß („Tube“) gelandet. Dies kann durchaus vorkommen, sind die Filamente doch so klein, dass sie weder mit dem bloßen Auge gesehen, noch nach der Isolation unterm Mikroskop im Tube wieder gefunden werden können. Um die Zellen aufzubrechen, werden die Tubes mit den Filamenten eingefroren und anschließend gekocht.

Diese von uns entwickelte Methode funktioniert gut an Filamenten, die aus Cyanobakterienkulturen isoliert wurden, leider jedoch noch nicht an Filamenten, die direkt aus Freilandproben isoliert wurden. Vermutlich sind in den Freilandproben Stoffe vorhanden, die die PCR hemmen. Bei einer „normalen“ PCR mit viel Ausgangsmaterial wird die DNA extrahiert, d.h. von allen hemmenden Stoffen getrennt. Bei einzelnen Filamenten ist dies nicht möglich, daher werden sie als ganzes, also inklusive Zelldebris etc. in die PCR eingesetzt. Zurzeit arbeiten wir an einer Methode, die PCR-Hemmer zu neutralisieren. Wir sind zuversichtlich, dass uns dies sehr bald gelingt und wir dann die über 1000 Filamente, die wir während dieses Projekts isoliert haben, mittels SF-PCR analysieren können.

## 10. Gelöste und partikuläre CYN-Konzentrationen in verschiedenen Seen und im saisonalen Verlauf

Jacqueline Rücker

Cylindrospermopsin ist in den Gewässern der Region Berlin und Brandenburg weit verbreitet. Das konnte durch das Screening-Programm im Jahr 2004, zunächst qualitativ, nachgewiesen werden (vgl. Kap. 7). Für die Abschätzung der Gefährdung, die für den Menschen von diesem Toxin ausgeht, sind jedoch quantitative, also pro Volumen Seewasser bezogene, Daten erforderlich. Da für ganz Europa bisher nur aus drei italienischen Seen (Manti et al. 2005) und einem spanischen Wasserspeicher (Quesada et al. 2006) quantitative Daten publiziert sind, war es ein wichtiges Anliegen dieses Projektes, diese Lücke zu füllen.

Hierfür wurde zum einen das Monitoring-Programm im Jahr 2005 durchgeführt, für das 20 Gewässer ausgewählt wurden, in denen 2004 sowohl CYN als auch potenziell CYN-produzierende Cyanobakterienarten, in diesem Fall *Cylindrospermopsis raciborskii* und *Anabaena bergii*, nachgewiesen worden waren, zum anderen die Untersuchungen der saisonalen Dynamik in zwei Seen, dem Langen See und dem Melangsee, in 2004 und 2005. Für die quantitative CYN-Analyse wurde jeweils ein definiertes Volumen der Wasserprobe über Membranfilter filtriert und die CYN-Konzentration sowohl der auf dem Filter befindlichen, partikulären ( $CYN_{part}$ ) als auch der gelösten Fraktion ( $CYN_{gel}$ ), d.h. im Filtrat, gemessen. Außerdem wurde das Biovolumen der Cyanobakterien und relevante Umweltparameter bestimmt. Die Monitoring-Gewässer wurden zwischen Juni und September in 14tägigem Abstand mindestens 3mal beprobt. Lagen mehr als 3 Messwerte pro See vor, wurden, um eine gleiche Gewichtung der Seen zu sichern, Monatsmittel gebildet, so dass für die statistische Datenanalyse pro See 3 bis 4 Datensätze in die Auswertung einbezogen wurden, d.h. aus den Messwerten von 93 Probenahmeterminen wurde eine Datenmatrix von 69 Werten für die Statistik erzeugt. Der Lange See und der Melangsee wurden 2004 und 2005 14tägig untersucht. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Untersuchungsgewässer sowie die Mittelwerte der Sichttiefen, der Gesamtphosphor- und der Gesamt-CYN-Konzentrationen.

### Cylindrospermopsin-Konzentrationen

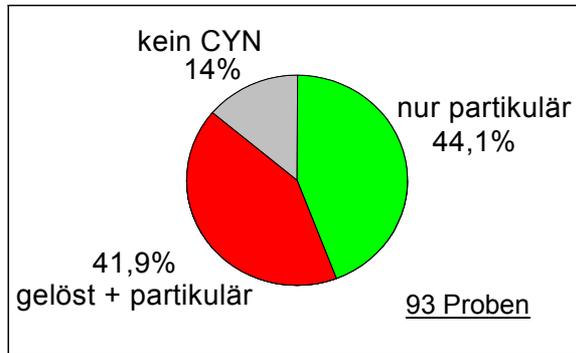
In den Monitoring-Gewässern konnte CYN in 80 von 93 Proben, bzw. in 18 der 20 Seen nachgewiesen werden. Damit wurden durch dieses Projekt erstmals quantitative CYN-Werte für eine größere Region in Europa vorgelegt. Die höchste gemessene Konzentration betrug  $12,1 \mu\text{g L}^{-1}$  Gesamt-CYN und in 16 Proben aus 7 Seen wurde der vorgeschlagene Grenzwert von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Humpage und Falconer 2003) überschritten. In 41 Proben wurde nur partikuläres CYN und in 42 Proben zusätzlich gelöstes CYN mit einem Anteil am Gesamt-CYN zwischen 24,3 und 99,8 % nachgewiesen (Abb. 32).

**Tab. 4:** Mittelwerte der Konzentrationen von Gesamtphosphor (TP), Gesamt-CYN ( $\text{CYN}_{\text{tot}}$ ) und der Sichttiefe (SD) der nach Mixistyp und TP geordneten 20 Seen, die von Juni bis September 2005 im Rahmen des Monitoring-Programmes untersucht wurden.  $\text{CYN}_{\text{tot}}$ -Konzentrationen über dem vorgeschlagenen Grenzwert von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  sind fett hervorgehoben.

See	Abkürzung	TP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	SD (m)	$\text{CYN}_{\text{tot}}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<i>Polymiktische Seen</i>				
Kleiner Zeschsee	KZ	32.9	1.05	0.14
Moderfitzsee	MF	34.2	0.63	0.01
Petersdorfer See	PE	37.7	0.50	0.02
Petznicksee	PZ	41.6	0.83	0.01
Bützsee	BU	42.3	0.70	<b>2.39</b>
Rahmer See	RA	42.9	0.82	0.19
Melangsee	ME	51.1	0.53	0.09
Zermützelsee	ZE	70.2	0.77	<b>8.40</b>
Langer See	LA	75.8	0.57	0.13
Braminsee	BR	78.6	0.38	0.79
Kutzingsee	KU	87.3	0.33	0.52
Vielitzsee	VI	98.3	0.43	0.00
Lieps	LI	107.0	0.25	<b>5.07</b>
<i>Dimiktische Seen:</i>				
Großer Glubigsee	GL	17.2	1.02	0.00
Springsee	SP	19.9	0.96	0.01
Pätzer Vordersee	PA	25.4	1.40	0.00
Großer Plessower See	GP	33.0	2.03	<b>1.10</b>
Ruppiner See	RU	36.2	0.97	<b>5.29</b>
Stolpsee	ST	41.3	0.98	<b>4.31</b>
Motzener See	MZ	47.9	1.73	0.00

Der Konzentrationsbereich des partikulären CYN betrug  $0,002 - 0,048 \mu\text{g L}^{-1}$ , während der des gelösten CYN mit  $0,077 - 11,75 \mu\text{g L}^{-1}$  deutlich höher lag und daher für die Überschreitung des Grenzwertes verantwortlich ist. Die absoluten Konzentrationen und die relativen Anteile der gelösten und partikulären Fraktion am Gesamt-CYN sind in Abbildung 33 C und 33 D dargestellt. Der saisonale Verlauf der CYN-Konzentrationen im Langen See und Melangsee ist in Abbildung 34 und 35 dargestellt. Im Jahresverlauf ist zu erkennen, dass die Konzentration

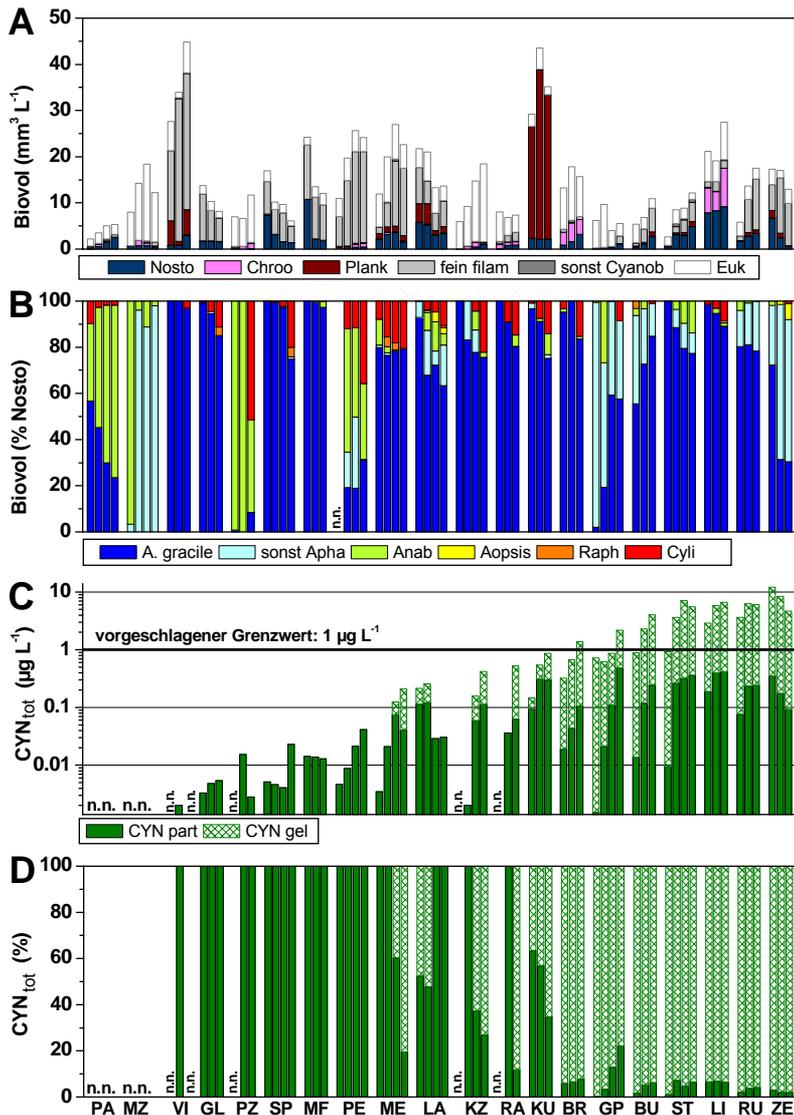
des gelösten CYN zeitversoben dem Verlauf des partikulären CYN nachfolgt, was auf eine Anreicherung von gelöstem CYN in der Wassersäule hindeutet.



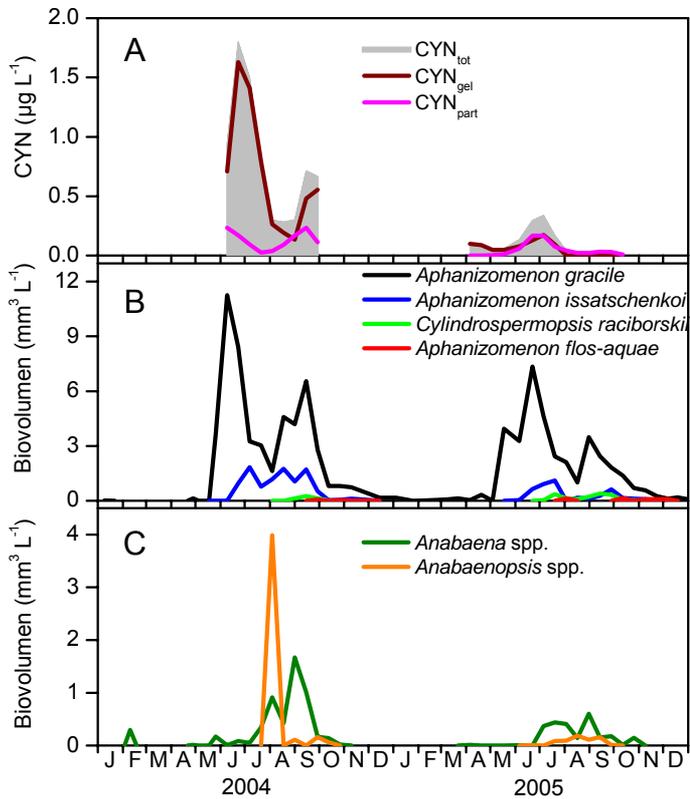
**Abb. 32:** Prozentuale Anteile der Proben entsprechend der Zusammensetzung der CYN-Fractionen 2005.

