



Verbundprojekt „Klimawandel und Gesundheit“

Schlussbericht zum Forschungsvorhaben

***Erfassung des Vorkommens des toxinbildenden Cyanobakteriums
Tychonema an den Lechstauseen im Jahr 2020***

CYTOXKLIMApus

*Ergänzungsprojekt zum Forschungsvorhaben: Klimawandel fördert
toxische Cyanobakterien – Detektion von Cyanotoxingenen in
Gewässern*



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



und durch
Bayerisches Staatsministerium für
Gesundheit und Pflege



Schlussbericht

Projektname:	Erfassung des Vorkommens des toxinbildenden Cyanobakteriums <i>Tychonema</i> an den Lechstauseen im Jahr 2020
Akronym:	CYTOXKLIMA+
Aktenzeichen:	Ergänzungsprojekt zu K3-8503-PN 17-12-D17105/2017
Projektlaufzeit:	15.03.2020 – 15.05.2021
Projektleitung:	Dr. Franziska Bauer LS Aquatische Systembiologie, Limnologische Station Iffeldorf der TU München (LSI)
Projektantragsteller:	Dr. Uta Raeder Prof. Dr. Jürgen Geist Limnologische Station Iffeldorf, LS Aquatische Systembiologie, TU München
Projektpartner:	Dr. Bernadett Bartha-Dima, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Wasserhygiene, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim
Datum:	27.08.2021
Version:	2

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	5
2. Hintergrund und Inhalt.....	5
3. Zielsetzung des Projekts	6
4. Material und Methoden	6
4.1. Das Untersuchungsgewässer.....	6
4.2. Untersuchungen 2020	7
4.2.1. Probenahme	7
4.2.2. Messung der physikalischen Parameter.....	8
4.2.3. Habitatcharakterisierung.....	9
4.2.4. Morphologische Untersuchungen.....	9
4.2.5. Molekularbiologie.....	10
4.2.6. Analyse von Anatoxin-a mittels ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent assay)	11
5. Ergebnisse.....	12
5.1. Verbreitung von <i>Tychonema</i> in der Vegetationsperiode 2020	12
5.2. Toxinmessungen.....	15
5.3. Charakterisierung der <i>Tychonema</i> -Zellen	16
5.3.1. Makroskopische Betrachtung.....	16
5.3.2. Mikroskopische Betrachtung.....	18
5.4. Physikalische Parameter an den Probenahmestellen	20
5.5. Habitatcharakterisierung.....	22
5.6. Ergebnisse der Sequenzierung	25
6. Diskussion.....	30
6.1. Wichtige Begleitgattungen.....	30
6.2. Toxizität	30
6.3. Verbreitung und Fortpflanzung.....	31
6.4. Habitatansprüche	32
7. Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse	34
8. Ausblick.....	34
9. Glossar	35
10. Literaturverzeichnis.....	36
11. Anhang.....	40

1. Zusammenfassung

Das Projekt „Erfassung des Vorkommens des toxinbildenden Cyanobakteriums *Tychonema* an den Lechstauseen im Jahr 2020“ stellt eine Ergänzung zum Forschungsvorhaben „Klimawandel fördert toxische Cyanobakterien – Detektion von Cyanotoxingenen in Gewässern“ dar. Beide Projekte wurden im Rahmen des Verbundprojektes „Klimawandel und Gesundheit“ bearbeitet. Cyanobakterien sind weltweit ubiquitär vorhanden und bilden auch einen wichtigen Bestandteil des Phytoplanktons bayerischer Gewässer. Viele Cyanobakterien wirken sich nicht negativ auf die Gesundheit des Menschen aus, es gibt allerdings auch Vertreter, die Cyanotoxine produzieren können. Diese Toxine wirken auf verschiedene Weisen, so gibt es u. a. Kontaktgifte, Lebergifte und Nervengifte. Treten diese toxinbildende Cyanobakterien in Massen auf, kann davon eine Gefahr für die menschliche Gesundheit ausgehen. Bei einer toxischen Algenblüte ist die Nutzung der Gewässer zur Freizeitgestaltung und Erholung oftmals nicht mehr möglich. Um die Gefahr für die Bevölkerung möglichst gering zu halten, werden Badegewässer regelmäßig durch die bayerischen Behörden untersucht. Bei diesem Monitoring werden dabei bisher hauptsächlich pelagische Cyanobakterien berücksichtigt. Dies sind Cyanobakterien, die in der Freiwasserzone auftreten und oberflächliche Blüten bilden. Nach Vorfällen im Mandichosee 2019, bei denen mehrere Hunde an einer Vergiftung mit dem Cyanotoxin Anatoxin-a verstorben sind, geriet das benthische Cyanobakterium *Tychonema* als potentieller Auslöser der Vergiftungen in den Fokus der Untersuchungen. Zur Beobachtung der Situation am Mandichosee und den Lechstauseen zwischen Mandichosee und Forggensee wurde ein einjähriges Projekt durchgeführt. Im Rahmen des Projektes wurden benthische Cyanobakterienvorkommen regelmäßig überwacht. Die Proben wurden makroskopisch sowie mikroskopisch betrachtet. Außerdem wurden die Proben mittels Polymerasekettenreaktion auf *Tychonema*-Gene und Gene für Cyanotoxine hin untersucht. Zur Analyse der cyanobakteriellen Gemeinschaft erfolgte eine *Illumina MiSeq* Sequenzierung. In ausgewählten Proben wurden außerdem die Konzentrationen des Toxins Anatoxin-a mittels ELISA-Test gemessen. Es zeigte sich, dass *Tychonema* in der Vegetationsperiode 2020 über den ganzen Lech hinweg verbreitet war. Außerdem konnten Anatoxin-a Gehalte im Bereich zwischen 0 und 220 µg/l bestimmt werden. Der aktuelle Leitwert für Anatoxin-a im Badegewässer liegt derzeit bei einer Konzentration von 60 µg/l (Chorus und Welker, 2021). Die letale Dosis (LD₅₀) bei oraler Aufnahme des Anatoxin-a liegt zwischen 3 und 6 mg/kg Körpergewicht (Cyanocenter, 2021). Es wurden außerdem die Begleitgattungen in den cyanobakteriellen Gemeinschaften bestimmt. Die Ergebnisse lieferten erste Hinweise auf die Habitatansprüche von *Tychonema*. So wird scheinbar vorzugsweise ein kiesiges Substrat besiedelt. Im Rahmen der Studie hat sich erneut gezeigt, dass auch die benthischen Cyanobakterien in der Zukunft in die Monitoringprogramme mit aufgenommen werden sollten.

2. Hintergrund und Inhalt

Im August 2019 starben drei Hunde nachdem sie im Mandichosee, der Staustufe 23 des Lechs, gebadet hatten (Augsburger Allgemeine, 2019; Bauer et al., 2021). Im Laufe der anschließenden Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Hunde an einer Vergiftung durch Anatoxin-a verstorben waren. Dies ist ein Cyanotoxin, welches dort von der Gattung *Tychonema* produziert wurde. *Tychonema* sp. bildete zu diesem Zeitpunkt ein Massenvorkommen. Die Algenblüte blieb bis zu den Vorfällen von den überwachenden Behörden unentdeckt, da es sich um eine benthische Art handelt, die keine oberflächlichen Blüten bildet, sondern am Gewässerboden gedeiht. Im Zuge einer spontanen Probenahmekampagne wurden neben dem Mandichosee auch noch weitere Uferstellen des Lechs flussaufwärts bis zum Forggensee untersucht. *Tychonema* sp. wurde an

weiteren Stellen detektiert. Diese Probenahme erfolgte im Zuge des damals laufenden Projektes CYTOXKLIMA¹.

In Folge der Situation im Jahr 2019 war es erforderlich, im Jahr 2020 eine gezieltere Untersuchung der Lechstauseen hinsichtlich des Vorkommens von *Tychonema* über die gesamte Vegetationsperiode durchzuführen. Da viele Cyanobakterien, speziell der Familie der Oscillatoriaceae, aufgrund ihrer sehr guten Anpassung bereits bei niedrigen Temperaturen und schwachen Lichtverhältnissen anwachsen können (Scheffer et al., 1997), wurden die Untersuchungen bereits ab April durchgeführt. So konnte das *Tychonema*-Vorkommen schon vor der Erwärmung der Gewässer und dem Beginn der Freizeitaktivitäten an den Seen eingeschätzt werden.

Eine generelle Hinführung zur Problematik der Cyanobakterien und ihren Toxinen kann dem Bericht zum Forschungsvorhaben CYTOXKLIMA entnommen werden. Das Projekt CYTOXKLIMA+ stellte eine kurzfristige Ergänzung zu diesem Forschungsvorhaben dar. Die Ergebnisse der Untersuchungen 2019 am Lech hinsichtlich *Tychonema* wurden bereits veröffentlicht und können der öffentlich zugänglichen Publikation entnommen werden (Bauer et al., 2020).

3. Zielsetzung des Projekts

Im Rahmen des Projekts CYTOXKLIMA+ sollte ein umfassendes Monitoring an den Lechstauseen erfolgen. Der Fokus der Untersuchungen lag dabei auf der Erfassung des Vorkommens des toxinbildenden Cyanobakteriums *Tychonema*. Im Rahmen des Projekts wurden die Lechstauseen hinsichtlich der hydrophysikalischen Parameter charakterisiert. Außerdem wurden makroskopisch erkennbare Algenmatten dokumentiert. Anhand mikroskopischer Analysen wurden *Tychonema*-Vorkommen in den Lechstauseen festgestellt. Diese *Tychonema*-Vorkommen wurden durch molekularbiologische Untersuchungen verifiziert. Nach jeder Probenahme wurden dem LGL Proben zur Toxinanalyse zur Verfügung gestellt. Die Untersuchungen dienten dazu, die Situation an den Lechstauseen 2020 einzuschätzen und zu bewerten. Die Studie stellt eine Ergänzung der üblichen Maßnahmen der Badegewässerüberwachung am Mandichosee und Lech dar.

4. Material und Methoden

4.1. Das Untersuchungsgewässer

Im Rahmen der Studie wurden 13 Lechstauseen hinsichtlich des Vorkommens der potenziell toxischen Cyanobakteriengattung *Tychonema* untersucht. Besonders berücksichtigt wurde dabei der Mandichosee, der bereits 2019 auf Grund eines Massenvorkommens dieser Gattung und dem Sterben von mehreren Hunden in den Fokus der Untersuchungen gerückt ist. Der Mandichosee ist mit 1,6 km² die zweitgrößte Staustufe des Lechs. Dadurch und durch seine Nähe zur Metropolregion Augsburg stellt er ein stark frequentiertes Freizeitgewässer dar. Bisher wurde die Badegewässerqualität immer als ausgezeichnet eingestuft (Landratsamt Aichach-Friedberg).

