

# BMBF

(Bundesministerium für Bildung und Forschung)

Forschungsvorhaben

Microcystin produzierende Genotypen in Cyanobakterien Populationen:  
Ihr Vorkommen, Regulationsmechanismen ihrer Dynamik und ihr Einfluss auf die Variabilität der  
Microcystinkonzentration



Abschlussbericht 2007



in Kooperation mit



Brandenburgische Technische Universität Cottbus  
Fakultät Umweltwissenschaften und  
Verfahrenstechnik

Leibniz Institut für Gewässerökologie  
und Binnenfischerei  
Abteilung Limnologie Geschichteter Seen

## **Das Forschungsvorhaben**

### **“ Microcystin produzierende Genotypen in Cyanobakterien-Populationen: Ihr Vorkommen, Regulationsmechanismen ihrer Dynamik und ihr Einfluss auf die Variabilität der Microcystinkonzentration“**

wurde von 1.05.04 bis 30.04.07 vom BMBF unter dem Kennzeichen 0330533 gefördert und bearbeitet von:

Prof. Dr. Brigitte Nixdorf  
Katja Schöne, Jörn Jander, Andrea Launhardt  
Brandenburgische Technische Universität Cottbus  
Fakultät Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik,  
Lehrstuhl Gewässerschutz  
Seestr. 45  
D-15526 Bad Saarow  
Tel.: +49 33631 8943  
Fax: +49 33631 5200  
E-Mail: b.nixdorf@t-online.de

In Kooperation mit

Dr. Claudia Wiedner  
Susan Mbedi  
Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB)  
Abteilung Limnologie Geschichteter Seen  
Alte Fischerhütte 2  
D-16775 Stechlin-Neuglobsow  
Tel: +49 33082 69963  
Fax: +49 33082 69917  
E-Mail: c.wiedner@igb-berlin.de

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG:</b> .....	<b>5</b>
1.1	Stand der Forschung zu Projektbeginn und Zielsetzung .....	5
1.2	Planung und Ablauf des Projektes .....	7
1.2.1	Ursprüngliche Planung des Projektes.....	7
1.2.2	Änderungen in der Planung und im des Ablauf des Projektes.....	8
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>11</b>
2.1	Freilandstudie .....	11
2.1.1	Modellgewässer Langer See .....	11
2.1.2	Probenahme.....	12
2.1.3	Analysen.....	12
2.1.3.1	Nährstoffe und Chlorophyll a.....	12
2.1.3.2	Phytoplankton .....	12
2.1.3.3	Microcystin und Anabaenopeptin .....	13
2.2	Untersuchungen an <i>P. agardhii</i> Kulturstämmen.....	13
2.2.1	Stammisolation.....	14
2.2.2	Kultorexperimente.....	14
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>15</b>
3.1	Saisonale Dynamik der Cyanobakterien, abiotischer Parameter und der Toxinkonzentrationen im Langen See 2005 / 06 .....	15
3.1.1	Saisonale Dynamik der Cyanobakterien .....	15
3.1.2	Dynamik der abiotischen Parameter .....	16
3.1.3	Dynamik der Microcystin- und Anabaenopeptinkonzentrationen .....	19
3.1.3.1	Microcystine.....	19
3.1.3.2	Anabaenopeptin.....	20
3.1.4	Eingrenzung der Produzenten von Microcystin und Anabaenopeptin.....	22
3.1.5	Zusammenhänge zwischen den Toxinkonzentrationen und dem Biovolumen der <i>P. agardhii</i> Population .....	23
3.1.5.1	Korrelationen zwischen den Microcystin- und Anabaenopeptinkonzentrationen und dem Biovolumen von <i>P. agardhii</i> .....	23
3.1.5.2	Zeitliche Dynamik in der Variabilität der Microcystin- und Anabaenopeptinkonzentrationen pro Biovolumen der <i>P. agardhii</i> Population .....	26
3.2	Peptidgehalt und Wachstum der <i>P. agardhii</i> Kulturstämmen .....	29
3.2.1	Chemotypendiversität der Stämme .....	30
3.2.2	Peptidgehalt und Wachstum der Stämme .....	33
3.2.3	Genotypische Variabilität im Peptidgehalt und Wachstum der <i>P. agardhii</i> Kulturstämme .....	35
3.2.4	Phänotypische Variabilität im Peptidgehalt und Wachstum der <i>P. agardhii</i> Kulturstämme in Abhängigkeit von der Lichtintensität.....	38
3.2.5	Vergleich der genotypischen und phänotypischen Variabilität im Peptidgehalt der Stämme.....	40
3.2.6	Zusammenhänge zwischen Peptidgehalt und Wachstum der Stämme: Chemotyp = Ökotyp? .....	44