Im weltweiten Vergleich liegen die durch uns gemessenen CYN-Konzentrationen im mittleren Bereich, den Falconer und Humpage (2006) mit 1 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  angeben. Die im Zermützelsee gemessene maximale Konzentration von  $12,1 \mu\text{g L}^{-1}$  CYN<sub>tot</sub> liegt zwar unterhalb von Spitzenwerten, die in Australien oder Florida gefunden wurden. Diese Spitzenwerte stammen jedoch aus künstlichen Gewässern, die nicht für die Trinkwassergewinnung oder Erholung genutzt werden, wie Fischteichen (Saker und Eaglesham 1999) oder Speicherbecken auf Farmen (Shaw et al. 2000) oder in Cyanobakterien-Aufräumungen (Shaw et al. 1999). Damit bleiben weltweit nur 6 Publikationen mit volumenbezogenen CYN-Daten aus natürlichen Gewässern übrig, die alle in Tabelle 5 zusammengestellt sind.

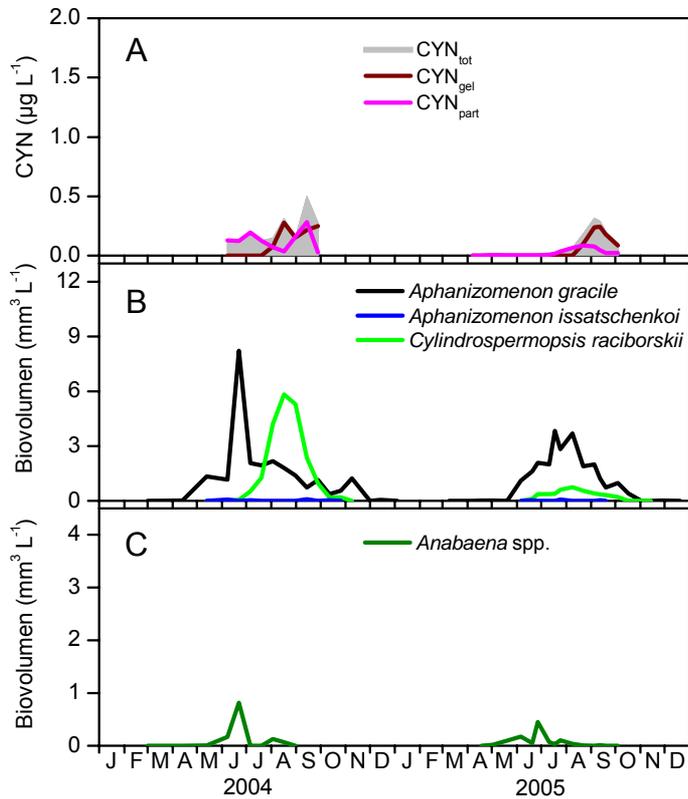
Bemerkenswert ist, dass CYN im Vergleich zum Microcystin nicht nur genauso weit verbreitet ist, sondern auch in gleich hohen Konzentrationen auftritt, was Beispiele aus verschiedenen europäischen Gewässern zeigen: Die maximalen Konzentrationen des partikulären Microcystins betragen zwischen  $0,6 - 2,6 \mu\text{g L}^{-1}$  in zwei holländischen Seen (Janse et al. 2004),  $1 - 3 \mu\text{g L}^{-1}$  im Müggelsee (Welker 2003),  $5,2 \mu\text{g L}^{-1}$  in einem französischen Flachsee (Briand et al. 2002) und  $6 \mu\text{g L}^{-1}$  im Langen See in 2005 Wiedner (in Vorbereitung). Das Microcystin ist jedoch überwiegend zellgebunden. Der Anteil der gelösten Fraktion liegt im Bereich von  $0,2 - 2,5 \%$  (Wiedner et al. 2003) und es akkumuliert nicht im Gewässer (Wiedner et al. 2002). Im Gegensatz hierzu zeigen unsere Ergebnisse, dass beim CYN die gelöste Fraktion die partikuläre um ein Vielfaches überschreiten kann und über die Zeit im Gewässer akkumuliert.



**Abb. 33:** Phytoplanktonzusammensetzung (A), Anteil einzelner Gattungen am Gesamtbiovolumen (Biovol) der Nostocales (B), Konzentrationen des partikulären (CYNpart) und gelösten CYN (CYNgel) logarithmisch aufgetragen (C) sowie als prozentuale Anteile am Gesamt-CYN ( $\text{CYN}_{\text{tot}}$ ; D) für 20 Seen (sortiert nach  $\text{CYN}_{\text{tot}}$ ) von Juni bis September 2005 (Datensatz für die statistische Analyse). Nosto – Nostocales, Chroo – Chroococcales, Plank – *Planktothrix agardhii*, fein filam - feinfädige Cyanobacterien (*Limnothrix* spp., *Pseudanabaena* spp., *Leptolyngbya* spp.), sonst Cyanob – sonstige Cyanobacterien, Euk - eukaryotische Algen; A. gracile – *Aphanizomenon gracile*, sonst Apha – sonstige *Aphanizomenon*-Arten, Anab – *Anabaena* spp., Aopsis – *Anabaenopsis* spp., Raph – *Raphidiopsis mediterranea*, Cyli – *Cylindrospermopsis raciborskii*. Abkürzungen der Seenamen siehe Tab. 4.



**Abb. 34:** Saisonaler Verlauf der Konzentrationen von gelöstem ( $\text{CYN}_{\text{gel}}$ ), partikulärem ( $\text{CYN}_{\text{part}}$ ) und Gesamt-CYN ( $\text{CYN}_{\text{tot}}$ ; A) sowie verschiedener Cyanobakterienarten (B, C) im Langen See 2004 bis 2005.



**Abb. 35:** Saisonaler Verlauf der Konzentrationen von gelöstem ( $\text{CYN}_{\text{gel}}$ ), partikulärem ( $\text{CYN}_{\text{part}}$ ) und Gesamt-CYN ( $\text{CYN}_{\text{tot}}$ ; A) sowie verschiedener Cyanobakterienarten (B, C) im Melangsee 2004 bis 2005. Die Achsen sind im gleichen Maßstab wie in Abb. 34 skaliert, um eine direkte Vergleichbarkeit der beiden Seen zu ermöglichen.

Die Freisetzung von gelöstem CYN kann sowohl aktiv als auch passiv, d.h. durch das Absterben der Cyanobakterienzellen, erfolgen. Da die Ergebnisse des saisonalen Verlaufs zeigen, dass die gelöste Fraktion deutlich höhere Werte als die zellgebundene Fraktion erreicht, kann man annehmen, dass CYN von den Produzenten überwiegend aktiv freigesetzt wird. Die zeitlichen Verschiebungen der Peaks der gelösten Fraktionen lassen zudem auf einen schlechten Abbau des CYN schließen, das sich daher in den Gewässern anreichert. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Chiswell et al. (1999) gemacht. Das unterscheidet CYN vom Microcystin, das rasch in der Wassersäule abgebaut wird. Die hohen Konzentrationen und die Persistenz des gelösten CYN stellen ein Risiko für die menschliche Gesundheit dar, da das Toxin bei der Trinkwasseraufbereitung durch herkömmliche Methoden wie Flockung, Sedimentation oder Filtration aus dem Rohwasser nicht ausreichend entfernt werden kann.

## Unter welchen Bedingungen kommt CYN vor?

Für die Monitoring-Gewässer wurden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen morphometrischen Faktoren wie Seefläche, Volumen oder maximale Tiefe und CYN gefunden (Daten nicht dargestellt). Daher kann man keinen bestimmten „CYN-Seetyp“ definieren, sondern muss mit CYN-Vorkommen in unterschiedlichsten Gewässertypen rechnen. Signifikant positive Korrelationen wurden zwischen der Konzentration von partikulärem CYN und Gesamtphosphor, Chlorophyll *a* sowie dem Phytoplanktonbiovolumen ermittelt und signifikant negative Korrelationen zur Sichttiefe bzw. der mittleren photosynthetisch aktiven Strahlung in der durchmischten Schicht der Wassersäule (Tab. 6). Diese Ergebnisse bedeuten, dass die Wahrscheinlichkeit, CYN zu finden, in Seen mit höherer Trophie etwas größer ist als in Seen geringer Trophie. Jedoch ist auf Grund der geringen Korrelationskoeffizienten eine Vorhersage der CYN-Konzentration derzeit auf Grundlage abiotischer oder trophischer Daten von Seen nicht möglich. Im Langen See und Melangsee wurden etwas höhere Korrelationskoeffizienten zwischen CYN und den o.g. Parametern gefunden (Daten nicht dargestellt). Aber auch hier ist eine Prognose zum Auftreten von CYN in Abhängigkeit abiotischer Parameter noch nicht möglich.

## Welche Cyanobakterien produzieren CYN?

Die Phytoplanktongemeinschaft der Monitoring-Gewässer war überwiegend von Cyanobakterien dominiert (Abb. 33 A). Die Cyanobakteriengemeinschaft war in den meisten Gewässern sehr divers, wie das Beispiel in Abb. 36 illustriert. Insgesamt wurden 43 Cyanobakterienarten aus 20 Gattungen bestimmt. Dabei trugen Arten der Ordnung Nostocales bedeutend zum gesamten Biovolumen der Cyanobakterien bei (Abb. 33 A). Innerhalb der Nostocales waren Arten der Gattung *Aphanizomenon* am häufigsten vertreten, insbesondere *A. gracile* (Abb. 33 B). Sie dominierte die Nostocales in 47 % aller Fälle und fehlte nur in 8 Proben aus 3 Seen. Alle anderen Arten bzw. Gattungen der Nostocales wurden in weit weniger Proben und meist niedrigeren Anteilen gefunden (Abb. 33 B, Tab. 6).

Die saisonale Dynamik nostocaler Cyanobakterien im Langen See und Melangsee ist in Abbildung 34 B, C und 35 B, C dargestellt. Auch hier erreichen Populationen von *A. gracile* die höchsten Biovolumina. Anzumerken ist, dass in beiden Gewässern auch die zur Ordnung der Oscillatoriales gehörende *Pseudanabaena limnetica* und im Langen See zusätzlich *Planktothrix agardhii* mit hohen Biovolumina auftraten (hier nicht dargestellt).

Gesondert erwähnt werden soll hier das Neo-Cyanobakterium *Anabaena bergii*, das erstmals 2004 in der Untersuchungsregion nachgewiesen wurde (vgl. Kap. 5).

Bei dieser ersten quantitativen Erhebung im Monitoring-Programm wurde die Art in 12 Seen identifiziert. Sie erreichte ein maximales Biovolumen von  $0,24 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$  und trug mit 55 bzw. 64 % zum Biovolumen der Nostocales im Petersdorfer See bzw. Petznicksee bei. Dies beweist, dass sich diese, aus tropischen und subtropischen Regionen eingewanderte Art, in norddeutschen Gewässern etabliert hat.

**Tab. 5:** Übersicht der weltweit publizierten quantitativen Daten von gesamtem (CYN<sub>tot</sub>), partikulärem (CYN<sub>part</sub>) sowie gelöstem (CYN<sub>gel</sub>) Cylindrospermopsin.