¹ Klimawandel fördert toxische Cyanobakterien – Detektion von Cyanotoxingenen in Gewässern, Verbundprojekt Klimawandel und Gesundheit (2017-2020)

Der Lech ist mit einer Länge von 256 km einer der größten und wichtigsten Flüsse Bayerns. Der Lech entspringt in Österreich, seine Quelle befindet sich in Vorarlberg. Er fließt schließlich bei Marxheim in die Donau. Der Lech in seiner ursprünglichen Form ist ein typischer Alpenfluss, der durch häufige Überflutungsereignisse, niedrige Temperaturen, hohe Sauerstoffgehalte und eine hohe Fließgeschwindigkeit geprägt war. Zwischen 1954 und 1983 wurden zum Hochwasserschutz und zur Stromgewinnung durch Wasserkraft am Lech 23 Dämme und Staustufen gebaut. Die Staustufen wirken sich auf die Temperatur, die Fließgeschwindigkeit und die Geschiebefracht aus und haben dazu geführt, dass der Lech zu einem der meistverbauten Flusssysteme in Deutschland wurde.

4.2. Untersuchungen 2020

4.2.1. Probenahme

Auf der Karte (Abb. 1) sind die Probenahmestellen eingezeichnet, die im Rahmen der Studie untersucht wurden. Die Probenahmestellen entsprechen den Stellen, die bereits 2019 angefahren wurden. Eine Ausnahme stellt die Probenahmestelle Dornau dar. Diese Stelle wurde 2020 nicht mehr untersucht, da die Probenahmestelle dort nur sehr schwer einsehbar ist und die Probenahme an dieser Stelle auf Grund der direkten Nähe zum Kraftwerk gefährlich ist. Die Probenahmen erfolgten zwischen 21.04.2020 und 23.11.2020. Bis zum 26.05.2020 wurden alle Probenahmestellen entlang des Lechs im zweiwöchigen Rhythmus untersucht. Der Grund dafür war, dass das erste Auftreten von *Tychonema* an den unterschiedlichen Stellen im Lech möglichst genau erfasst werden sollte. Anschließend wurden dem ursprünglichen Plan folgend, die Probenahmestellen 0-22 im monatlichen Rhythmus angefahren. Der Mandichosee (Lechstaustufe 23) wurde hingegen weiterhin im zweiwöchentlichen Rhythmus untersucht. Die Probennahme erfolgte während des Monitorings immer nahe der Uferkante, in ca. 2 m Entfernung vom Gewässerrand. Zusätzlich wurde am 27.10.2020 eine einmalige Probenahme in der Gewässermitte des Mandichosees durchgeführt, bei der von einem Boot aus eine Mischprobe entnommen wurde. Für die Untersuchung der pelagischen Organismen wurde jeweils ein Liter Wasser entnommen. Das Wasser wurde im Labor über 0,2 µm Filter filtriert und die Zellen auf den Filtern aufkonzentriert. Die Filter wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren. Für die Untersuchung der benthischen Organismen wurde Biomasse entnommen und zusammen mit etwas Wasser in ein 50 ml – Falcon gegeben. Dabei wurden bei jeder benthischen Probe jeweils zwei Falcons entnommen, eines für die molekulargenetischen Analysen und die Mikroskopie, eines für die Toxinmessungen am LGL. Die Falcons wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.



Abbildung 1 Karte des Untersuchungsgebietes entlang des Lechs.

4.2.2. Messung der physikalischen Parameter

Direkt bei der Probenahme wurden mittels einer Multiparametersonde (MPP 930 IDS, WTW, Weilheim) die physikalischen Parameter Temperatur, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit und Sauerstoffgehalt bzw. -sättigung bestimmt. Die Messungen erfolgten dabei an der Wasseroberfläche im ufernahen Bereich, ca. 2 m vom Gewässerrand entfernt. Bei der Entnahme der Mischprobe am Mandichosee am 27.10.2020 wurde außerdem ein Tiefenprofil der physikalischen Parameter von der Oberfläche bis in 6 m Tiefe erstellt. Dieses Tiefenprofil wurde von einem Boot aus in der Seemitte entnommen. Die Messungen erfolgten dabei in Meterschritten. Bei dieser Probenahme wurde außerdem die Sichttiefe mit Hilfe einer Secchischeibe bestimmt.

Die euphotische, d.h. die lichtdurchflutete Zone errechnet sich, indem die Secchitiefe mit dem Faktor 2,5 multipliziert wird.

4.2.3. Habitatcharakterisierung

Im Zuge der Studie erfolgte eine Habitatcharakterisierung an allen Probenahmestellen. Neben der Fließgeschwindigkeit wurde die Beschaffenheit des Substrats notiert. Außerdem wurde dokumentiert, welche Makrophyten (Wasserpflanzen) an den Probenahmestellen zu finden waren. Dabei wurde unterschieden, ob die Makrophyten am Gewässergrund wurzelnd oder freischwimmend vorgefunden wurden. Die Parameter Substrat und Makrophytenvorkommen wurden bei jeder Probenahme erfasst. Die Ergebnisse wurden über den Zeitraum der Untersuchungen zusammengefasst.

Fließgeschwindigkeit

An jeder Probenahmestelle im Uferbereich wurde im Rahmen des Monitorings mindestens einmal die Fließgeschwindigkeit bestimmt. Dazu wurde ein Tauchstab nach Jens nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die untere Messgrenze lag dabei bei 10 cm/s.

Substrat

Das Sediment wurde mittels der Korngrößenverteilung eingeteilt. Die verschiedenen Gruppen können Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1 Einteilung der Gruppen für die Korngrößenverteilung.

Großgruppe	Ton			Schluff				
Kleingruppe	fein	mittel	grob	fein	mittel	grob		
Korngröße [mm]	< 0,0002	0,0002 – 0,00063	0,00063 – 0,0002	0,0002 – 0,0063	0,0063 – 0,02	0,02 – 0,063		

Großgruppe	Sand			Kies			Steine	Blöcke
Kleingruppe	fein	mittel	grob	fein	mittel	grob	-	-
Korngröße [mm]	0,063 – 0,2	0,2 – 0,63	0,63 - 2	2 – 6,3	6,3 – 20	20 - 63	63 - 200	> 200

Makrophyten

Bei jeder Probenahme wurde notiert, welche Makrophyten an den Probenahmestellen zu finden waren. Dabei wurde unterschieden, ob die Makrophyten vor Ort wachsend oder schwimmend bzw. angespült vorgefunden wurden.

4.2.4. Morphologische Untersuchungen

Makroskopische Betrachtung

Makroskopisch wurde bei jeder Probenahme erfasst, ob sich benthische Aufwuchsalgen im Uferbereich der Gewässer erkennen ließen, bei denen es sich um *Tychonema* handeln könnte. Das

Augenmerk wurde besonders gerichtet auf schwimmende Algenansammlungen an der Gewässeroberfläche, auf angeschwemmte Makrophyten am Gewässerrand sowie auf Aufwuchs auf unterschiedlichen Substraten, wie z. B. auf Steinen.

Mikroskopische Betrachtung

Algen oder Cyanobakterientrichome wurden direkt nach der Probenahme mit Hilfe einer sterilen Impföse isoliert und auf Objektträger übertragen. Die Proben stammten aus benthischen Matten, aus aufschwimmendem Algenmaterial oder aus dem Biofilm, der auf den Makrophyten wuchs. Die anschließende mikroskopische Analyse erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops (Leica DMRBE, Leica, Wetzlar), welches mit photographischem Equipment ausgestattet ist (Zelos 285 GV, Kappa, Norderstedt). Mutmaßliche *Tychonema* Trichome wurden morphologisch charakterisiert und fotografiert. Zusätzlich wurden benthische Proben mit Jod-Kaliumjodid-Lösung nach Lugol fixiert. Dieses Vorgehen ermöglichte bei Bedarf weitere mikroskopische Analysen zu einem späteren Zeitpunkt.

4.2.5. Molekularbiologie

DNA-Extraktion

Als Vorbereitung für die DNA-Extraktion wurden im Anschluss an jede Probenahme zunächst die Zellen aufkonzentriert. Die pelagischen Wasserproben wurden dazu über 0,2 µm Filter filtriert. Das Filtrat wurde verworfen und die Filter mit den Zellen bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren. Von den benthischen Proben wurden Zellen mit Hilfe einer sterilen Impföse in ein Eppendorfgefäß überführt und dann ebenfalls bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Im Anschluss erfolgte die DNA-Extraktion mittels einer Phenol-Chloroform-basierten Methode, die seit vielen Jahren an der Limnologischen Station Iffendorf (LSI) etabliert ist (Zwirgmaier et al., 2015). Die DNA-Extraktion von Zellen aus benthischen und aus pelagischen Proben erfolgt dabei nach dem gleichen Prinzip.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zum Nachweis von *Tychonema* genutzt. Außerdem wurden die Proben mittels PCR hinsichtlich des Vorhandenseins der Gene für die Biosynthese der Cyanotoxine Anatoxin-a, Microcystin und Saxitoxin untersucht. Der PCR-Assay zum Nachweis von *Tychonema* sp. wurde im Zuge der Studie optimiert, die anderen genutzten PCR-Assays wurden bereits in der Studie CYTOXKLIMA etabliert (Bauer und Raeder, 2021).

Optimierung und Anwendung eines PCR-Assays zum Nachweis von Tychonema sp.