<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSENDER ANALYSE DER MICROCYSTIN- UND ANABAENOPEPTIN VARIABILITÄT IM LANGEN SEE .....</b>	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE DETEKTION VON MICROCYSTINPRODUZENTEN .....</b>	<b>52</b>
5.1	Aufgabenstellung .....	52
5.2	Ergebnisse .....	52
5.2.1	Fixierung von Proben .....	52
5.2.2	Steigerung der Ausbeute bei der single filament PCR für <i>P. agardhii</i> .....	54
5.2.3	Entwicklung geeigneter Primerpaare .....	55
5.2.3.1	Entwicklung von PCR-Primern zum Nachweis eines <i>mcy</i> -Genfragmentes in <i>P. agardhii</i> .....	56
5.2.3.2	Entwicklung von PCR-Primern für die Kontroll-PCR .....	57
5.2.4	Liste der verwendeten Kulturstämme .....	61
5.2.5	Primer, PCR und Gelelektrophorese .....	61
5.3	Zusammenfassung der molekularbiologischen Arbeiten .....	62
<b>6</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>66</b>

## 1 EINLEITUNG:

### 1.1 Stand der Forschung zu Projektbeginn und Zielsetzung

Viele Cyanobakterien produzieren bioaktive und toxische Substanzen, die eine Gefahr für Tiere und Menschen darstellen können (z.B. Carmichael und Falconer 1993). Zu diesen Substanzen gehören die Microcystine, eine Gruppe von hepatotoxischen zyklischen Heptapeptiden (Botes et al. 1984), mit mehr als 80 natürliche Varianten (Rinehart et al. 1994, Sivonen, und Jones 1999), deren Funktion und ökologische Relevanz bis heute ungeklärt ist. Microcystine können von Arten der Gattungen *Microcystis* (Botes et al. 1984), *Anabaena* (Krishnamurthy et al. 1986), *Nostoc* (Namikoshi et al. 1990) und *Planktothrix* (Luukkainen et al. 1993) produziert werden. Diese Cyanobakterien sind in deutschen Gewässern weit verbreitet und bilden häufig Massenentwicklungen („blooms“), weshalb auch Microcystin sehr weit verbreitet ist. Beispielsweise wurde in einem ersten umfangreichen Monitoring zum Vorkommen toxischer Cyanobakterien in deutschen Gewässern (BMBF Kennzeichen 0339547) in 52 % der untersuchten Gewässer Microcystin nachgewiesen (Wiedner et al. 2001, Fastner et al. 2001a, Chorus et al. 2001). Dabei lagen die Microcystinkonzentrationen in der Hälfte der Fälle über dem von der WHO für Trinkwasser vorgeschlagenen Grenzwert von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (WHO 1998, Chorus und Bartram 1999). Beispiele, wie die Vergiftung von Dialysepatienten in einem Krankenhaus in Brasilien, die für 50 Menschen tödlich endete, (Jochimsen et al. 1998) belegen, dass Microcystin eine ernstzunehmende Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellt.

In den letzten Jahren wurden intensive Untersuchungen zur Steuerung der Variabilität von Microcystinkonzentrationen in Gewässer und deren Prognostizierbarkeit durchgeführt. Die saisonale Dynamik von Microcystinkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung und Abundanz von Cyanobakterien wurde für Gewässer erfasst, die dominiert waren durch *Microcystis* spp. (Park et al. 1998, Fastner et al. 1999b, Jähnichen et al. 2001, Oh et al. 2001), *Planktothrix rubescens* (Fastner et al. 1999b) und *Planktothrix agardhii* (Wiedner et al. 2002). Gemeinsam zeigen diese Studien, dass die saisonale Dynamik der Microcystinkonzentrationen nicht allein von der Abundanz der jeweils Microcystin produzierenden Arten abhängig ist. Zwei Ursachen wurden hierfür verantwortlich gemacht:

- Der zellulären Microcystingehalt wird durch Wachstumsfaktoren beeinflusst: In Kulturexperimenten wurden für Stämmen verschiedener Cyanobakterien unter anderem Effekte von Licht (Wiedner et al. 2003, Käpernick et al. 2000), Stickstoff (Orr und Jones 1998,