<b>Untersuchungsgebiet</b>	<b>CYN<sub>tot</sub></b> (µg L <sup>-1</sup> )	<b>CYN<sub>part</sub></b> (µg L <sup>-1</sup> )	<b>CYN<sub>gel</sub></b> (µg L <sup>-1</sup> )	<b>Organismen</b>	<b>Quelle</b>
<b>Europa</b>					
93 Proben aus 20 Seen im Tiefland NO-Deutschlands, Juni-Oktober 2005.	0-12,1	0-0,1	0-11,8	<i>Aphanizomenon gracile</i> , <i>A. flos-aquae</i> , <i>C. raciborskii</i> , <i>Anabaena bergii</i>	Dieses Projekt
Proben aus 3 italienischen Seen, Juli- Okt. 2004.	0,5-15			<i>C. raciborskii</i>	Manti et al. 2005.
Arcos Reservoir, Südspanien, Aug-Sept. 2004.	n.b.	1,5-9,4	n.b.	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	Quesada et al. 2006.
<b>Australien</b>					
Hervey Bay Gebiet, Queensland, Nov. 1997-Jan. 1998.	10-92	0,7-29	7-63	<i>C. raciborskii</i>	Chiswell et al. 1999.
183 Proben aus 15 Speichern, Queensland. Okt. 1997- Juni 1999.	0-80	n.b.	n.b.	<i>C. raciborskii</i>	McGregor und Fabbro 2000.
Roh- und Trinkwasser von 2 Wasserwerken, 1999-2001.	1,17	n.b.	20,5%		Hoeger et al. 2004.
Cyanobakterien-Aufräumungen von 2 kleinen Flachseen in der Nähe von Hervey Bay, QL. Feb, April, Okt., Nov. 1997.	4-120	0-4	4-120	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i> blooms, not <i>C. raciborskii</i>	Shaw et al. 1999.
Fischteich, Queensland, August 1997.	max. 589	93%	7%	<i>C. raciborskii</i>	Saker und Eaglesham, 1999.
Farm Speicherbecken, subtrop. Australien.	max. 800	?	?	<i>C. raciborskii</i>	Shaw et al. 2000.
<b>Amerika</b>					
Oberflächengewässer, Florida, USA, 1999-2000.	8,1-97,1	n.b.	n.b.	<i>C. raciborskii</i>	Burns et al. 2002.

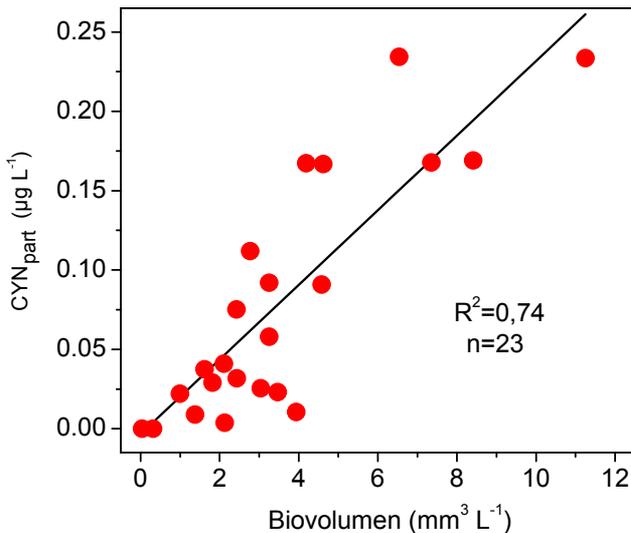


**Abb. 36:** Phytoplanktongemeinschaft im Langen See im August 2004, mikroskopische Aufnahme einer Netzprobe bei 200facher Vergrößerung

Ein interessanter Aspekt im Vergleich zu früheren Untersuchungen, ist die Tatsache, dass sich Anzeichen häufen, die auf eine Zunahme von Nostocales in Gewässern der Untersuchungsregion hinweisen. Beispielsweise übertraf im Jahr 2005 die Populationsgröße von *A. gracile* die von *P. agardhii* im Langen See erstmals seit 1993 (vgl. Wiedner et al. 2002, Mischke 2003). Überwiegend kann dies auf eine Trophieminderung zurückgeführt werden, in deren Folge die Populationen der Microcystin-produzierenden *P. agardhii* abnahmen – was mit einer deutlichen Verminderung der Microcystinkonzentrationen einhergeht - während keine Abnahme der Populationsgrößen von *Aphanizomenon*-Arten beobachtet wurde (Wiedner et al. in Vorbereitung). Auch für einige der Monitoring-Gewässer ist im Vergleich zur Periode 1993 - 96 (Rücker et al. 1997, Wiedner 2002) eine Zunahme des Anteils von Nostocales zu verzeichnen. Wie in Kapitel 6 diskutiert wird, könnten hierfür synergistische Effekte von klimatischen Veränderungen und Trophieminderung eine Rolle spielen, was es in künftigen Studien aufzuklären gilt.



**Abb. 37:** Mikroskopische Aufnahme von *Aphanizomenon gracile* in 400facher Vergrößerung.



**Abb. 38:** Zusammenhang zwischen der Konzentration des partikulären CYN (CYN<sub>part</sub>) und dem Biovolumen von *Aphanizomenon gracile* im Langan See 2004 und 2005.

Die statistische Analyse der Zusammenhänge zwischen den CYN-Konzentrationen und der Cyanobakterienzusammensetzung ergab für die Monitoring-Gewässer (Tab. 6) einen vergleichsweise hohen Korrelationskoeffizienten zwischen CYN<sub>part</sub> und dem Biovolumen der Nostocales, was darauf hinweist, dass die CYN-Produzenten in dieser Cyanobakterienordnung zu finden sind. Auf Gattungsebene wurde der höchste Koeffizient für *Aphanizomenon* ermittelt und auf Artebene für *Aphanizomenon gracile*. Ebenfalls hohe Korrelationskoeffizienten wurden jedoch auch für *Planktothrix agardhii* und *Cylindrospermopsis raciborskii* ermittelt. Keine positiven Zusammenhänge wurden dagegen für *Aphanizomenon flos-aquae* und *Anabaena bergii* festgestellt. Bei der Analyse der saisonalen Daten wurden für den Langan See deutlich höhere Korrelationskoeffizienten zwischen CYN<sub>part</sub> und *A. gracile* (0,8) sowie *P. agardhii* (0,7) ermittelt. Im Melangsee dagegen wurden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen CYN<sub>part</sub> und den o.g. Taxa gefunden. Außerdem besteht im Langan See ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des partikulären CYN und dem Biovolumen von *A. gracile* (Abb. 37 und 38), was für keine andere Art und keinen anderen See gefunden wurde.

**Tab. 6:** Spearman-Rank-Korrelationskoeffizienten für partikuläres ( $CYN_{part}$ ), gelöstes ( $CYN_{gel}$ ) bzw. Gesamt-Cylindrospermopsin ( $CYN_{tot}$ ) und ausgewählte abiotische sowie biotische Parameter der Monitorig-Gewässer von 2005 (Datensatz für die statistische Analyse; z.T. wurden Monatsmittel gebildet). Das Signifikanzniveau  $p < 0.01$  ist durch \*\* markiert; n gibt die Anzahl der eingeschlossenen Fälle an.

Parameter	n	$CYN_{part}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$CYN_{gel}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$CYN_{tot}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
TP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	69	0,389**	0,338**	0,319**
TN ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	69	0,214	0,226	0,230
DIP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	69	0,032	-0,064	-0,075
$\text{NH}_4\text{-N}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	69	-0,123	-0,179	-0,185
$\text{NO}_{tot}\text{-N}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	69	0,154	0,149	0,143
Temp ( $^{\circ}\text{C}$ )	69	-0,205	-0,020	-0,140
Sichttiefe (m)	68	-0,440**	-0,176	-0,287**
$l_{mix}$ ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	69	-0,304**	-0,166	-0,165
Chl a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	69	0,333**	0,059	0,130
<u>Biovolumen von (<math>\text{mm}^3 \text{L}^{-1}</math>):</u>				
Phytoplankton, gesamt	69	0,292**	0,061	0,127
Cyanobakterien, gesamt	69	0,399**	0,114	0,234
Nostocales	68	0,537**	0,344**	0,417**
<i>Aphanizomenon</i> spp.	67	0,585**	0,388**	0,479**
<i>A. gracile</i>	63	0,501**	0,278	0,353**
<i>A. flos-aquae</i>	21	-0,252	0,108	0,035
<i>A. issatschenkoi</i>	23	0,362	0,283	0,324
<i>A. aphanizomenoides</i>	7	-0,536	-0,204	-0,536
<i>Aphanizomenon</i> spec.	22	0,117	0,309	0,283
<i>Anabaena</i> spp.	47	0,080	0,036	-0,018
<i>Anabaena bergii</i>	20	-0,064	-0,146	-0,100
<i>Anabaenopsis</i> spp.	7	-0,607	-0,523	-0,536
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	40	0,428**	0,223	0,348
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	14	0,591	0,079	0,266
<i>Planktothrix agardhii</i>	58	0,486**	0,329**	0,365**
feinfädige Oscillatoriales	67	0,103	-0,080	0,039
Chroococcales	69	-0,061	-0,130	-0,132
Sonstige Cyanobakterien	28	0,191	0,149	0,155

Die Korrelationskoeffizienten zwischen der Konzentration des gelösten CYN und den Biovolumina der Cyanobakterien fielen stets geringer aus als die zum partikulären CYN. Als Ursache dafür muss die Entkopplung von Populationswachstum, CYN-Produktion und CYN-Abbau angesehen werden, die zu einer Anreicherung des gelösten Toxins im Wasserkörper führt. Es ist prinzipiell denkbar, dass gelöstes CYN noch nachgewiesen werden kann, wenn die CYN-Produzenten schon abgestorben, also in den Phytoplanktonproben nicht mehr zu finden, sind.

Aus der Gesamtheit der Befunde und Analysen lässt sich schlussfolgern, dass *Aphanizomenon gracile* mit hoher Wahrscheinlichkeit CYN produziert und hauptsächlich für die CYN-Vorkommen verantwortlich ist. Das belegen die statistischen Analysen und die Tatsache, dass diese Art in 5 CYN-positiven Proben als einziger Vertreter der Ordnung Nostocales gefunden wurde. Dieses Ergebnis hat weitreichende Konsequenzen, denn *A. gracile* ist eine weit verbreitete heimische Art in den Gewässern Norddeutschlands. Das könnte auch die weite Verbreitung des Toxins erklären (vgl. Kap. 7). Der endgültige Beweis hierfür muss jedoch noch anhand von Stamm-Isolaten dieser Art erbracht werden.

*Aphanizomenon flos-aquae* ist bereits als potenzieller CYN-Produzent eindeutig identifiziert worden (vgl. Kap. 8). Da diese Art jedoch nur in 19 der 80 CYN-positiven Proben mit sehr geringen Biovolumina vorkam, kann sie nicht der Hauptverursacher der CYN-Vorkommen sein. Auch beide *Aphanizomenon*-Arten zusammen erklären die CYN-Vorkommen nicht befriedigend, weshalb derzeit weitere Produzenten in Betracht gezogen werden müssen. Dazu gehört *C. raciborskii*, die in vielen CYN-haltigen Proben vorkam und deren Biovolumen signifikant mit CYN korrelierte. Von ihr wurden bisher jedoch keine CYN-produzierenden Stämme aus dem Untersuchungsgebiet (Kap. 8, Fastner et al. 2003) oder anderen europäischen Gewässern (Bernard et al. 2003, Saker et al. 2003) isoliert, sondern nur aus Gewässern in Australien (Hawkins et al. 1997, Saker und Griffiths 2000), Neuseeland (Wood und Stirling 2003), Thailand (Li et al. 2001b) oder Japan (Chonudomkul et al. 2004).