Für den Nachweis von *Tychonema* mittels PCR wurde im Rahmen der Studie zunächst ein PCR-Assay etabliert. Als geeignetes Primerpaar erwiesen sich dabei Oligonukleotide, die bereits veröffentlicht worden waren (Capelli et al., 2018). Dieses Primerpaar ist spezifisch für die *rbcLX* Region, eine Genregion, die neben dem *16S rRNA* Gen oftmals für phylogenetische Studien verwendet wird (Humbert et al., 2002; Rajaniemi et al., 2005; Salmaso et al., 2016). Laut der Veröffentlichung von Capelli et al (2018) ist das Primerpaar spezifisch für die Art *Tychonema bourellyi*. Im Zuge der eigenen Primeroptimierung hat sich allerdings gezeigt, dass das Primerpaar *Tychonema* auf Gattungsebene detektiert. Außerdem stellte sich heraus, dass bei einer empfohlenen Annealingtemperatur von 54°C (Capelli et al., 2018) nicht nur *Tychonema*, sondern auch *Oscillatoria* detektiert werden würde. Daher wurde die optimale Annealingtemperatur mit

Hilfe einer Gradienten-PCR neu ermittelt. Die im Zuge der vorliegenden Studie optimierten Bedingungen für den Nachweis von *Tychonema* mittels PCR und die Sequenzen verwendeten Primerpaare können der Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2 Verwendete Primerpaare und optimierte Bedingungen zum Nachweis von *Tychonema* mittels PCR.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Spezifität	Optimierte Annealingtemperatur [°C]	Fragmentlänge [Basenpaare]	Quelle
rbclX-tycF	GTCCAAGCACGTA ACGAAGG	<i>Tychonema</i> sp.	58,8	600	Capelli et al., 2018
rbclX-tycR	TTGAATGCCAGTA CGAACCA				

PCR-Assay zum Nachweis der Gene für die Biosynthese der Cyanotoxine Anatoxin-a, Microcystin und Saxitoxin

Die PCR-Assays zum Nachweis der Gene für die Biosynthese von Anatoxin-a, Microcystin und Saxitoxin wurden bereits im Rahmen der Studie CYTOXKLIMA optimiert. Verwendet wurden die Primerpaare anxgenF/anxgenR (Annealing bei 55,8 °C) zum Nachweis von Anatoxin-a, mcyE-F2/mcyE-R4 (Annealing bei 56,0 °C) zum Nachweis von Microcystin und sxtA-F/sxtA-R (Annealing bei 57,5 °C) zum Nachweis von Saxitoxin.

Illumina MiSeq Sequenzierung

Insgesamt 134 ausgewählte pelagische und benthische Proben wurden hinsichtlich ihres 16S rRNA Gens sequenziert. Dabei erfolgte eine Illumina MiSeq Sequenzierung am Core Facility Microbiome der TUM. Die Proben wurden bidirektional sequenziert. Das folgende Primerpaar wurde für die erste PCR verwendet: S-D-Bact-0341-b-S-17 (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 3') und S-D-Bact-0785-a-A-21 (5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC 3'). Die Illumina Adapter wurden kursiv dargestellt. Diese Primer decken die variablen Regionen V3-V4 des 16S rRNA Gens ab. Die Sequenzdaten wurden im Anschluss mit der frei verfügbaren Software IMNGS prozessiert (Lagkouravdos et al., 2016). Sequenzen mit einer Ähnlichkeit von 97 % wurden in ein *Operational Taxonomic Unit* OTU zusammengefasst. Im Bereich der Bakteriensequenzierung geht man davon aus, dass ein OTU mit 97 % Sequenzübereinstimmung einer Art entspricht. Die anschließende Klassifizierung der Sequenzen erfolgte mittels SINA online (Pruesse et al., 2012). Der Klassifizierung liegt dabei die SILVA Taxonomie zugrunde (Quast et al., 2012).

4.2.6. Analyse von Anatoxin-a mittels ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent assay)

Nach den mikroskopischen Untersuchungen wurden in den Proben, in denen die Anwesenheit von *Tychonema* bestätigt worden war, die Anatoxin-a Gehalte mittels ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent assay) bestimmt. Die Messungen wurden mit dem kommerziell erhältlichen

Anatoxin-a ELISA Plate Kit von Eurofins Abraxis (Eurofins, Warminster, USA) durchgeführt. Der ELISA basiert auf dem Prinzip eines direkten kompetitiven ELISAs.

Die Proben –in der Regel 50 ml Volumen mit Wasser und Sediment/Biomasse Anteil- wurden zur Zelllysis dreimal hintereinander eingefroren und anschließend wieder aufgetaut, um das in den Zellen vorhandene intrazelluläre Anatoxin-a freizusetzen. Nach den Einfrier-/Auftauzyklen wurden die Proben mittels Vortex-Mixer homogenisiert. Anschließend wurden nach der Sedimentation des Biomasseanteils 10 ml des Überstands für die Toxinanalyse entnommen.

Die Konzentrationen der Proben wurden mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt, die für jeden Lauf neu erstellt worden ist. Proben, deren gemessene Anatoxin-a Konzentration über 10 µg/l lag, wurden fünfzigfach verdünnt und erneut vermessen. Alle Analysen erfolgten durch das LGL. Es wurden dabei insgesamt 39 Proben analysiert.

5. Ergebnisse

Die Probenahmen am Lech erfolgten zwischen dem 21.04.2020 und dem 23.11.2020. Die 19 Probestellen entlang des Lechs zwischen Forggensee und Mandichosee wurden dabei an neun Probenahmetagen zwischen 21.04.2020 und 10.11.2020 angefahren. Am Mandichosee wurden an allen 16 Untersuchungsterminen Proben entnommen.

5.1. Verbreitung von *Tychonema* in der Vegetationsperiode 2020

Die Karte in der Abbildung 2 zeigt die Häufigkeit der *Tychonema*-Funde über alle Probenahmetage gemittelt. Die Abbildung 3 stellt ergänzend die Zusammensetzung von benthischen und pelagischen Funden dar. Als Datengrundlage dafür dienten die Ergebnisse der PCR. Als Positivfund wurden Proben bewertet, bei denen in der DNA der pelagischen und/oder der benthischen Organismen ein positiver PCR-Nachweis vorlag. In der Karte wird auch ersichtlich, ob an einem Standort vorwiegend benthische oder pelagische *Tychonema*-Zellen detektiert worden sind. Es gab keine Probenahmestelle, an der bei jeder Probenahme ein positiver *Tychonema*-Nachweis erfolgte. An den Probenahmestellen Lechbruck-Kneippbecken und Lechbruck-Kraftwerk konnte 2020 bei keiner Probenahme *Tychonema* mittels PCR detektiert werden. Die der Karte zu Grunde liegenden PCR-Ergebnisse können der Tabelle mit den Gesamtergebnissen im Anhang (CD) entnommen werden.

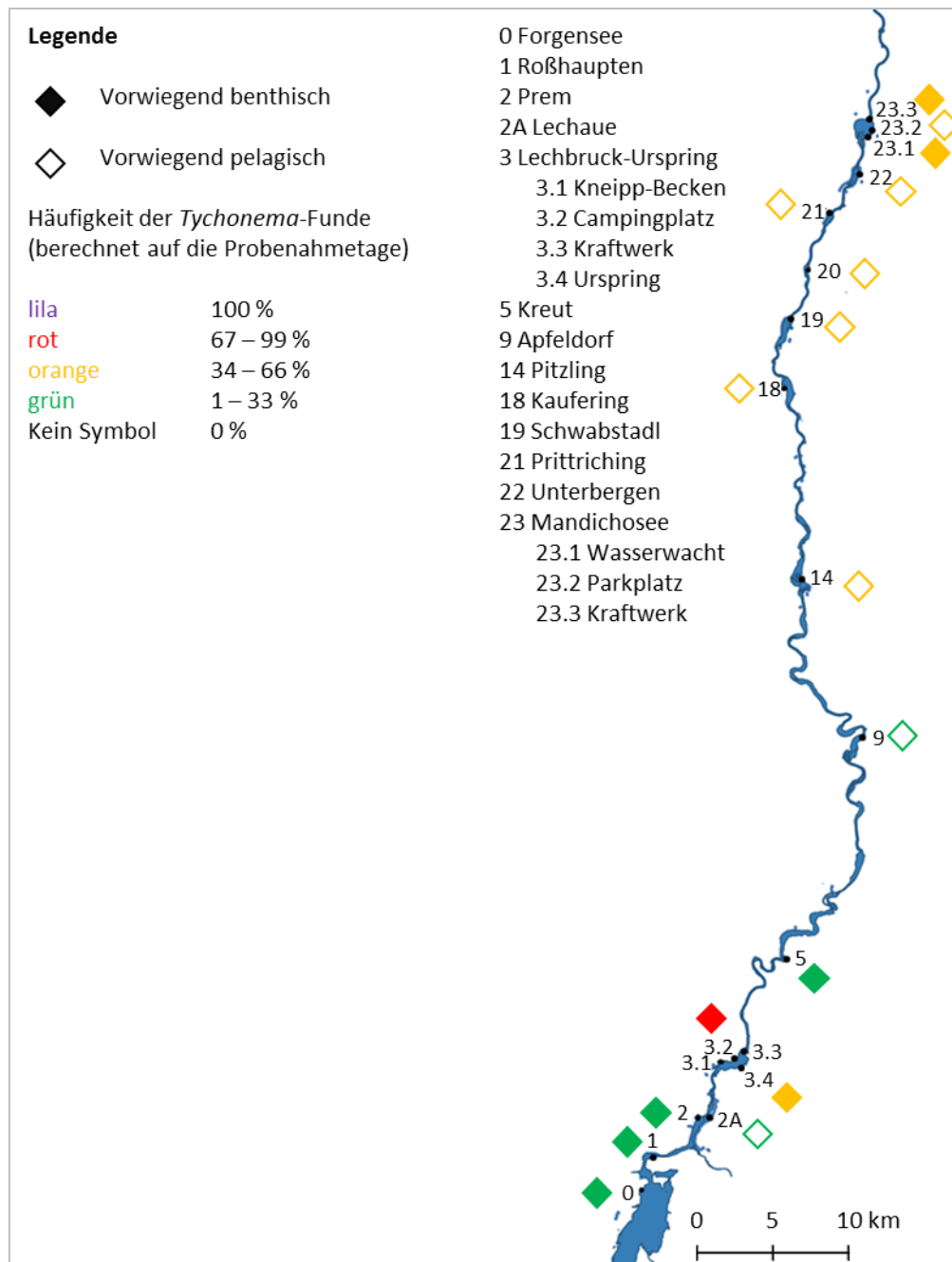


Abbildung 2 Häufigkeit der *Tychonema*-Funde über den Gesamtprobenahmezeitraum. Die Daten basieren auf den Ergebnissen der PCR.

Am häufigsten wurde *Tychonema* bei 78 % der Probenahmen an der Probenahmestelle Lechbruck-Campingplatz vorgefunden. An dieser Probenahmestelle wurde nur benthische *Tychonema* detektiert. Die benthische *Tychonema* wuchs an dieser Stelle häufig auf einer Wasserpflanze der Gattung *Potamogeton* (Abbildung 6D). Die pelagischen Proben lieferten bei der PCR stets ein negatives Ergebnis. Häufig wurde *Tychonema* außerdem an der Probenahmestelle Lechbruck-Urspring sowie den nördlicheren Probenahmestellen ab Probenahmestelle Landzunge Pitzling (14) nachgewiesen. In Pitzling erfolgte der Nachweis ausschließlich in den pelagischen Proben; es wurden keine benthischen *Tychonema*-Vorkommen gesichtet. An den anderen Probenahmestellen war es möglich, *Tychonema* sowohl in den benthischen als auch in den pelagischen Proben nachzuweisen, wobei der pelagische Nachweis häufiger erfolgte. Am Mandichosee wurde an den Probenahmestellen „Wasserwacht“ und „Kraftwerk“ vorwiegend

benthische *Tychonema* nachgewiesen, an der Probenahmestelle „Parkplatz“ erfolgte der Nachweis häufiger in der Freiwasserprobe.