*Planktothrix agardhii* war ebenfalls in vielen CYN-positiven Proben vertreten und ihr Biovolumen korrelierte signifikant mit CYN<sub>part.</sub> Obwohl für *Planktothrix agardhii* (Ordnung Oscillatoriales) bislang weltweit keine CYN-Produzenten nachgewiesen wurden, kann man die Möglichkeit nicht prinzipiell ausschließen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der Zusammenhang zwischen ihrem Biovolumen und CYN zufällig ist, da sie immer zusammen mit *A. gracile* auftritt, was ein Korrelationskoeffizient von 0,6 zwischen dem Biovolumen der beiden Arten belegt.

Schließlich müssen auch das Neo-Cyanobakterium *Anabaena bergii* - von dem CYN-produzierende Stämme in Australien isoliert wurden (Schembri et al. 2001) - und weitere Arten der Gattung *Anabaena* als CYN-Produzenten in Betracht gezogen werden. In einer CYN-positiven Probe waren verschiedene Arten der

---

Gattung *Anabaena*, darunter auch *A. bergii*, die einzigen Nostocales. Somit konnte durch unsere Untersuchungen *Anabaena* als CYN-produzierende Gattung für Europa bestätigt werden. Welche Arten dies sind, muss jedoch anhand von weiteren Isolaten geprüft werden. Die von Spooft et al. (2006) als CYN-Produzent in finnischen Gewässern identifizierte *Anabaena lapponica* kam im Untersuchungsgebiet jedoch nicht vor.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine verlässliche Prognose der CYN-Konzentration derzeit auch nicht anhand der Cyanobakterienzusammensetzung möglich ist. Sogar die Empfehlung, blaualgendominierte Gewässer zu meiden, um einer Belastung durch CYN zu entgehen, führt nicht in jedem Fall zum Erfolg wie die folgenden Beispiele verdeutlichen sollen: Im Vielitzsee konnten nur ganz geringe Mengen von CYN nachgewiesen werden, obwohl das Phytoplankton offensichtlich durch Cyanobakterien dominiert war (Abb. 33), im Großen Plessower See wurden dagegen CYN-Konzentrationen im Bereich des Grenzwertes gemessen, obwohl Cyanobakterien nur eine untergeordnete Rolle in der Phytoplanktonzusammensetzung spielten und der See mit über 2 m die höchste mittlere Sichttiefe aller untersuchten Seen aufwies (Tab. 4).

Daher ist es wichtig, die bisher ungeklärte Variabilität der CYN-Konzentrationen aufzuklären, wobei verschiedene Ursachen in Betracht kommen, die hier abschließend kurz diskutiert werden und die es in zukünftigen Untersuchungen zu klären gilt:

- Es ist möglich, dass in einem Gewässer verschiedene Arten CYN produzieren. Wie oben gezeigt, sind jedoch nicht alle CYN-produzierenden Arten identifiziert. Von den oben diskutierten potentiellen Produzenten müssen daher weitere Stämme isoliert und analysiert werden.
- Mit Problemen behaftet sind außerdem sowohl die taxonomische Zuordnung von Stämmen als auch die Unterscheidung von Arten bei der Biovolumenbestimmung, weil sich nicht alle Arten mikroskopisch anhand ihrer morphologischen Kriterien unterscheiden lassen (siehe Kap. 5 und 8). Beispielsweise ist es nicht immer möglich, *A. flos-aquae* und *A. gracile* zu unterscheiden, was bei einem Vergleich von Abbildung 27 und 37 augenscheinlich wird. Kulturstämme tendieren außerdem dazu, ihre äußere Form zu verändern (vgl. Kap. 8). Durch molekularbiologische Studien muss daher die taxonomische Zuordnung weiter aufgeklärt werden und Methoden entwickelt werden, mit denen einzelne Arten gezielt quantifiziert werden können.
- Des Weiteren können innerhalb von Populationen sowohl toxinproduzierende als auch nicht-produzierende Geno- bzw. Chemotypen vorkommen. Für andere Arten und Toxine wurde dies bereits belegt. Beispielsweise kommen in *P. agardhii*-Populationen sowohl Microcystin-produzierende als auch nicht-

produzierende Genotypen nebeneinander vor (z.B. Mbedi et al. 2005, Kurmayer and Gumpenberger 2006). Über die Variabilität der toxinproduzierenden Genotypen ist dagegen weniger bekannt. Im Fall des CYN deuten die Ergebnisse aus Kapitel 8 bereits darauf hin, dass der Anteil der CYN-Produzenten in Populationen sehr gering ist, da nur 4 von 240 isolierten Stämmen CYN produzierten. Mikroskopisch kann man nicht zwischen den Genotypen unterscheiden, daher ist es auch hier wichtig, molekularbiologische Nachweismethoden weiter zu entwickeln.

- Schließlich ist die Regulation der CYN Produktion nicht hinreichend aufgeklärt; für *Aphanizomenon*-Arten wurde dies bisher nicht untersucht. Die Variabilität der CYN-Konzentration in Abhängigkeit von Regulationsgrößen kann daher derzeit nicht abgeschätzt werden.<sup>5</sup>

---

<sup>5</sup> Zu diesem Themenkomplex sind folgende weiterführende Publikationen aus dem Projekt hervorgegangen: Rücker et al. (eingereicht), Wiedner et al. (eingereicht)

## 11. Gefährdungspotenzial, Empfehlungen und Ausblick

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie lässt sich für Gewässer des Untersuchungsgebietes eine erste Einschätzung des Gefährdungspotenzials ableiten und folgender Untersuchungsbedarf formulieren:

### Gefährdungspotenzial durch CYN

CYN trat mit großer Wahrscheinlichkeit bereits seit Jahrzehnten auf, weil es von mindestens einer weit verbreiteten einheimischen Art produziert wird (s.u.). Daher ist zu vermuten, dass CYN sogar als eine Ursache von bislang ungeklärten Toxizitäten durch Cyanobakterien in Frage kommt.

Zur vorläufigen toxikologischen Bewertung der derzeitigen CYN-Konzentrationen kann der Grenzwertvorschlag von Humpage und Falconer (2003) von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  herangezogen werden.

#### Grundsätzliches zum Grenzwert:

Für die Bewertung von Schadstoffbefunden in Konzentrationsbereichen bis zum 10fachen Grenzwert müssen die Extrapolations- und Unsicherheitsfaktoren beachtet werden, auf denen die Grenzwertableitung beruht: In aller Regel wird ein Abstand von einem Faktor<sup>6</sup> 100 zu der höchsten Dosis gesetzt, die im mehrwöchigen Tierversuch keine nachweisbaren Effekte hatte. Hinzu kommt beim Microcystin wie auch beim Vorschlag von Humpage und Falconer für CYN ein Faktor von 10 für die Extrapolation vom Tierversuchsergebnis, das nur aus einem Teil des Lebenszyklus gewonnen wurde, auf die lebenslängliche Exposition. Die Gesamtbewertung des Gesundheitsrisikos durch Grenzwertüberschreitungen um den Faktor 10 ist daher auf dem Hintergrund von Extrapolationen und Unsicherheiten zu sehen, die sich zu einem Faktor von 1000 multiplizieren.

Diese Betrachtung spielt in der Trinkwasserhygiene zunehmend im Rahmen der Festlegung von „Maßnahmewerte“ für Schadstoffe eine Rolle. Da Trinkwasser-Grenzwerte für eine lebenslänglich tolerierbare Exposition abgeleitet werden, sind sie – wie oben ausgeführt – ggf. bis zu 10-fach niedriger, als für eine Exposition nur über einige Wochen hinweg erforderlich wäre. Maßnahmewerte können daher entsprechend höher liegen. Sie werden benötigt um abzuwägen, ob durch einen Schadstoff belastetes Trinkwasser akut gesundheitsgefährdend ist und Gegenmaßnahmen unmittelbar getroffen werden müssen (im Extremfall die Unterbrechung der Versorgung). Sofern eine vorübergehende zeitweilige Grenzwertüberschreitung unter dem Maßnahmewert bleibt und die betroffene Bevölkerung informiert wird, kann sie in manchen Situationen toleriert werden, sofern ein Sanierungsplan vorliegt und umgesetzt wird. Dies dient der Bündelung

---

<sup>6</sup> als Produkt von einem Faktor 10 für die Extrapolation von Tier auf Mensch und einem Faktor 10 für unterschiedliche Empfindlichkeiten von Individuen innerhalb einer Population.

der Kräfte zur Lösung des jeweiligen Problems an seiner Ursache (z.B. Eutrophierungsminderung anstelle von Aufrüsten der Trinkwasseraufbereitung). Maßnahmewerte werden spezifisch für jeden Stoff einzeln unter Betrachtung seiner Wirkungsweise abgeleitet, und für CYN ist eine solche Ableitung noch nicht erfolgt.

Der vorgeschlagene Grenzwert von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  wurde in 18 Fällen überschritten. Derzeit tritt CYN in der Untersuchungsregion genauso häufig und in vergleichbaren Konzentrationsbereichen auf wie das gut untersuchte Microcystin. Wie unten erörtert, ist außerdem mit einer Zunahme der Verbreitung und Konzentrationen zu rechnen. Dies weist darauf hin, dass in spezifischen Situationen mit einer Gefährdung durch CYN gerechnet werden sollte.

Aufgrund dieser Befunde wird empfohlen, CYN in die Gefährdungsanalyse für Trinkwasserversorgungen und für Badegewässer aufzunehmen. Erfahrungen, die am Beispiel des Microcystins zu Überwachung, Risikobewertung und Toxinelemination gewonnen wurden, können jedoch nicht unmittelbar auf CYN übertragen werden, da wesentlicher wissenschaftlicher Klärungsbedarf in folgenden Punkten besteht:

1. CYN tritt (anders als Microcystin) oftmals in gelöster Form auf und birgt somit das Risiko eines Durchbruchs ins Trinkwasser, weil bei der Wasseraufbereitung durch einfache Verfahren der Partikelentfernung (Flockung und Filtration) nur die zellgebundene partikuläre CYN-Fraktion eliminiert wird, aber nicht die gelöste CYN-Fraktion. Möglicherweise verläuft der mikrobielle Abbau langsamer als beim Microcystin, das häufig innerhalb weniger Tage abgebaut wird. Kenntnisse zur Persistenz und zum biologischen CYN-Abbau sind daher insbesondere für die Bewertung des Risikos eines CYN-Durchbruchs in das Trinkwasser notwendig.
2. Die Hauptproduzenten und ihre Entwicklungsbedingungen sind nicht eindeutig bekannt. Als CYN-Produzent konnte zwar *Aphanizomenon flos-aquae* sicher identifiziert werden, sie ist jedoch nicht der Hauptverursacher der CYN-Vorkommen. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit die ebenfalls heimische Art *A. gracile*. Der endgültige Nachweis konnte jedoch noch nicht erbracht werden. Darüber hinaus müssen weitere Arten als potenzielle CYN-Produzenten betrachtet werden. Diese müssen ermittelt und geeignete Möglichkeiten ihrer Detektion erarbeitet werden. Dabei gilt es, die Regulation des Vorkommens der Produzenten weiter aufzuklären, worauf im folgenden Abschnitt im Zusammenhang mit der Populationsdynamik von *Cylindrospermopsis raciborskii* weiter eingegangen wird.