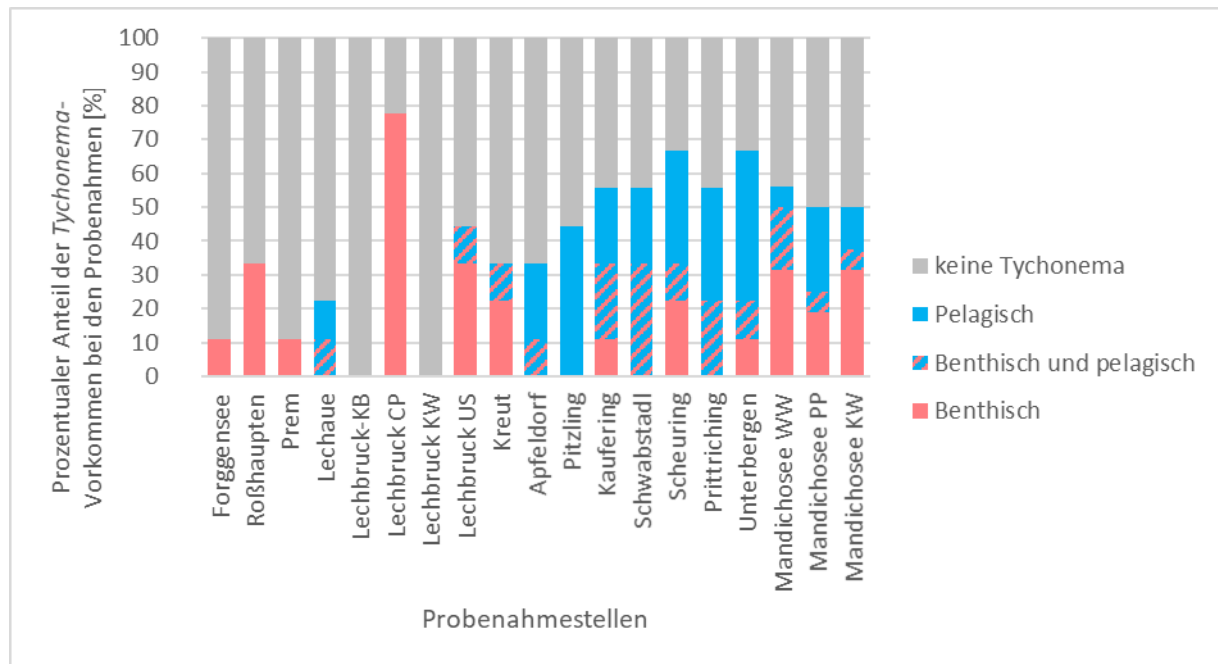


Abbildung 3 Prozentualer Anteil der benthischen und pelagischen *Tychonema*-Funde bei den Probenahmen.

Beim Verfolgen des Vorkommens von *Tychonema* im Jahresverlauf (Abb. 4) wird deutlich, dass *Tychonema* besonders häufig im Frühjahr bei der Probenahme am 05.05.2020 nachgewiesen wurde. Besonders an den nördlichen Staustufen zwischen Kreut und Unterbergen wurde *Tychonema* an diesem Probenahmetag mehrfach detektiert. Die wenigsten *Tychonema*-Funde wurden bei der Probenahme am 18.08.2020 verzeichnet. Zu diesem Zeitpunkt war *Tychonema* hauptsächlich an den Probenahmestellen am Mandichosee zu finden. Tendenziell lässt sich erkennen, dass *Tychonema* vor allem im Frühjahr an allen Probenahmestellen außer dem Mandichosee häufig ist, wohingegen dieses Cyanobakterium im Mandichosee vor allem im Sommer und Herbst nachweisbar war.

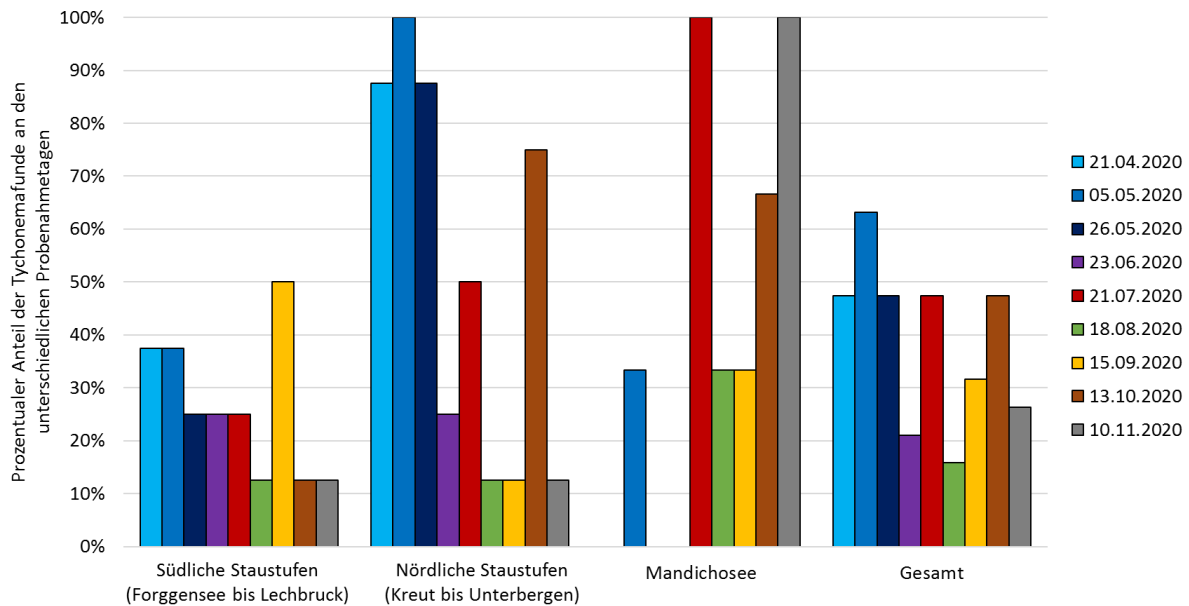


Abbildung 4 *Tychonema*-Funde an den unterschiedlichen Probenahmetagen.

5.2. Toxinmessungen

Die Anatoxin-a Gehalte der gemessenen Proben variierten zwischen 0,1 und 220 µg/l, wobei in 56 % der Proben der Messwert unter 1,0 µg/l lag. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Toxinmessung zusammengefasst.

Tabelle 3 Anatoxin-a Gehalte in den Proben mit Messwerten über 1,0 µg/l. Detaillierte Ergebnisse im Anhang (Anhang Tabelle 1).

Anatoxin-a Gehalt [µg/l]	Probe
1,0 bis 10,0	Lechaue (22.04.2020), Apfeldorf (05.05.2020), Prittriching (05.05.2020), Roßhaupten (23.06.2020, 21.07.2020), Lechbruck-Campingplatz (13.10.2020), Mandichosee-Wasserwacht (10.11.2020)
10,1 bis 20,0	Prittriching (21.07.2020), Unterbergen (15.09.2020) und Mandichosee-Wasserwacht (15.09.2020)
20,1 bis 100	Roßhaupten (21.07.2020), Prittriching (21.07.2020), Schwabstadl (13.10.2020), Unterbergen (13.10.2020)
über 100	Mandichosee-Wasserwacht (15.09.2020, 13.10.2020, 27.10.2020), Schwabstadl (10.11.2020) und Mandichosee-Kraftwerk (10.11.2020)

Eine Tabelle mit den detaillierten Ergebnissen der Toxinmessungen kann dem Anhang entnommen werden (Anhang Tabelle 1).

Obwohl in einigen Proben mittels ELISA Test Anatoxin-a nachgewiesen werden konnte, lieferte der Nachweis des Anatoxin-a Gens mittels PCR für alle Proben ein negatives Ergebnis. Der Grund dafür war vermutlich die geringe DNA-Konzentration in den benthischen Proben. In Zukunft wird es auch an der LSI möglich sein, die DNA-Konzentrationen der Proben direkt nach der DNA-Extraktion zu bestimmen. Dazu wurde ein Mikrovolumen-Spektrometer angeschafft, so dass dieses Problem nicht mehr auftreten wird. Die Proben aus dem Projekt wurden damit jedoch nicht mehr vermessen.

Alle Proben der Studie wurden außerdem mittels PCR auf das Vorhandensein der Toxingene für Microcystin und Saxitoxin untersucht. In keiner der Proben konnten diese Toxingene nachgewiesen werden.

5.3. Charakterisierung der *Tychonema*-Zellen

5.3.1. Makroskopische Betrachtung

Erste Hinweise auf das Vorkommen von *Tychonema* lieferte das makroskopische Erscheinungsbild. Im Folgenden werden charakteristische Merkmale beschrieben, die bereits bei der Betrachtung vor Ort ohne Mikroskop auf ein mögliches Vorkommen von *Tychonema* hinweisen. Eine mikroskopische oder genetische Bestätigung eines Anfangsverdachts ist jedoch unerlässlich. *Tychonema* trat während der Untersuchungen im Jahr 2020 als benthischer Aufwuchs auf Sediment auf und bildete dabei einen dünnen Algent Teppich (vgl. Abb. 5A). Besonders häufig wurden solche benthischen Algent Teppiche auf größeren Steinen oder kiesigem Sediment vorgefunden. Außerdem wurde *Tychonema* in schwimmenden Algenmatten nachgewiesen (Abb. 5B). Diese *Tychonema*-Matten traten in den verschiedensten Größen auf. Des Weiteren konnte *Tychonema* auch als Aufwuchs auf Makrophyten vorgefunden werden. Der *Tychonema*-Biofilm wurde allerdings nur bei aufschwimmenden Makrophyten beobachtet. Allerdings war durch die Art der Probenahme ein Nachweis auf Makrophyten auch sehr unwahrscheinlich. Dies liegt darin begründet, dass die Probenahme vom Ufer aus durchgeführt wurde und der Uferbereich kaum von Makrophyten bewachsen war. Es konnten daher hauptsächlich angeschwemmte tote Pflanzenteile untersucht werden. Die Farbe der *Tychonema*-Zellen ist zumeist als rötliches Braun bis Violett wahrnehmbar, manchmal sind die Matten aber auch grünlich. Die Konsistenz der *Tychonema*-Zellaggregate ist schleimig und die Filamente lassen sich oftmals nur schwer voneinander oder vom Substrat lösen. Bei der Betrachtung der Zellen von Nahem, sind fädige Zellanhäufungen erkennbar. Dass makroskopisch fädige Filamente sichtbar werden, wird oft auch bei anderen fädigen Cyanobakterien beobachtet, wie zum Beispiel bei *Planktothrix rubescens* in Zellkultur.