### **Gefährdungspotenzial durch *C. raciborskii***

*Cylindrospermopsis raciborskii* ist weit verbreitet und tritt mit relevanten Biomassen auf. Obwohl *C. raciborskii* als Hauptverursacher der CYN-Vorkommen

ausgeschlossen wurde, kann für diese Art aus drei Gründen keine „Entwarnung“ gegeben werden:

1. *Gefährdungspotenzial*: Für *C.-raciborskii*-Isolate wurde in einem Vorläuferprojekt eine deutliche, nicht durch CYN bedingte Toxizität festgestellt. Sie stellt damit ein bisher nicht abschätzbares Risiko für den Menschen dar. Folglich sind Strukturaufklärung des Toxins sowie umfangreichere Toxizitätstests erforderlich.
2. *Aus ökologischen Gesichtspunkten*: Als Folge der Invasion von *C. raciborskii* muss mit Veränderungen in den Gewässerökosystemen gerechnet werden. Vorrangig betrifft dies die Biodiversität, indem heimische Arten verdrängt werden. Nachfolgend sind auch relevante Veränderungen von biotischen Interaktionen und anderen Prozessen nicht auszuschließen.
3. *Gewässermanagement*: Maßnahmen des Gewässermanagements basieren auf Kenntnissen der (biotischen) Besiedlungsmuster und Funktionsweise der Gewässer (s.o.). Wenn sich diese verändern, müssen auch Maßnahmen zur Gewässersanierung und -bewirtschaftung angepasst werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass zur Vorhersage von Effekten der Trophieminderung bedeutend weniger Forschungsergebnisse existieren als zur Eutrophierung, „what Vollenweider could'nt tell us“ (Reynolds 1992).

### **Prognose zur Entwicklung von Cyanobakterien und Toxinorkommen**

Aus den vorliegenden Analysen zur Populationsdynamik von *C. raciborskii* resultieren grundlegende neue Einblicke bezüglich der Regulation einer tropischen Art in einer gemäßigten Klimaregion sowie zu den Ursachen ihrer Ausbreitung und ihrer weiteren Entwicklung.

Die Etablierung der Populationen wurde durch klimatische Veränderungen (früherer Anstieg der Wassertemperatur im Jahresverlauf) begünstigt, weil ihr Lebenszyklus damit in eine Periode mit besseren Wachstumsbedingungen verschoben wurde. Setzt sich der Trend der klimatischen Veränderungen fort, dann ist mit einer Zunahme der Populationsgröße zu rechnen. Entgegen bisheriger Auffassungen erwies sich das Wachstum in der vegetativen Phase nicht durch Temperatur, sondern durch Licht limitiert. Dies gilt es bei der Sanierung von Gewässern zu berücksichtigen, da eine Verringerung der Trophie immer mit einer Erhöhung der Transparenz und damit der Lichtintensität in den Gewässern verbunden ist. Trophieminderung bedeutet eine Reduktion nicht nur der Phosphorkonzentrationen, sondern häufig auch eine Minderung der Stickstoffkonzentrationen. Dadurch kann *C. raciborskii* als stickstofffixierende Art einen Konkurrenzvorteil erlangen und sich gegenüber anderen Phytoplanktern durchsetzen.

---

Im Fall fortschreitender klimatischer Erwärmung ist mit einer Zunahme von *C. raciborskii*-Populationen zu rechnen und mit großer Wahrscheinlichkeit auch mit einer weiteren Ausbreitung der Art innerhalb der Region und weiter nördlich. Das Auftreten von zwei weiteren Neo-Cyanobakterien (ebenfalls aus der Ordnung Nostocales, deren Lebenszyklus mit der Keimung von Dauerzellen beginnt und die Stickstoff fixieren können) in unseren Gewässern deutet an, dass generell mit einer Verschiebung der nördlichen Verbreitungsgrenzen von Arten zu rechnen ist. Dabei gilt es jedoch zu prüfen, ob die Ausbreitungsursachen hier die gleichen wie bei *C. raciborskii* sind.

Darüber hinaus muss man davon ausgehen, dass die Regulationsmechanismen der Populationsdynamik, die hier für *C. raciborskii* erarbeitet wurden, auch auf heimische nostocale Arten zutreffen. Dies bedeutet, dass in Zukunft infolge klimatischer Veränderungen – besonders in Gewässern mit verminderter Trophie – generell eine Zunahme nostocaler Arten zu erwarten ist, wofür erste Anzeichen bereits gefunden wurden. Hiervon sind auch die *Aphanizomenon*-Arten betroffen, die CYN produzieren. Daher wird mit einer Zunahme der CYN Konzentrationen in unseren Gewässern gerechnet.

Eine Verschiebung in der Artenzusammensetzung der Cyanobakterien bewirkt letztlich auch eine Verschiebung in den Toxinvorkommen. Aus der Sicht einer Gesundheitsgefährdung ist dabei zu beachten, dass nostocale Arten neben CYN auch insbesondere Neurotoxine, wie Anatoxin und Saxitoxin, produzieren können.

Abschließend wird darauf hingewiesen, dass sich die im CYLIN Projekt analysierte Situation und Entwicklung zum Vorkommen toxischer Cyanobakterien in Gewässern der Region Berlin-Brandenburg auch auf vergleichbare Gewässertypen der gesamten gemäßigten Klimazone projizieren lässt.

## 12. Danksagung

Zum Erfolg des Projektes haben zahlreiche nationale und internationale externe Kooperationspartner beigetragen, bei denen wir uns an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchten:

Für hilfreiche Anmerkungen bezüglich der taxonomischen Zuordnung von *Anabaena bergii* danken wir Prof. Dr. Jiří Komárek (Institut of Botany, Czech Academy of Sciences, Třeboň, Czech Republic) und Dr. Larelle Fabbro (Centre for Environmental Management, Central Queensland University, Rockhampton, Australien).

Kulturstämme verschiedener CYN-produzierender und nicht-produzierender Cyanobakterien zur Etablierung der molekularbiologischen Methode erhielten wir von Prof. Dr. Aaron Kaplan und Gali Shalev-Alon (Dept. Plant and Environmental Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Israel), Dr. Martin Saker (Ecotoxicology Laboratory, Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal), Dr. Julianne Dyle (Institute of Marine Sciences, University of North Carolina, USA) und Dr. Andrew Chapman (GreenWater Laboratories, Palatka, Florida, USA). DNA-Extrakte von CYN-Produzenten wurden von Dr. Chris Saints und Dr. Paul Rasmussen (CRC for Water Quality and Treatment, Australian Water Quality Centre, Bolivar, Australien) sowie von Prof. Antonio Quesada (Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spanien) zur Verfügung gestellt.

Die Beprobung der Boddengewässer wurde eigens für dieses Projekt durch Prof. Dr. Ulf Karsten, Dr. Rhena Schumann, Dr. Henning Baudler und Jana Woelfel (Institut für Biowissenschaften, Angewandte Ökologie, Universität Rostock) ermöglicht und durchgeführt. Proben aus diversen Berliner Gewässern stellte Dr. Antje Köhler (Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT), Berlin) zur Verfügung. Bisher unveröffentlichte Daten zur Verbreitung von *C. raciborskii* in 16 Gewässern aus den Jahren 2002-2004 erhielten wir freundlicherweise von Dr. Lothar Täuscher (Institut für angewandte Gewässerökologie GmbH, Seddiner See).

Darüber hinaus möchten wir uns bei einer Vielzahl von Kollegen und Kolleginnen aus den eigenen Instituten (IGB, BTU, UBA) für ihre Mithilfe bedanken:

Die Beprobung einer derart großen Anzahl von Gewässern war nur durch die tatkräftige Unterstützung von Ingo Henschke, Wolfgang Terlinden, Michael Sachtleben und Roman Degebrodt möglich. Die Analyse der Nährstoff- und Chlorophyll a-Konzentrationen unzähliger Proben bewerkstelligten Gudrun Lippert, Ute Abel, Tina Hanke, Johanna Dalchow und Uta Mallok. Die qualitative Analyse der Cyanobakterien wurde von Beate Müller, Andrea Launhardt und Tina Endrulat

unterstützt. Ein Teil der Cyanobakterien Stämme wurde von Martin Beck isoliert. Bei der Kultivierung von Cyanobakterienstämmen und den molekularbiologischen Arbeiten war Monika Degebrot eine große Hilfe. Unser herzlicher Dank an Christa Woodgett und Gabriele Gericke für die Unterstützung bei der CYN-Analytik. Unveröffentlichte Daten zum Vorkommen von *C. raciborskii* wurden von Helgard Täuscher und Ute Mischke beigesteuert. Die Organisation der Beprobung einiger Berliner Gewässer wurde von Jan Köhler unterstützt. Die Verbreitungskarten wurden von Mike Hemm erstellt.

Schließlich möchten wir uns bei dem KWB und Veolia Water bedanken, die diese Studie in vollem Umfang finanziell gefördert haben.

## 13. Literatur

### Liste von Publikationen aus dem CYLIN Projekt

- Fastner, J., Rücker, J., Stüken, A., Preußel, K., Nixdorf, B., Chorus, I., Köhler, A., Wiedner, C. 2007. Occurrence of the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin in Germany. *Environmental Toxicology* 22 (1): 26-32.
- Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Wiedner, C. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates (Nostocales, Cyanobacteria) from Africa and Europe. Eingereicht bei Harmful Algae.
- Preußel, K., Stüken, A., Wiedner, C., Chorus, I., Fastner, J. 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 47: 156-162.
- Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin (CYN) in 21 *Aphanizomenon* dominated lakes of North East Germany. Eingereicht bei Toxicon.
- Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Wiedner, C. 2006. Distribution and Regulation of the originally tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* at its northern limits. In: Rabitsch, W., Klingenstein, F., Essl, F. (Hrsg.): BfN-Skripten 184, Bundesamt für Naturschutz, Bonn: S.229.
- Stüken, A., Preußel, K., Beck, M., Quesada, A., Sukenik, A., Dadheech, P., Wiedner, C. Phylogenetic position of the three cyanobacteria species *Anabaena bergii*, *Aphanizomenon ovalisporum* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (order Nostocales). Eingereicht bei Int. J. Syst. Evol. Microbiol.
- Stüken, A., Rücker, J., Endrulat, T., Preussel, K., Hemm, M., Nixdorf, B., Karsten, U., Wiedner, C. 2006. Distribution of three alien cyanobacterial species (Nostocales) in Northeast Germany: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii* and *Aphanizomenon aphanizomenoides*. *Phycologia* 45: 696–703.
- Tingwey, E.I., Rücker, J., Launhardt, A., Wiedner, C. Nixdorf, B. 2007. Germination of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon* species under natural and experimental conditions. Deutsche Gesellschaft für Limnologie. Tagungsbericht 2006. Im Druck.
- Wiedner, C., Rücker, J., Brüggemann, R., Nixdorf, B. 2007. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia*. Online first: DOI 10.1007/s00442-007-0683-5.
- Wiedner, C., Rücker, J., Stüken, A., Fastner, J., Chorus, I., Nixdorf, B. Seasonal dynamics of cylindrospermopsin and cyanobacteria in two German lakes. Eingereicht bei FEMS Microbiol.

## Zitierte Literatur

- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A. 1997. Identification of cylindrospermopsin in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret. Israel J. Phycol. 33: 613-616.
- Bazzichelli, G.B., Abdelahad, N. 1994. Caractérisation morphométrique et statistique de deux populations d' *Aphanizomenon* du groupe *Aphanizomenon ovalisporum* FORTI des lacs de Nemi et Albano (Italie). Algological Studies 73: 1-21.
- Behrendt, H., Nixdorf, B. 1993. The carbon balance of phytoplankton production and loss processes based on in situ measurements in a shallow lake. Int. Rev. Ges. Hydrobiol. 78: 439-458.
- Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Biré, R., Krysz, S., Fontaine, J.J. 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by an French *C. raciborskii* strain. Environ. Toxicol. 18: 176-186.
- Bourke, A.T.C., Hawes R.B., Neilson A., Stallman, N.D. 1983. An outbreak of the hepatoenteritis (the Palm island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. Toxicon Suppl. 3: 45-48.
- Bouvy, M., Molica, R., De Oliveira, S., Marinho, M., Beker, B. 1999. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northern Brazil. Aqua Microbial. Ecol. 20: 285-297.
- Branco, C.W., Senna, P.A.C. 1994. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in Paranoá Reservoir, Brasil. Algological Studies 75: 85-96.
- Briand, J.F., Leboulanger, C., Humbert, J.F., Bernard, C., Dufour, P. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming? Journal of Phycology 40: 231- 238.
- Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Lloberas, C., Humbert, J.F., Couté, A., Bernard, C. 2002a. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. Water Research 36: 3183-3192.
- Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Llobéras, C. Bernard, C. 2002b. A perennial bloom of *Planktothrix agardhii* (Cyanobacterial) in a shallow eutrophic French lake: limnological and microcystin production studies. Arch. Hydrobiol. 153: 605-622.
- Burgoyne, D.L., Hemscheidt, T.K., Moore, R.E. , Runnegar, M.T.C. 2000. Biosynthesis of cylindrospermopsin. J. Org. Chem. 65: 152-156.
- Burns, J., Williams, C., Chapman, A. 2002. Cyanobacteria and their toxins in Florida surface waters. In: Johnson, D., Harbison, R.D. (Hrsg.) Proceedings of Health effects of exposure to cyanobacteria toxins – State of science, Saratoga, Florida, August 13-14, 200: 16-21.

- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Persp.* 109: 663-668.
- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R., 1999. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environ. Toxicol.* 14: 155-165.
- Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K., Watanabe, M.M. 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 345-355.
- Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E. 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution and manipulation. *J. Bacteriol.* 185: 564-572.
- Couté, A., Leitao, M., Martin, C. 1997. Première observation du genre *Cylindrospermopsis* (Cyanophyceae, Nostocales) en France. *Cyptogaie, Algol* 18: 57-70.
- Czensny R. 1938. Die Oscillatorienkrankung unserer Seen, Biologie und Chemismus einiger märkischer Seen. *Vom Wasser* 8: 36-57.
- DEV (Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung). 1976-1998. Schlammuntersuchung. Verlag Chemie, Weinheim, D11, E5, D9, C9, E1, H7
- Dokulil, M.T., Mayer, J. 1996. Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis - Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria. *Algological Studies* 83: 179-195.
- Edwards, M., Richardson, A.J. 2004. Impact of climate change on marine pelagic phenology and trophic mismatch. *Nature* 40: 881-884.
- EU (Europäische 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. Amtsblatt der EU vom 22.12.2000 (L327/1).
- Fabro, L.D., Duivenvoorden, L.J. 1996. Profile of a bloom of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju in Fitzroy river in tropical central Queensland. *Mar. Freshwater Res.* 47: 685-694.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R. 2001. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 16(2): 192-195.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 21: 299-304.
- Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K., Chorus, I. 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary

- assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42: 313-321.
- Fastner, J., Neumann, U., Wirsing, B., Weckesser, J., Wiedner, C., Nixdorf, B., Chorus, I. 1999. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh waterbodies. *Environ. Tox.* 14:13-22.
- Fergusson, K.M., Saint, C.P. 2000. Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4145-4148.
- Fergusson, K.M., Saint, C.P. 2003. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environ. Toxicol.* 18: 120-125.
- Froschio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R. 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ. Toxicol.* 18(4): 243-251.
- Geitler, L. 1932. Cyanophyceae. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, pp. 1-1196. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, Germany.
- Gerten, D., Adrian, R. 2000. Climate-driven changes in spring plankton dynamics and the sensitivity of shallow polymictic lakes to the North Atlantic Oscillation. *Limnol Oceanogr* 45: 1058-1066.
- Hamilton, P.B., Ley, L.M., Dean, S., Pick, F.R. 2005. The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprokaryote new to Canada. *Phycologia* 44: 17-25.
- Haney, J.F. 1987. Field studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 21: 467-475.
- Harada, K.I., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Watanabe, M., Terao, K. 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32: 73-84.
- Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R., Falconer, I.R. 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35: 341-346.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Env. Microbiol.* 50: 1292-1295.
- Hemm, M., Jöhnk, K.D. 2004: Datenbank stehender Gewässer in Deutschland - Beschreibung und deren Anwendungen. In: J. Rücker & B. Nixdorf (Hrsg.) Gewässerreport Nr. 8. BTUC-AR 3/2004 - Eigenverlag der BTU Cottbus: 145-159.
- Hindák, F. 2000. Morphological variation of four planktic nostocalean cyanophytes - members of the genus *Aphanizomenon* or *Anabaena*? *Hydrobiologia* 438: 107-116.

- Hindák, F., 1992. Several interesting planktic cyanophytes. *Algological Studies* 66: 1-15.
- Hindák, F., Hindáková, A. 2003. Diversity of cyanobacteria and algae of urban gravel pit lakes in Bratislava, Slovakia: a survey. *Hydrobiologia* 506 (1-3): 155-162.
- Hiripi, L., Nagy, L., Kalmár, T., Kovács, A., Vörös, L. 1998. Insect (*Locusta migratoria migratorioides*) test monitoring the toxicity of cyanobacteria. *Neurotoxicology* 19: 605-608.
- Hoeger, S.J., Shaw, G., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R., 2004. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon* 43: 639-649.
- Hoffmann, L. 1996. Geographic distribution of freshwater blue-green algae. *Hydrobiologia* 336: 33-40.
- Horecká, M., Komárek, J. 1979. Taxonomic position of three planctonic blue-green algae from the genera *Aphanizomenon* and *Cylindrospermopsis*. *Preslia* 51: 289-312.
- Huber-Pestalozzi, G. 1938. Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 1. Teil: Blaualgen, Bakterien, Pilze. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart: 342 S.
- Humpage, A.R., Falconer, I.R. 2003. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ. Toxicol.* 18: 94-103.
- Humpage, A.R., Fontaine, F., Froscio, S., Burcham, P., Falconer, I.R. 2005. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 68(9): 739-753.
- Janse, I., Kardinal, W.E.A., Meima, M., Fastner, J., Visser, P.M., Zwart, G. 2004. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3979-3987.
- Kann, J., Welch, E.B. 2005. Wind control on water quality in shallow, hypereutrophic Upper Klamath Lake, Oregon. *Lake and Reservoir Management* 21 (2): 149-158.
- Kirk, J.T.O. 1994. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press: 509 S.
- Komárek, J., Ettl, H. 1958. Algologische Studien: Die Taxonomische Revision der Planktischen Blaualgen der Tschechoslowakei. *Ceskoslovenska Akademie Ved, Prague.* 358 S.
- Krienitz, L., Hegewald, E. 1996. Über das Vorkommen von wärmeliebenden Blaualgenarten in einem norddeutschen See. *Lauterbornia* 26: 55-63.
- Kurmayer, R., Gumpenberger, M., 2006. Diversity of microcystin genotypes among populations of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* and *Planktothrix agardhii*. *Molecular Ecology* 15 (12): 3849-3861.

- LAWA (Länderarbeitsgemeinschaft Wasser) (Hrsg.) 1999. Gewässerbewertung - stehende Gewässer - Vorläufige Richtlinie für eine Erstbewertung von natürlichen entstandenen Seen nach trophischen Kriterien. - Kulturbuch-Verlag, Berlin: 74 S.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y.D., Watanabe, M.M. 2001a. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 37: 1121-1126.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Mahakhant, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, W., Kaya, K., Watanabe, M.M. 2001b. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon* 39: 973-980.
- Lippert, G., Herold, I., Heckemann, H.J., Stadler, B. 2004. Erfahrungen und Ergebnisse zur Bestimmung von Gesamtphosphor mit Festphasenanreicherung im Bereich von 10 bis 200 µg l<sup>-1</sup> in Gewässern mit der FIA-LAB II (MLE GmbH Radebeul). In: J. Rücker & B. Nixdorf (Hrsg.) Gewässerreport Nr. 8. BTUC-AR 3/2004 - Eigenverlag der BTU Cottbus: 133-144.
- Manti, G., Mattei, D., Messineo, V., Melchiorre, S., Bogialli, S., Sechi, N., Casiddu, P., Luglio, L., Di Brizio, M., Bruno, M. 2005. First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algal News* 28: 8-9.
- Mbedi, S., Welker, M., Fastner, J., Wiedner, C. 2005. Variability in the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiol. Lett.* 245: 299-306.
- McGregor, G.B., Fabbrom, L.D. 2000. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 5: 195-205.
- Mischke, U. 2003. Cyanobacteria associations in shallow polytrophic lakes: influence of environmental factors. *Acta Oecologica* 24: 11-23.
- Mischke, U., 2001. Der Neophyt *Cylindrospermopsis raciborskii*: Eine Blaualge aus tropischen Regionen in Gewässern des Spree-Dahme-Einzugsgebietes. In Krumbeck, H., Mischke, U. (Hrsg.), Gewässerreport (Nr. 6). BTUC-AR: 39-62.
- Moisander, P.H., McClinton III, E., Pearl, H.W. 2002. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbial Ecology* 43: 432-442.
- Nixdorf, B., Hemm, M., Hoffmann, A., Richter, P., 2004: Dokumentation von Zustand und Entwicklung der wichtigsten Seen Deutschlands. Umweltbundesamt. UBA-Texte Forschungsbericht 299 24 274, UBA-FB 000511: 1-1056.
- Nixdorf, B., Mischke, U., Rücker, J. 2003. Phytoplankton assemblages and steady state in deep and shallow eutrophic lakes - an approach to differentiate the habitat properties of Oscillatoriales. *Hydrobiologia* 502: 111-121.

- Nixdorf, B., Rücker, J., Deneke, R., Zippel, P. 1995. Limnologische Zustandsanalyse von Standgewässern im Scharmützelseegebiet, Teil I. BTUC-AR 1/95, Eigenverlag der BTU Cottbus: 52 S.
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. J. Am. Chem. Soc. 114: 7941-7942.
- Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. Archiv für Hydrobiologie, Supplement 107: 563-593.
- Padisak, J., Reynolds, C.S. 1998. Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. Hydrobiologia 384: 41-53.
- Preußel, K., Stüken, A., Wiedner, C., Chorus, I., Fastner, J. 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. Toxicon. 47: 156-162.
- Quesada, A., Moreno, E., Carrasco, D., Paniagua, T., Wormer, L., Hoyos, C., Sukenik, A. 2006. Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. European Journal of Phycology 41: 39-45.
- Reynolds, C.S. 1992. Eutrophication and the management of planktonic algae: What Vollenweider couldn't tell us. In Sutcliffe, D.W., Jones J.G. (Hrsg), Research and application to water supply. Freshwater Biol. Ass.
- Riley, G.A. 1957. Phytoplankton in the north central Sargasso Sea 1950-1952. Limnol. Oceanogr. 2: 252-272.
- Rott, E. 1981. Some results from phytoplankton counting intercalibration. Schweiz. Z. Hydrol. 43: 34-62.
- Rott, E., Salmaso, N., Hoehn, E., 2007: Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates – an easy task or a Gordian knot? Hydrobiologia 578:141-146.
- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B.L., Buikema, W., Haselkorn, R., Sivonen, K. 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. Appl. Environ. Microb. 70: 686-692.
- Rücker, J., Wiedner, C., Zippel, P. 1997. Factors controlling the dominance of *Planktothrix agardhii* and *Limnothrix redekei* in eutrophic shallow lakes. Hydrobiologia 342/343: 107-115.
- Saker, M.L., Eaglesham, G.K., 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Toxicon 37: 1065-1077.
- Saker, M.L., Griffith, D.J. 2000. Effects of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. Phycologia 39: 349-354.