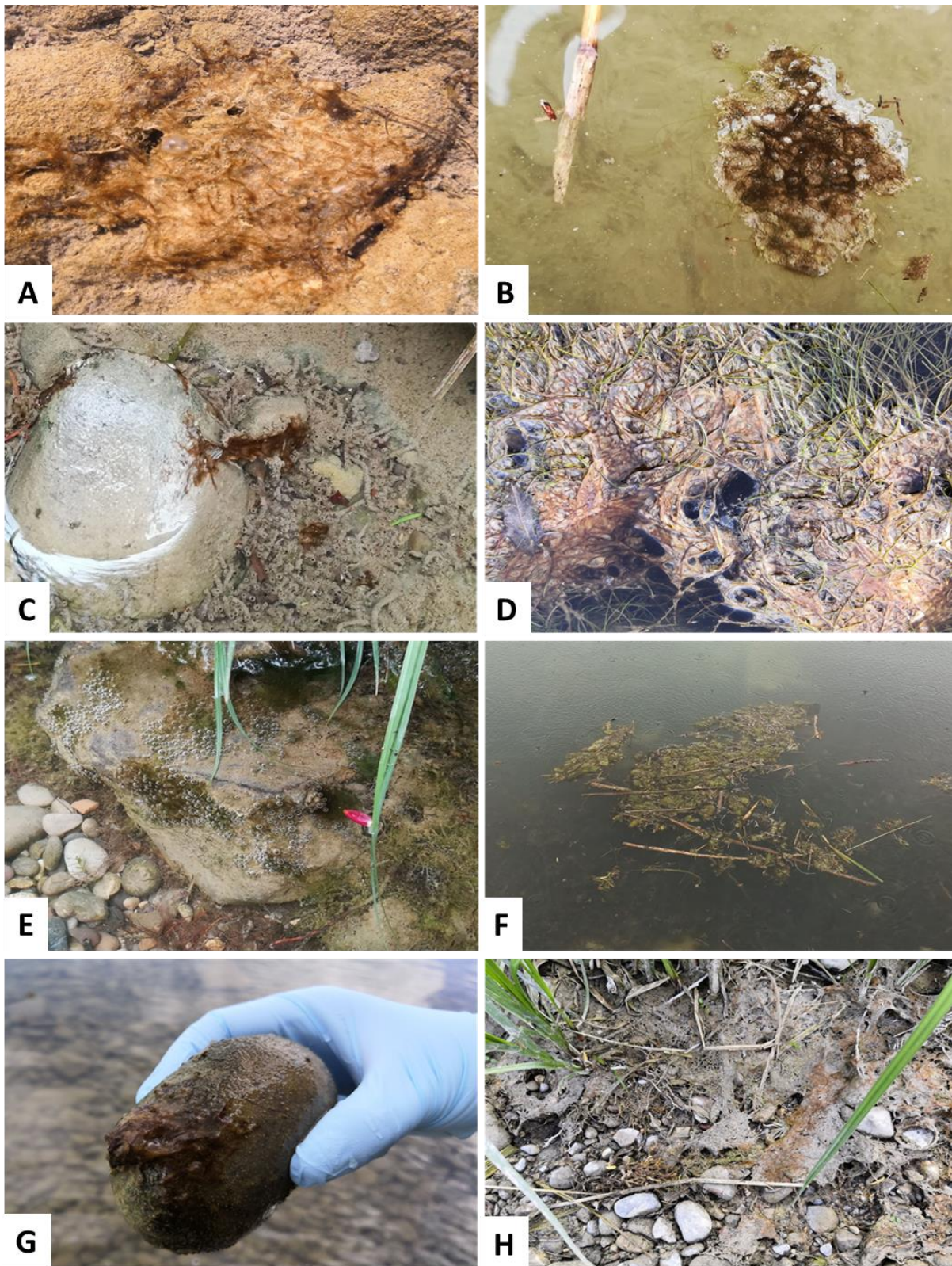


Abbildung 5 Makroskopische Erscheinungsformen von *Tychonema* sp. im Lech. **A** Feine *Tychonema*-Matte auf steinigem Sediment (sehr charakteristisch). **B** Kleiner Teil einer aufschwimmenden *Tychonema*-Matte (sehr charakteristisch). **C** Rötlich-brauner *Tychonema*-Film zwischen Stein und Sediment. **D** Rötlich-brauner *Tychonema*-Biofilm auf fädigen Makrophyten. **E** Grünlicher *Tychonema*-Biofilm auf einem Stein, es sind die typischen Sauerstoffblasen erkennbar, die infolge von Photosynthese entstehen. **F** Aufschwimmende *Tychonema*-Matte, gemischt mit Fadenalgen. **G** Rötlich-brauner *Tychonema*-Biofilm auf

einem Stein, schleimige Konsistenz sehr gut erkennbar. **H** Ausgetrockneter *Tychonema*-Biofilm im Uferbereich.

Wie bereits erwähnt, ist *Tychonema* nur basierend auf der makroskopischen Morphologie nicht eindeutig erkennbar. Es gibt auch andere benthisch vorkommende Algen und Cyanobakterien, die eine ähnliche Erscheinungsform im Freiland zeigen (Abb. 6). In diesen Proben konnte basierend auf den molekulargenetischen Methoden keine *Tychonema* nachgewiesen werden.

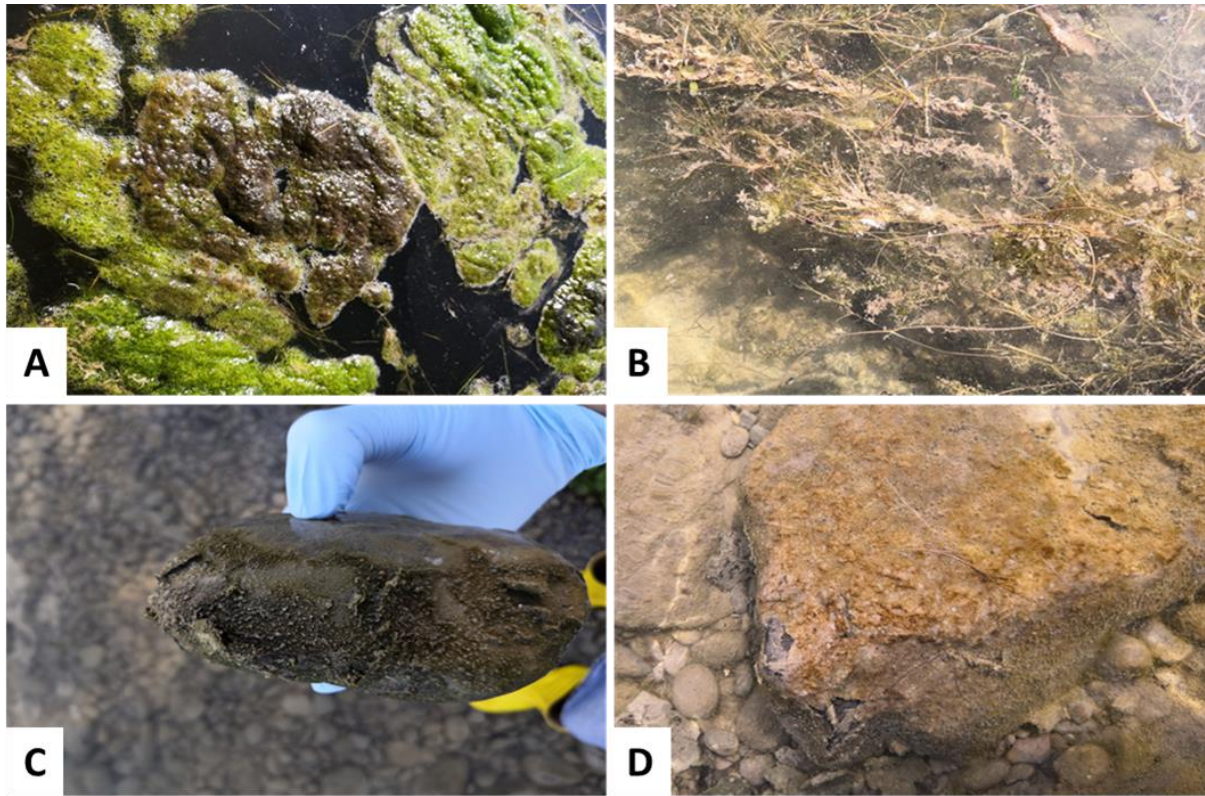


Abbildung 6 Erscheinungsformen anderer Cyanobakterien und Algen, die leicht makroskopisch mit *Tychonema* zu verwechseln sind. **A** Biofilm auf einer Fadenalge. **B** Biofilm auf Makrophyten. **C** Grün-braune Kruste auf einem Stein. **D** Bräunlicher Aufwuchs auf einem Stein.

5.3.2. Mikroskopische Betrachtung

Die Proben wurden bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopiert. Unter dem Mikroskop erscheint die Farbe der Zellen häufig hell, olivgrün, graubraun oder rotbraun bis violett (Abb. 7). Die Trichome erreichen oftmals Längen von mehreren hundert Mikrometern. Die einzelnen Zellen des Trichoms waren charakteristischerweise länger als breit. Die Zellwände sind nicht immer klar ersichtlich. *Tychonema*-Zellen besitzen keine Gasvesikel. Oftmals sind aber deutliche Granula innerhalb der Zellen erkennbar (Komarek und Anagnostidis, 2008).