- Saker, M.L., Neilan, B.A. 2001. Varied diazotrophies, morphologies and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 1839-1845.
- Saker, M.L., Nogueira, I.C.G., Vasconcelos, C.M., Neilan, B.A., Eaglesham, G.K., Pereira, P. 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol Environ Safety* 55: 243-250.
- Schäperclaus, W. 1941. Seenverschlechterung. *Z. Fischerei XXXVIII*: 345-375.
- Schembri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P. 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 16: 413-421.
- Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W., Shaw, G. 2007: First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 6: 73-80.
- Shalev-Alon, G., Sukenik, A., Livnah, O., Schwarz, R., Kaplan, A. 2002. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 83-87.
- Shaw, G.R., Seawright, A.A., Moore, M.A., Lam, P.K.S. 2000. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: Evaluation of its toxicological activity. *Therapeutic Drug Monitoring* 22: 89-92.
- Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Moore M.R. 1999. Blooms of cylindrospermopsin containing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ. Toxicol.* 14: 167-177.
- Skuja, H. 1938. Süßwasseralgen aus Griechenland und Kleinasien. *Hedwigia* 77: 15-70.
- Souza, R.C.R., Carvalho, M.C., Truzzi, A.C. 1998. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings reservoir, Brazil. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13: 73-81.
- Spoof, L., Berg, K.A., Rapala, J., Lahti, K., Lepistö, L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Meriluoto, J. 2006. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from boreal environment (Finland). *Environ. Toxicol.* 21: 552-560.
- Straile, D. 2000. Meteorological forcing of plankton dynamics in a large and deep continental European lake. *Oecologia* 122: 44-50.
- Täuscher, L. 2003a. Qualitative und quantitative Untersuchungen des Phytoplanktons in Seen des Dahmegebietes im Land Brandenburg als Beitrag zu Grundlagen der Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union. Projektbericht des Seenprojektes Brandenburg e.V., Seddin, Germany.

- Täuscher, L. 2003b. Phytoplankton. In: Möller, D., Mietz, O., Täuscher, L., Henker, H. (Hrsg.). Güterfelder Haussee. Limnologischer Abschlussbericht für das Jahr 2002. Institut für angewandte Gewässerökologie, Seddin, Germany.
- Täuscher, L. 2004a. Phytoplankton. In: Meisel, J., Täuscher, L., Kabus, T., Henker, H., Vedder, F. (Hrsg.). Ökologische und limnologische Untersuchungen zur wissenschaftlichen Vorbereitung der Umsetzung der EU-WRRL an Seen des Landes Brandenburg im Jahr 2003. Projektbericht des Seenprojektes Brandenburg e.V., Seddin, Germany.
- Täuscher, L. 2004b. Gutachten für das Gesundheitsamt Oberhavel, Oranienburg, Germany.
- Teubner, K., Morscheid, H., Tolotti, M., Greisberger, S., Morscheid, H., Kucklentz, V. 2004. Bedingungen für Auftreten toxinbildender Blaualgen (Cyanobakterien) in bayrischen Seen und anderen stehenden Gewässern. In: Materialien Nr. 113. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft (Hrsg.), München, Germany.
- Tillet, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., Neilan, B.A. 2000. Structural organisation of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. Chem. Biol. 7: 753-764.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 9: 1-38.
- Walther, G.-R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J.-M., Hoeg-Guldenberg, O., Bairlein, F. 2002. Ecological responses to recent climate change. Nature 416: 389-395.
- Weithoff, G. 1998. Steuermechanismen der Phytoplanktondynamik im flachen eutrophen Flakensee. Dissertation, 51 S. Humboldt-Universität, Berlin.
- Welker, M., Bickel, H., Fastner, J. 2002. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - opportunities and limits. Water Res. 36: 4659-4663.
- Welker, M., von Döhren, H., Täuscher, H., Steinberg, C.E.W., Erhard, M. 2003. Toxic *Microcystis* in shallow lake Müggelsee (Germany) - dynamics, distribution, diversity. Arch. Hydrobiol. 157: 227-248.
- Weyhenmeyer, G.A., Blenckner, T., Petterson, K. 1999. Changes of the plankton spring outburst related to the North Atlantic Oscillation. Limnol. Oceanogr. 44: 1788-1792.
- Wiedner, C., Nixdorf, B., 1997. Verbreitung und Steuerung der Entwicklung von toxischen und nicht-toxischen Cyanobakterien in ostbrandenburgischen Gewässern unterschiedlicher Trophie und Hydrographie im Zuge der reduzierten Belastung. WaBoLu Hefte 4/97: 17-26.
- Wiedner, C., Nixdorf, B., Heinze, R., Wirsing, B., Neumann, U., Weckesser, J. 2002. Regulation of cyanobacteria and microcystin dynamics in polymictic shallow lakes. Arch. Hydrobiol. 155: 383-400.
- Wiedner, C., Visser, P.M., Fastner, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Mur, L.R. 2003. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1475-1481.

- 
- Winder, M., Schindler, D.E. 2004. Climate change uncouples trophic interactions in an aquatic ecosystem. *Ecology* 85: 2100-2106.
- Woloszynska, J. 1912. Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit Berücksichtigung des Sawa-Planktons. *Bull. Int. Acad. Sci. Cracoviae Ser. B.* 6: 649-709.
- Wood, S.A., Stirling, D.J. 2003. First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37: 821-828.
- Wundsch, H.H. 1940. Beiträge zur Fischereibiologie märkischer Seen, VI. die Entwicklung eines besonderen Seentypus (H<sub>2</sub>S-Oscillatorien-Seen) im Flußgebiet der Spree und Havel, und seine Bedeutung für die Fischereibiologischen Bedingungen in dieser Region. *Z. Fischerei* XXXVIII: 443-648.
- Zippel, P. 1996. Phytoplankton sukzession und -dynamik in den Gewässern des Scharmützelseegebietes. In: Nixdorf, B., Kleeberg, A. (Hrsg.) *Gewässerreport (Teil II)*, BTUC-AR 2/1996 - Eigenverlag der BTU Cottbus: 44-60.

## Anhang

Liste der im Screening-Programm 2004 untersuchten Gewässer mit Angaben der geografischen Koordinaten, Seefläche, Volumen und maximalen Tiefe sowie Sichttiefen (SD) und Sestonkonzentrationen von Cylindrospermopsin (CYN). n.n. – Werte unterhalb der Nachweisgrenze.

Gewässername	Fläche (km <sup>2</sup> )	Volumen (10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup> )	Max. Tiefe (m)	SD (m)	CYN (µg/g TG)
Alter Wochowsee 52°13'15" N; 13°55'43" O	0.32	0.45	2.5	0.2	n.n.
Bikowsee bei Zechlinerhütte 53°08'50" N; 12°53'27" O	0.31		11.0	0.6	0.532
Blankensee 52°13'35" N; 13°07'06" O	2.90	3.42	3.9	0.4	n.n.
Bodtstedter Bodden 54°23'37" N; 12°37'19" O				0.4	n.n.
Bötzsee 52°34'01" N; 13°49'44" O	0.86	5.46	12.0	1.6	n.n.
Braminsee 53°08'18" N; 12°48'09" O	0.69		2.2	0.3	5.770
Breiter Luzin 53°21'25" N; 13°28'03" O	3.45	77.04	58.3	3.4	n.n.
Breitlingsee (Havel) 52°23'03" N; 12°28'45" O	5.13		4.5	0.6	n.n.
Bruchsee, ne Templin 53°08'07" N; 13°32'44" O	0.20		2.2	0.7	0.444
Buckowsee, e Schermützelsee 52°34'00" N; 14°04'13" O	0.13		11.0	2.4	n.n.
Bückwitzer See 52°52'19" N; 12°29'18" O	0.49		8.0	0.4	
Bützsee 52°49'50" N; 12°53'51" O	2.23		4.0	0.7	4.925
Dagowsee 53°09'03" N; 13°03'10" O	0.22	1.20	9.5	0.9	0.147
Dämeritzsee 52°25'22" N; 13°44'03" O	1.03	2.74	5.7	0.9	n.n.
Dobrasee 52°11'05" N; 13°52'52" O	0.24	0.86	10.0	4.2	0.151
Dolgensee bei Dolgenbrodt 52°14'59" N; 13°44'35" O	1.52	3.30	2.5	0.4	1.993
Dollgower See 53°04'32" N; 13°00'38" O	0.18		1.7	0.4	0.584
Düstersee 53°05'32" N; 13°45'28" O	0.43		9.0	2.6	2.004
Fängersee 52°35'13" N; 13°50'02" O	0.46	1.31	5.0	1.5	n.n.
Globsowsee (Altglobsower See) 53°07'41" N; 13°07'07" O	0.14		4.0	1.2	0.247

Gewässername	Fläche (km <sup>2</sup> )	Volumen (10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup> )	Max. Tiefe (m)	SD (m)	CYN (µg/g TG)
Grimnitzsee 52°58'45" N; 13°46'59" O	7.77	29.50	9.0	2.0	n.n.
Groß Schauener See 52°14'01" N; 13°53'54" O	1.46		4.5	0.4	n.n.
Große Steinlanke (Unterhavel) 52°27'03" N; 13°11'10" O	3.44	20.51	9.3		n.n.
Großer Däbersee bei Waldsiefersdorf 52°32'32" N; 14°04'50" O	0.19		16.0	1.9	3.220
Großer Glubigsee 52°11'38" N; 14°00'02" O	0.58	2.66	13.0	0.8	4.333
Großer Klobichsee 52°33'14" N; 14°07'24" O	0.47		9.5	1.4	0.362
Großer Kolpiner See 52°17'43" N; 13°59'45" O	0.22	0.45	4.6	0.6	n.n.
Großer Kossenblatter See 52°08'04" N; 14°06'02" O	1.68		3.2	0.2	n.n.
Großer Linowsee 53°06'24" N; 12°51'17" O	0.34		18.0	3.9	n.n.
Großer Moddersee bei Groß Köris 52°10'08" N; 13°39'45" O	0.29	0.26	2.0	0.4	n.n.
Großer Möggelinsee 52°08'04" N; 13°31'29" O	0.37	0.48	2.6	0.3	6.294
Großer Müggelsee 52°26'15" N; 13°38'55" O	7.67	36.52	8.9	4.1	n.n.
Großer Müllroser See 52°13'57" N; 14°25'06" O	1.27	4.34	7.0	1.5	n.n.
Großer Plessower See 52°23'01" N; 12°54'00" O	3.22	20.80	13.4	1.8	73.213
Großer Präßnicksee 53°02'13" N; 13°45'09" O	1.14		12.0	1.6	0.125
Großer Schlagenthinsee 52°31'10" N; 14°06'20" O	0.16	0.41	7.0	1.9	0.103
Großer Seddiner See 52°16'24" N; 13°01'49" O	2.18	6.62	7.2	0.6	39.565
Großer Storkower See, Nordbecken 52°15'17" N; 13°57'10" O	1.39	6.59	11.4	2.0	n.n.
Großer Storkower See, Südbecken 52°14'01" N; 13°58'47" O	2.33	8.79	8.0	1.5	0.288
Großer Tornowsee, ne Buckow 52°34'38" N; 14°06'12" O	0.09		9.6	2.3	n.n.
Großer Treppelsee 52°08'37" N; 14°27'04" O	0.71	1.60	5.6	0.4	
Großer Wannsee 52°25'43" N; 13°10'22" O	2.82	15.42	9.8	1.1	n.n.
Großer Wünsdorfer See 52°09'02" N; 13°27'55" O	1.65			0.5	1.625