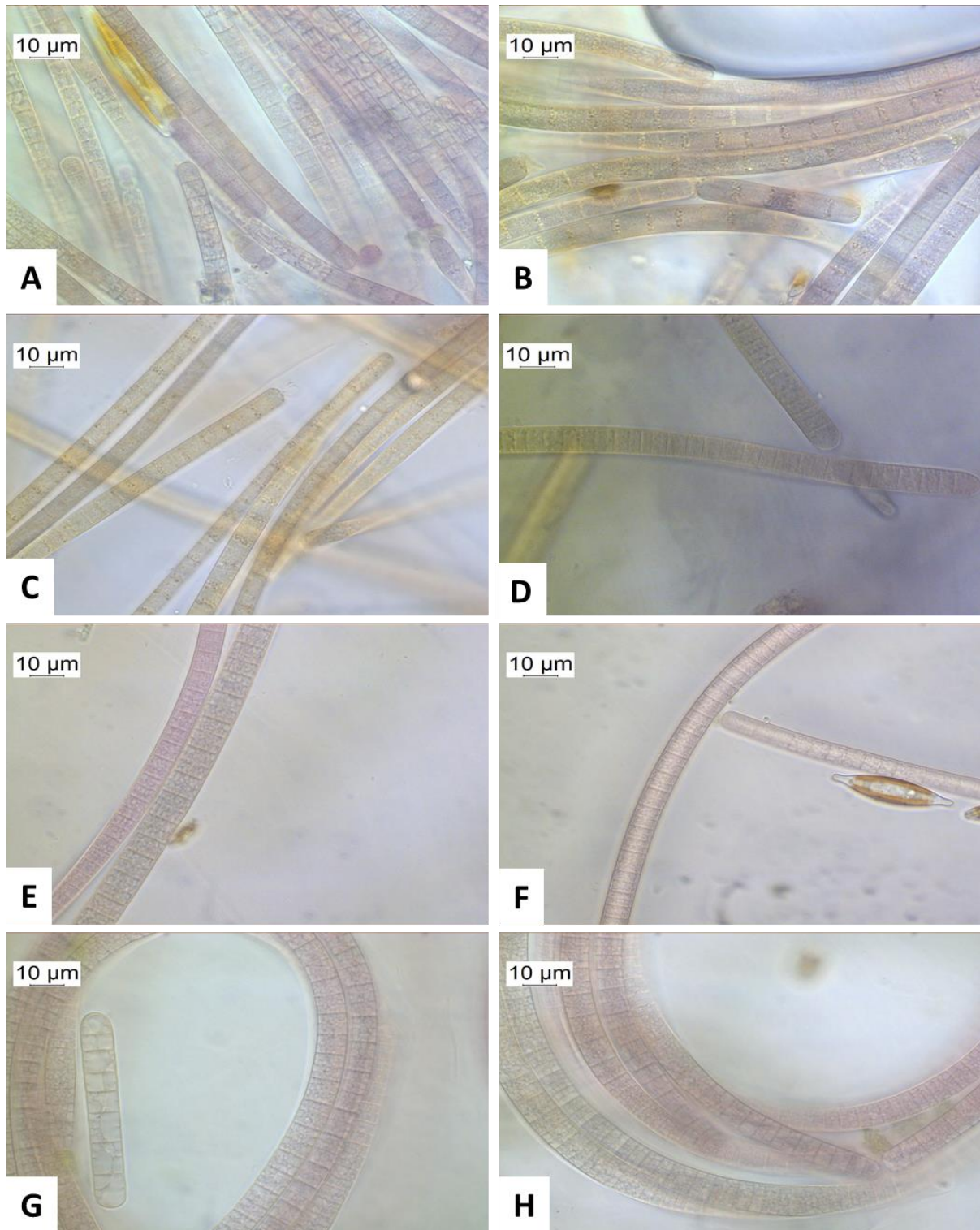


Abbildung 7 A-H Mikroskopisches Erscheinungsbild der *Tychonema*-Trichome des Lechs.

Neben *Tychonema* wurden auch andere fädige Cyanobakterien in den Proben nachgewiesen. Diese wurden den Oscillatoriales zugeordnet. Bei der Sequenzierung (Kap. 5.6) zeigte sich, dass neben *Tychonema* die Oscillatoriales *Microcoleus*, *Geitlerinema* und *Wilmottia* in den Proben vorhanden waren.

Im Rahmen der Studie wurde ein Bildkatalog erstellt, in dem Bilder aus dem Freiland und Mikroskopiebilder gegenübergestellt wurden. Dieser Katalog sollte dazu dienen, das Auge zu

schulen, um *Tychonema* in Zukunft auch schon an Hand makroskopischer Merkmale vermuten zu können. Neben den Bildern sind außerdem die Ergebnisse der molekularen Analysen beigelegt, so dass sicher bestätigt oder widerlegt werden konnte, dass es sich um *Tychonema* handelte. Dieser Bildkatalog ist in Form einer Excel-Datei auf der CD als Anhang dem Bericht beigelegt.

5.4. Physikalische Parameter an den Probenahmestellen

Temperatur

Die Durchschnittstemperaturen an den verschiedenen Probenahmestellen lagen über den Versuchszeitraum hinweg zwischen 10,5 °C (Lechaue) und 16,9 °C (Schwabstadl) (Abb. 8). An den Probenahmestellen zwischen Lechaue und Schwabstadl nahm die durchschnittliche Oberflächentemperatur kontinuierlich zu, was die Erwärmung des Wasserkörpers flussabwärts widerspiegelt. Die niedrige Temperatur in der Lechaue ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich in unmittelbarer Nähe der Probenahmestelle der Bachzulauf des Premer Mühlbachs befindet. Die Durchschnittstemperatur über alle Probenahmestellen hinweg lag bei 12,5 °C. *Tychonema* wurde in einem Temperaturbereich zwischen 6,5 und 23,5 °C detektiert. Die Werte an Probenahmestellen ohne *Tychonema* lagen in einem Bereich zwischen 6,7 und 23,3 °C. Durch die breite Temperaturverteilung sind mit den bisherigen Ergebnissen keine Temperaturpräferenzen feststellbar. Probenahmestellen, an denen nur benthische *Tychonema* vorgefunden wurde wiesen eine Durchschnittstemperatur von 16,3 °C auf. Die Durchschnittstemperatur der Probenahmestellen, bei denen nur pelagische *Tychonema* detektiert wurde lag bei 13,1 °C. Die Durchschnittstemperaturen der Probenahmestellen ohne *Tychonema* lag bei 14,8 °C. Der Temperatur scheint für das Auftreten der *Tychonema* im Lech eine untergeordnete Bedeutung zu zukommen.

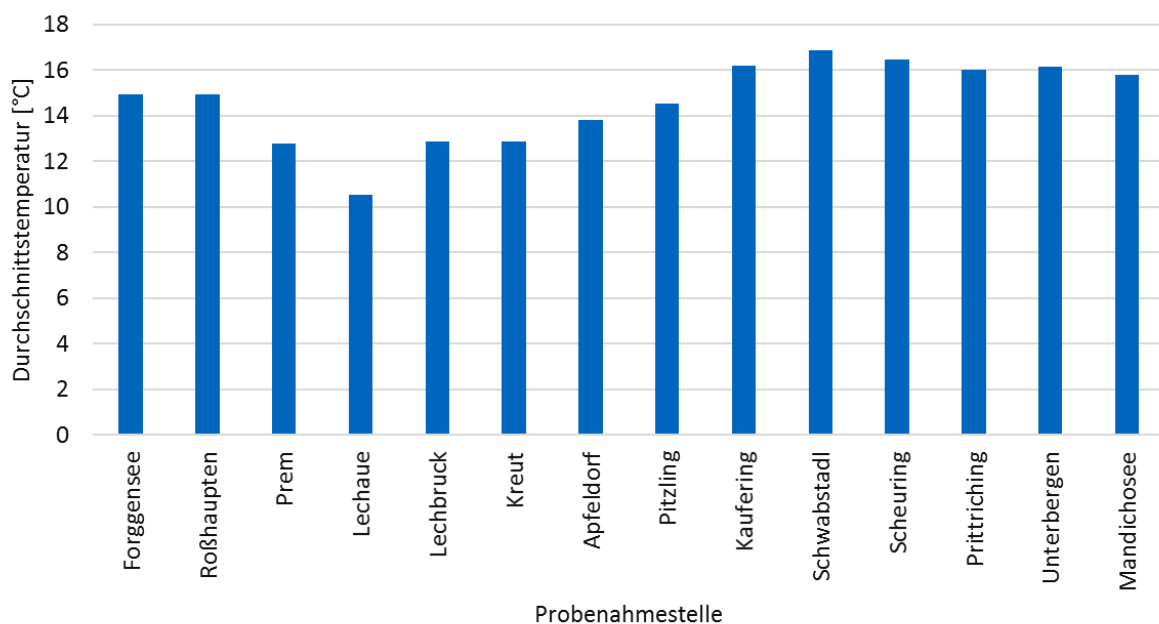


Abbildung 8 Durchschnittstemperaturen an den Probenahmestellen über den Versuchszeitraum hinweg.

Weitere physikalische Parameter

Die Sauerstoffsättigung, die vom Sauerstoffgehalt und der Temperatur abhängig ist, lag in einem Bereich zwischen 80,1 % und 149 % (Tabelle 4). Diese Werte zeigen an, dass alle Probenahmestellen sauerstoffreich waren. Da die Messungen an der Wasseroberfläche gemacht wurden, war das so zu erwarten. Besonders hohe Werte wurden an den Probenahmestellen Mandichosee-Kraftwerk, Mandichosee-Wasserwacht, Scheuring, Schwabstadl, Kaufering und Mandichosee-Parkplatz gemessen. Hohe Werte über 100 % indizieren immer eine sehr hohe akute Photosyntheseaktivität (Schwoerbel und Brendelberger, 2021).

Die pH-Werte der verschiedenen Probenahmestellen variierten zwischen 8,3 und 8,9 und waren an allen Probenahmestellen sehr ähnlich (Tabelle 4). Die gemittelten elektrischen Leitfähigkeiten erreichten Werte zwischen 315 und 520 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Tabelle 4). Die höchsten Werte wurden in Lechbruck-Kneippbecken und in der Lechaue erreicht. Die gemittelte Leitfähigkeit nahm tendenziell von Süden nach Norden in Fließrichtung des Lechs zu. Die Leitfähigkeiten an den Probenahmestellen des Mandichosees lagen zwischen 347 und 349 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Tabelle 4 Übersicht über die physikalischen Parameter Sauerstoffgehalt und -sättigung, pH-Wert und gemittelte elektrische Leitfähigkeit.

Probenahmestelle	Sauerstoffgehalt [mg/l]	Sauerstoffsättigung [%]	pH-Wert	Gemittelte elektrische Leitfähigkeit [$\mu\text{S}/\text{cm}$]
0-Forggensee	9,0-10,8	99,4-114	8,3-8,8	315
1-Roßhaupten	9,3-10,9	99,4-120	8,3-8,8	317
2-Prem	9,1-10,9	100-107	8,3-8,9	321
2a-Lechaue	9,3-11,4	94,7-108	7,9-8,4	489
3 Lechbruck				
3.1-Kneippbecken	7,5-11,3	80,1-125	8,0-8,6	520
3.2-Campingplatz	8,2-11,5	81,5-114	8,1-8,6	433
3.3-Kraftwerk	9,2-11,2	95,8-115	8,3-8,6	321
3.4-Urspring	10,0-12,3	98,7-125	8,3-8,6	342
5-Kreut	9,6-11,3	100-117	8,3-8,8	333
9-Apfeldorf	7,3-10,7	82,9-111	8,3-8,5	348
14-Pitzling	8,6-10,8	98,5-119	8,3-8,7	349
18-Kaufering	9,4-12,4	104,6-149	8,4-8,8	346
19-Schwabstadl	9,8-12,6	101-151	8,2-8,9	368
20-Scheuring	10,6-13,8	103-154	8,5-8,8	346
21-Prittriching	9,1-11,6	107-133	8,4-8,9	347
22-Unterbergen	10,4-11,9	103-140	8,4-8,8	349
23 Mandichosee				
23.1-Wasserwacht	8,5-13,1	94,7-162	8,3-8,8	349
23.2-Parkplatz	8,9-12,1	93,3-147	8,3-8,7	347
23.3-Kraftwerk	9,0-15,3	101-188	8,2-8,8	347

Physikalische Messungen während der Mischprobenahme am Mandichosee

Die Mischprobenahme am Mandichosee am 27.10.2020 erfolgte mit Einsetzen der Herbstzirkulation. Der See war zu diesem Zeitpunkt bereits fast vollständig durchmischt und wies von der Oberfläche bis in 4 m Tiefe eine Temperatur von 10,2 °C auf. Die Sauerstoffsättigung lag bei etwa 97 %, der pH-Wert bei 8,3 und die elektrische Leitfähigkeit bei 380 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Die Secchitiefe

wurde mit 2,5 m bestimmt, was einer euphotischen Zone von 6,3 m entspricht. Der Mandichosee ist daher in weiten Teilen bis zum Gewässergrund durchlichtet. An der Probenahmestelle in der Mitte des Sees wurde eine maximale Wassertiefe von 7,9 m festgestellt.

5.5. Habitatcharakterisierung

Die Fließgeschwindigkeit lag an allen Probenahmestellen unter der Messgrenze von 10 cm/s. Eine Ausnahme bildete die Probenahmestelle Urspring (3.4) in Lechbruck. Dort wurden einmal 15 cm/s gemessen, diese leichte Erhöhung der Fließgeschwindigkeit konnte allerdings auf den Wind zurückgeführt werden.

Sedimentcharakterisierung

Die ermittelten Sedimente für die Probestellen werden in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Ermittelte Sedimente der verschiedenen Probenahmestellen. Y: Blöcke, X: Steine, G: Kies, S: Sand, U: Schluff, T: Ton.

Probenstelle	Korngrößenverteilung [geschätzt in %]	Bezeichnung	Besonderheiten
Forggensee	15 S, 50 G, 30 X, 5 Y	steiniger Grobkies	
Roßhaupten	20S, 70 G, 10 X	sandiger Mittelkies	vereinzelte Blöcke
Prem	100 T	Ton	betonierte Staumauer
Lechaue	70 U, 20 S, 10 G	sandiger Schluff	mit Schlamm und feinem Substrat bedeckt
Lechbruck Kneipp-Becken	60 U, 20 S, 15 G, 5 X	Schluff	mit Schlamm und feinem Substrat bedeckt
Lechbruck Campingplatz	20 S, 70 G, 10 X	sandiger Mittelkies	vereinzelte Blöcke
Lechbruck Kraftwerk	100 T	Ton	betonierte Staumauer
Lechbruck Urspring	10 S, 70 G, 20 X	steiniger Grobkies	Steine teils mit Grünalgen bewachsen
Kreut	15 U, 25 S, 60 G	sandiger Mittelkies	
Apfeldorf	5 S, 65 G, 20 X, 10 Y	steiniger Grobkies	betonierte Einstiegsrampe
Pitzling	U 50, S 20, G 30	kiesiger Schluff	viel aufschwimmendes Pflanzenmaterial
Kaufering	10 U, 10 S, 50 G, 30 Y	Mittelkies mit Blöcken	betonierte Einstiegsrampe
Schwabstadl	10 U, 30 S, 60 G	sandiger Mittelkies	
Scheuring	30 U, 20 S, 50 G	schluffiger Mittelkies	Grünalgenaufwuchs
Prittriching	30 S, 40 G, 10 X, 20 Y	sandiger Mittelkies	betonierte Einstiegsrampe
Unterbergen	10 S, 60G, 10 X, 20 Y	Grobkies mit Blöcken	betonierte Einstiegsrampe
Mandichosee Wasserwacht	10 U, 20 S, 70 G	sandiger Mittelkies	geringe Fläche mit Schlamm bedeckt
Mandichosee Parkplatz	20 S, 80 G	sandiger Mittelkies	

Mandichosee	20 S, 60 G, 15 X, 5 Y	sandiger
Kraftwerk		Mittelkies

An den Probestellen Prem und Lechbruck wurde der Untergrund durch den Beton der Staumauern gebildet. Im weiteren Sinne wurde dieser als feinkörnige Matrix (Ton) bewertet. Feines Material der Schlufffraktion wurde in der Lechaue, Lechbruck-Kneippbecken und in Pitzling vorgefunden. An allen anderen Probestellen dominierte ein kiesiges Sediment.

Makrophyten an den Probenahmestellen

Die folgenden Makrophytengattungen wurden wachsend oder schwimmend an den Probenahmestellen vorgefunden: *Elodea* (Wasserpest), *Hippuris* (Tannwedel), *Myriophyllum* (Tausendblatt), *Potamogeton* (Laichkraut), *Ranunculus* (Wasserhahnenfuß) und *Schoenoplectus* (Teichbinse). Außerdem wurde an vielen Probenahmestellen das Vorkommen von Fadenalgen dokumentiert. Diese Fadenalgen waren oftmals mit *Tychonema* vergesellschaftet. An der Probenahmestelle Kreut wurde zudem *Fontinalis* (Quellmoos) vorgefunden. Eine genaue Zuordnung der wachsenden und schwimmenden Makrophyten ist den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen.

Tabelle 6 Makrophyten an den verschiedenen Probenahmestellen zwischen Forggensee und Unterbergen.**Tychonema* als Aufwuchs detektiert.

	Forggensee	Roßhaupten	Prem	Lechaue	Lechbruck Kneipp- becken	Lechbruck Campingplatz	Lechbruck Kraftwerk	Lechbruck Ursprung
Makrophyten Wachsend		Elodea, Potamogeton	Fadenalgen	Elodea, Fadenalgen, Hippuris, Myriophyllum, Potamogeton, Schoenoplectus	Faden- algen	Elodea, Fadenalgen, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton
Makrophyten Schwimmend	Potamogeton	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen, Potamogeton, Ranunculus	Elodea, Fadenalgen, Hippuris, Myriophyllum, Potamogeton, Schoenoplectus	Elodea, Fadenalgen	Elodea, Fadenalgen*, Hippuris, Myriophyllum, Potamogeton*	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton	Elodea, Hippuris, Myriophyllum, Potamogeton*
	Kreut	Apfeldorf	Landzunge Pitzling	Kaufering	Schwabstadl	Scheuring	Prittriching	Unterbergen
Makrophyten Wachsend	Elodea, Fadenalgen, Potamogeton	Elodea	Fadenalgen	Elodea, Fadenalgen, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen	Elodea, Fadenalgen, Potamogeton
Makrophyten Schwimmend	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton, Quellmoos*	Elodea, Fadenalgen*, Myriophyllum, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen*, Fadenalgen*, Myriophyllum, Potamogeton	Elodea*, Fadenalgen*, Myriophyllum, Potamogeton	Myriophyllum

Tabelle 7 Makrophyten an den verschiedenen Probenahmestellen des Mandichosees. **Tychonema* als Aufwuchs detektiert.

	Mandichosee Wasserwacht	Mandichosee Parkplatz	Mandichosee Kraftwerk
Makrophyten Wachsend	Elodea, Fadenalgen, Potamogeton	Elodea, Fadenalgen	Fadenalgen
Makrophyten Schwimmend	Elodea*, Fadenalgen*, Myriophyllum*, Potamogeton*	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton, Ranunculus	Elodea, Fadenalgen, Myriophyllum, Potamogeton

5.6. Ergebnisse der Sequenzierung

Die Sequenzierung lieferte 19 Cyanobakteriengattungen in den benthischen Proben und 20 Gattungen in den pelagischen Proben. Zunächst wurden in den Graphen die einzelnen Arten jeder Gattung unterschieden. Diese sehr detaillierten Ergebnisse können dem Anhang entnommen werden (Anhang Abbildungen 1 und 2). Zur besseren Übersicht wurden im Folgenden (Abb.9) alle OTUs, die Arten einer Gattung entsprechen zur jeweiligen Gattung zusammengefasst und in der Abbildung nicht weiter auf Artebene unterschieden. Es wurden z. B. alle 13 OTUs, die Arten der Gattung *Leptolyngbya* zugeordnet wurden, zur Gattung *Leptolyngbya* zusammengefasst. Die Gattung *Tychonema* wurde auf Basis der Sequenzdaten in zwei Arten eingeteilt, von denen eine nur in geringen Anteilen an der Probenahmestelle Lechbruck-Campingplatz und im Mandichosee nachgewiesen werden konnte.

Insgesamt wurden von 54 Proben sowohl die benthischen als auch die pelagischen Cyanobakteriengemeinschaften untersucht. In 78 % dieser Proben wurde *Tychonema* in mindestens einer der beiden Proben detektiert. In 50 % der *Tychonema*-positiven Proben konnte *Tychonema* sowohl in der benthischen als auch in der pelagischen Probe nachgewiesen werden. Es gab allerdings auch einen Anteil von 24 % der Proben, in denen *Tychonema* nur in den benthischen Proben detektiert worden ist. Genauso verhält es sich umgekehrt, so wurde *Tychonema* bei 26 % der Proben nur in der pelagischen Probe detektiert. Die prozentualen Anteile von *Tychonema* in den benthischen Proben variierten zwischen 0 und 100 % (Apfeldorf, 5.5.2020), in den pelagischen Proben zwischen 0 und 79 % (Prittriching, 26.05.2020) in Bezug auf die gesamte Cyanobakteriengemeinschaft.

Die cyanobakteriellen Gemeinschaften der benthischen und der pelagischen Proben waren sehr unterschiedlich.

Die benthischen Proben waren sehr divers (Abb. 9). Neben *Tychonema* dominierten in den benthischen Proben die Gattungen *Leptolyngbya*, *Scytonema* und *Microcoleus*. In einer Probe dominierte *Potamolimnea* (Lechbruck-Campingplatz, 21.07.2020) und in einer Probe *Pseudanabaena* (Landzunge Pitzling, 18.08.2020). Weitere wichtige Gattungen in den benthischen Proben waren *Calothrix* und *Geitlerinema*. In zehn der 51 benthischen Proben erreichte *Tychonema* einen Anteil von über 90 %. Die einzige Probenahmestelle, an der keine benthischen

Tychonema-Vorkommen nachgewiesen wurden, ist die Landzunge Pitzling. Allerdings wurde dort auch nur eine benthische Probe aus dem ganzen Probenahmezeitraum sequenziert. Die Gattungen *Calenema* und *Wilmottia* wurden nur in den benthischen Proben detektiert.