## Anhang

Gewässername	Fläche (km <sup>2</sup> )	Volumen (10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup> )	Max. Tiefe (m)	SD (m)	CYN (µg/g TG)
Großer Zechliner See 53°09'26" N; 12°48'06" O	1.84	20.81	36.8	3.7	0.210
Großer Zeschsee 52°06'39" N; 13°30'52" O	0.38	1.70	15.0	4.6	13.559
Großer Zug 52°20'43" N; 13°39'24" O	0.88		2.5	0.4	0.734
Grössinsee 52°15'18" N; 13°07'49" O	0.93	1.34	2.6	0.4	n.n.
Grunewaldsee 52°28'11" N; 13°15'47" O	0.17	0.50	6.5	0.7	0.310
Gudelacksee 52°58'38" N; 12°57'21" O	4.25		25.5	2.5	2.260
Heiligensee 52°36'14" N; 13°12'55" O	0.32	1.92	9.5	1.6	28.311
Heiliger See bei Potsdam 52°24'44" N; 13°04'18" O	0.35	2.28	13.0		
Hölzener See 52°11'37" N; 13°42'33" O	1.15	9.10	12.5	1.0	0.211
Huwenowsee 52°58'10" N; 13°05'11" O	0.39		6.0	1.6	n.n.
Jabeler See 53°32'09" N; 12°33'07" O	2.44	12.90	22.6	1.1	3.913
Jürgenlanke (Unterhavel) 52°29'44" N; 13°11'51" O	2.82	10.37	6.8	0.4	n.n.
Kalksee bei Binenwalde 53°03'02" N; 12°47'43" O	0.54		21.0	1.2	9.843
Katerbower See 52°58'41" N; 12°39'27" O	0.54		2.0	2.0	n.n.
Klarer See bei Alt Temmen 53°05'48" N; 13°44'50" O	0.45		8.5	1.5	0.599
Klein Köriser See 52°10'31" N; 13°41'33" O	1.57		10.0	0.6	0.142
Kleiner Glubigsee 52°11'59" N; 14°01'03" O	0.06		4.5	0.9	3.624
Kleiner Kolpiner See 52°17'26" N; 13°59'28" O	0.09	0.11	2.0	0.3	n.n.
Kleiner Moddersee bei Groß Köris 52°10'34" N; 13°39'52" O	0.20	0.39	4.0	0.4	n.n.
Kleiner Müggelsee 52°25'47" N; 13°40'36" O	0.16		7.5	1.2	
Kleiner Zeschsee 52°07'17" N; 13°31'26" O	0.23	0.61	5.6	0.8	0.733
Kölpinsee bei Milmersdorf 53°06'32" N; 13°39'50" O	1.65		9.5	2.0	n.n.
Königsberger See 53°03'06" N; 12°25'56" O	0.46		9.0	0.4	48.908

Gewässername	Fläche (km <sup>2</sup> )	Volumen (10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup> )	Max. Tiefe (m)	SD (m)	CYN (µg/g TG)
Köthener See 52°04'50" N; 13°48'36" O	1.48		2.0	0.5	n.n.
Krossinsee 52°21'48" N; 13°40'27" O	1.61		5.5	0.4	1.349
Krumme Lanke 52°27'08" N; 13°13'59" O	0.14	0.54	6.8	2.1	
Krüpelsee (Dahme) 52°17'33" N; 13°41'26" O	1.69		4.5	0.4	3.516
Kutzingsee 52°14'14" N; 13°49'59" O	0.32	0.78	6.0	0.3	7.664
Langer See 52°14'32" N; 13°47'03" O	1.38	3.27	3.5	0.4	6.897
Langer See (Dahme) 52°24'32" N; 13°37'05" O	2.51	10.59	8.5	0.4	1.567
Lebbiner See 52°16'45" N; 13°56'26" O	0.28	0.55	4.0	0.5	7.405
Liepnitzsee 52°44'54" N; 13°30'33" O	1.15		16.5		
Lieps 53°27'07" N; 13°09'30" O	4.31	9.70	3.8	0.3	2.773
Melangsee 52°09'40" N; 13°59'18" O	0.12	0.20	2.8	0.4	5.743
Mellensee 52°10'29" N; 13°24'32" O	2.15	7.20	10.0	0.6	n.n.
Moderfitzsee bei Himmelfort 53°11'09" N; 13°14'08" O	0.59		5.5		2.514
Molchowsee 52°58'05" N; 12°49'49" O	0.47			0.9	2.389
Motzener See 52°12'54" N; 13°34'06" O	2.06	12.70	13.5	2.4	
Nehmitzsee 53°07'46" N; 12°59'12" O	1.61	9.30	18.6	0.6	n.n.
Neuendorfer See bei Sperenberg 52°07'40" N; 13°22'28" O	0.62		7.5	1.0	n.n.
Obersee 52°58'46" N; 12°26'02" O	1.63	11.80		0.4	n.n.
Oderberger See 52°51'32" N; 14°01'10" O	1.03		2.5	0.5	n.n.
Oelsener See 52°07'58" N; 14°23'53" O	1.07		2.9	0.6	
Parsteiner See 52°55'47" N; 13°59'06" O	10.03	77.00	31.0	4.3	n.n.
Pätzer Vordersee 52°14'02" N; 13°39'12" O	1.65		18.5	1.8	n.n.
Petersdorfer See 52°18'52" N; 14°04'27" O	0.24	0.45	3.8	0.4	11.803

## Anhang

Gewässername	Fläche (km <sup>2</sup> )	Volumen (10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup> )	Max. Tiefe (m)	SD (m)	CYN (µg/g TG)
Petznicksee 53°09'20" N; 13°36'54" O	0.72		2.0	0.4	2.424
Plötzensee 52°32'38" N; 13°19'49" O	0.08	0.23	6.2	1.0	9.023
Rahmer See, w Wandlitz 52°44'53" N; 13°24'36" O	0.80		4.0	1.1	19.983
Rangsdorfer See 52°17'19" N; 13°24'14" O	2.45	3.75	2.0	0.2	n.n.
Rheinsberger See 53°07'26" N; 12°52'15" O	2.62		30.0	1.0	5.154
Ribnitzer See 54°15'30" N; 12°24'24" O				0.2	n.n.
Röblinsee 53°11'06" N; 13°07'14" O	0.90		6.0	1.9	2.229
Röddelinsee 53°05'41" N; 13°26'15" O	1.83		38.5	1.4	n.n.
Roofensee 53°06'41" N; 13°02'06" O	0.57	5.12	19.1	2.5	n.n.
Ruppiner See 52°53'45" N; 12°48'31" O	8.08	66.00	23.0	0.7	4.981
Saaler Bodden 54°19'45" N; 12°26'40" O				0.3	n.n.
Scharmützelsee 52°12'45" N; 14°01'04" O	12.07	108.23	29.0	2.8	0.245
Schermützelsee 52°34'09" N; 14°03'31" O	1.35	20.98	38.0	1.9	n.n.
Schlarnsee (Hüttensee) 53°09'02" N; 12°52'31" O	0.69		8.0	0.7	6.634
Schmaler Luzin 53°19'17" N; 13°26'17" O	1.45	20.98	33.5	3.0	n.n.
Schmöldesee 52°12'14" N; 13°44'25" O	1.05		5.5	1.0	n.n.
Schulzensee bei Groß Köris 52°09'53" N; 13°39'16" O	0.12	0.18	2.5	0.3	n.n.
Schwedtsee 53°11'13" N; 13°09'13" O	0.55		4.0	1.0	52.531
Schweriner See (Teil Teupitzer See) 52°09'14" N; 13°37'24" O				0.5	n.n.
Schwielowsee (Havel) 52°20'22" N; 12°57'27" O	7.86	22.17	9.1	0.7	1.968
Seddinsee 52°23'19" N; 13°41'12" O	2.81	11.04	7.5	0.7	0.804
Siethener See 52°17'08" N; 13°12'14" O	0.71	1.66	4.3	0.4	n.n.
Spree bei Alt Schadow (Auslauf Neuendorfer See) 52°07'05" N; 13°56'59" O					n.n.

Gewässername	Fläche (km <sup>2</sup> )	Volumen (10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup> )	Max. Tiefe (m)	SD (m)	CYN (µg/g TG)
Spree bei Beeskow (Auslauf Schwielochsee) 52°22'02" N; 13°59'34" O					0.171
Springsee 52°10'37" N; 13°59'41" O	0.59	5.86	18.0	1.0	0.351
Stahnsdorfer See 52°17'23" N; 13°53'24" O	0.50	0.43	2.0	0.4	n.n.
Stienitzsee 2°30'10" N; 13°49'21" O	2.12	14.05	14.5	2.3	n.n.
Stolpsee 53°10'31" N; 13°12'28" O	3.81		12.0	0.7	42.403
Straussee 52°34'38" N; 13°52'34" O	1.36	13.48	20.0	5.5	0.165
Streganzer See 52°12'28" N; 13°46'55" O	0.34		2.6	0.8	n.n.
Teufelssee 2°29'28" N; 13°14'01" O	0.02	0.07	5.9	0.6	0.285
Teupitzer See 52°08'30" N; 13°36'07" O	4.76	19.00	7.5	0.6	n.n.
Tholmannsee 52°56'56" N; 12°55'51" O	0.36		7.5	1.6	24.694
Tiefer See bei Prieros 52°13'03" N; 13°47'32" O	0.29	2.06	11.5	2.4	n.n.
Tiefer See oder Grubensee 52°09'11" N; 13°59'39" O	0.61	7.02	23.4	6.1	n.n.
Tiefwareensee 53°31'48" N; 12°41'25" O	1.41	13.58	23.6	5.5	n.n.
Tollensesee 53°29'09" N; 13°10'58" O	17.90	315.89	31.3	8.1	n.n.
Trebelsee (Havel) 52°28'11" N; 12°47'38" O	2.47		2.3	0.8	n.n.
Untersee 52°56'20" N; 12°26'50" O	2.16		8.1	0.6	n.n.
Vielitzsee 52°56'27" N; 13°00'19" O	1.11		3.0	0.8	n.n.
Vordersee bei Obersdorf 52°32'47" N; 14°10'25" O	0.60		7.5	1.5	n.n.
Wandlitzer See 52°45'30" N; 13°27'18" O	2.05		24.5	2.9	19.073
Werbellinsee bei Altenhof 52°55'41" N; 13°42'52" O	7.82	173.00	51.0	2.7	n.n.
Werbellinsee bei Schönberg 52°55'27" N; 12°56'37" O	0.36		3.5	0.5	0.257
Wolletzsee 53°01'19" N; 13°54'34" O	3.10	26.86	16.0	2.5	n.n.
Wolziger See bei Storkow 52°15'30" N; 13°49'20" O	5.55	32.02	13.2	1.8	n.n.

## Anhang

Gewässername	Fläche (km <sup>2</sup> )	Volumen (10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup> )	Max. Tiefe (m)	SD (m)	CYN (µg/g TG)
Wolziger See bei Wünsdorf 52°08'15" N; 13°29'13" O	0.52	0.74	2.8	0.4	2.817
Wutzsee bei Lindow 52°58'07" N; 13°00'44" O	1.12		17.0	2.5	n.n.
Zemminsee 52°09'38" N; 13°38'11" O	0.45	0.61	2.3	0.4	n.n.
Zermützelsee 53°00'43" N; 12°49'47" O	1.25		7.0	0.7	1.018
Zernsdorfer Lankensee 52°18'39" N; 13°42'25" O	0.41	0.90	4.0	0.5	1.619
Zeuthener See 52°21'34" N; 13°38'28" O	2.33	5.84	4.8	0.3	0.721
Zingster Strom 54°25'32" N; 12°41'07" O				0.4	n.n.

*Cylindrospermopsis raciborskii* ist eine Blaualge (Cyanobakterium) tropischen Ursprungs, die sich in den letzten Jahren auch in Gewässern der Berliner Region ausgebreitet hat. Ihr typisches Toxin – das Cylindrospermopsin (CYN) – wurde hier auch gefunden, aber es war bislang unklar, ob es hier durch die eingewanderte Blaualge produziert wird.

Ziel des Projektes war es daher, die Verbreitung und Regulation von *C. raciborskii* und CYN zu analysieren und die CYN Produzenten zu ermitteln, um deren weitere Entwicklung und die damit verbundenen Gefährdungspotenziale abschätzen zu können.

Die Ergebnisse zeigen, dass *C. raciborskii* in der Region Berlin-Brandenburg weit verbreitet ist und zwei weitere tropische Cyanobakterien vorkommen. Wie im Rahmen des Vorhabens gezeigt werden konnte, bestimmt die Wassertemperatur im Frühjahr den Zeitpunkt der Keimung. Dagegen beeinflusst die Lichtdurchlässigkeit des Wassers die Biomasseproduktion dieser Art. Damit entwickeln diese Neo-Cyanobakterien im Prozess der Klimaänderung im zunehmenden Maße Konkurrenzvorteile gegenüber heimischen Arten.