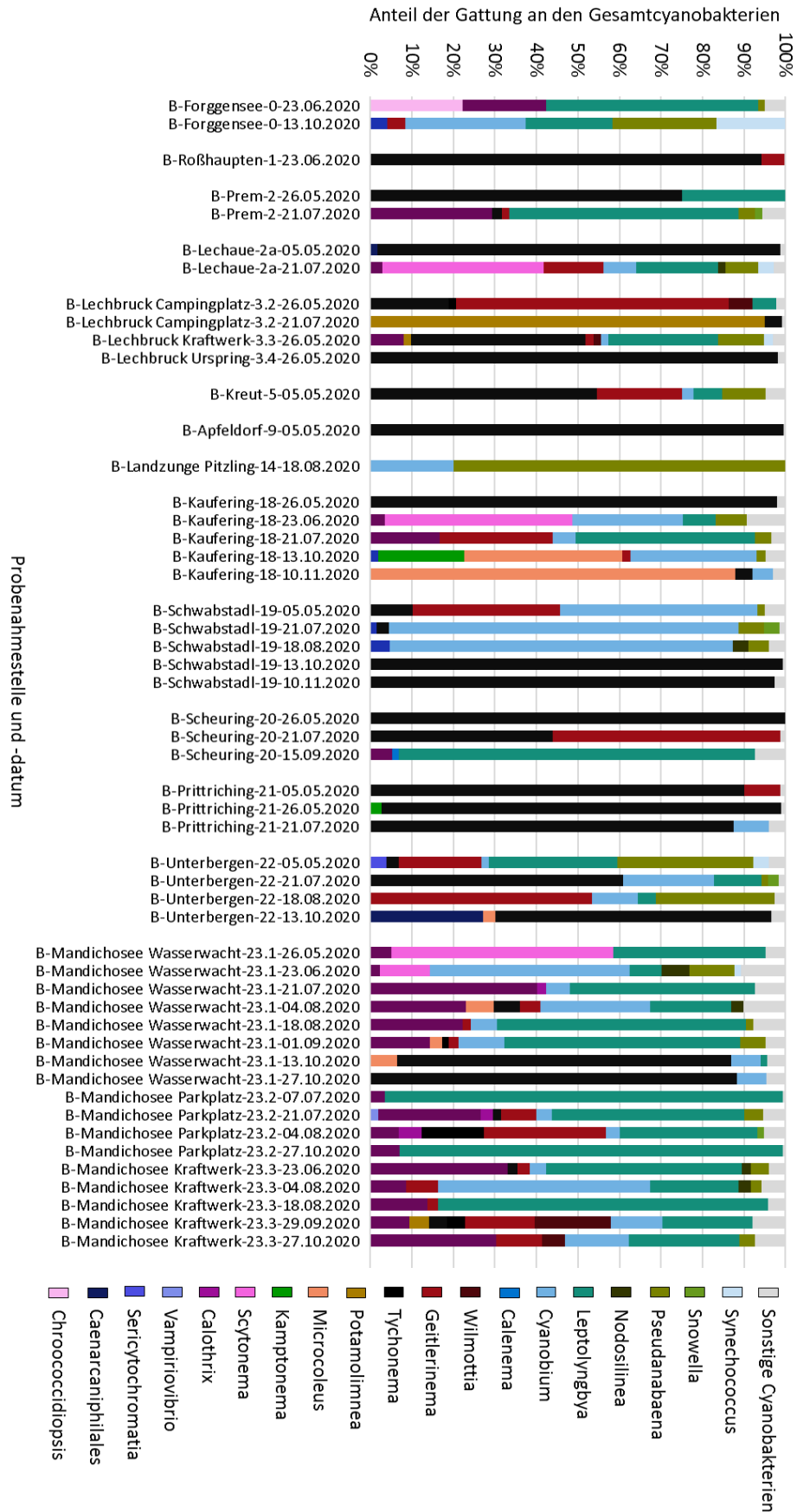


Abbildung 9 Übersicht über die Cyanobakteriengattungen in den benthischen Proben (vereinfacht).

Die pelagischen Proben wurden zum Großteil von der Gattung *Cyanobium* dominiert (Abb. 10). Einige Freiwasserproben von den Probenahmestellen Lechaue, Apfeldorf, Prittriching und Mandichosee-Wasserwacht und -Parkplatz wurden von der Gattung *Tychonema* dominiert. Im Mandichosee wurde die Dominanz von *Tychonema* in der Cyanobakteriengemeinschaft des Freiwassers im Herbst (Oktober) beobachtet, an den anderen Probenahmestellen zu Beginn der Untersuchungen im Mai. In den pelagischen Proben wurden folgende weitere Gattungen häufig angetroffen: *Geitlerinema*, *Snowella* und *Pseudanabaena*. Die Gattungen *Limnothrix* und *Microcystis* sowie *Candidatus obscuribacter* wurden ausschließlich in den pelagischen Proben nachgewiesen.

In der Mischprobe, die am 27.10.2020 aus dem Mandichosee entnommen wurde, konnten neben der Hauptgattung *Cyanobium* auch die Gattungen *Geitlerinema*, *Tychonema*, *Kamptonema* und *Candidatus obscuribacter* nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war der Mandichosee bereits auf Grund der beginnenden Herbstzirkulation zum Großteil durchmischt (vgl. Kap. 5.4).

In Lechbruck und am Mandichosee wurde in wenigen Proben ein zweites *Tychonema*-OTU detektiert (Anhang Abb. 1 und 2). Dabei handelt es sich vermutlich um eine zweite Art. In der benthischen Probe vom 04.08.2020, die von der Probenahmestelle Mandichosee-Parkplatz stammte, wurde bei der Sequenzierung ausschließlich dieses OTU nachgewiesen. Im mikroskopischen Bild dieser Probe, lässt sich kein Unterschied zu anderen *Tychonema* Trichomen erkennen.

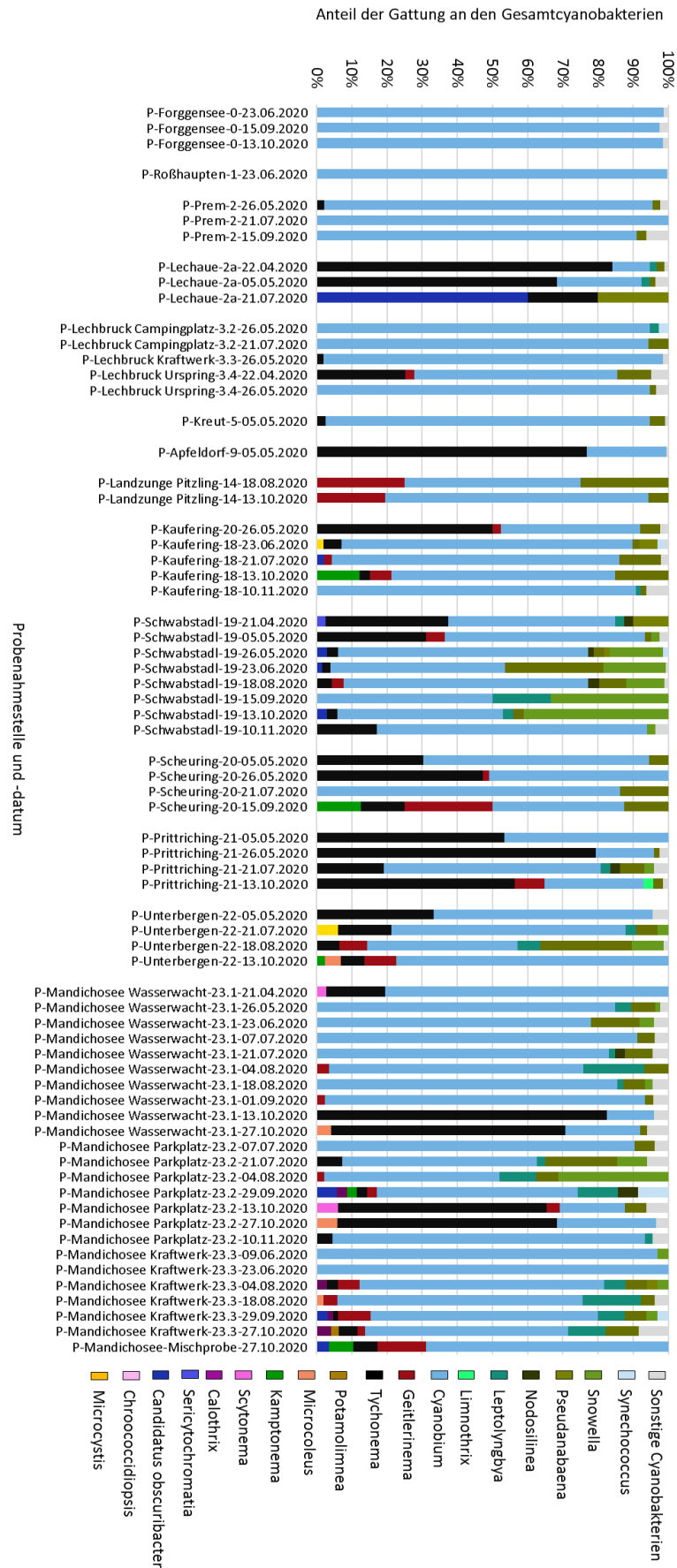


Abbildung 10 Übersicht über die Cyanobakteriengattungen in den pelagischen Proben (vereinfacht).

6. Diskussion

6.1. Wichtige Begleitgattungen

Neben der Gattung *Tychonema* konnten mittels Sequenzierung auch weitere Cyanobakteriengattungen entdeckt werden, die von Interesse sind. In den benthischen Proben dominierten neben *Tychonema* die Gattungen *Leptolyngbya* (Synechococcales), *Scytonema* (Nostocales) und *Microcoleus* (Oscillatoriales). Außerdem wurden auch *Calothrix* (Nostocales) und *Geitlerinema* (Oscillatoriales) vielfach detektiert. Gattungen, die ausschließlich in den benthischen Proben nachgewiesen wurden sind *Wilmottia* (Oscillatoriales) und *Calenema* (Synechococcales). Alle oben genannten Gattungen gehören zu den filamentösen Cyanobakterien. Mikroskopisch sind sie oftmals nur schwer von *Tychonema* zu unterscheiden. *Tychonema* und *Microcoleus* sind zudem auch phylogenetisch sehr nahe verwandt (Conklin et al., 2020). So ist auch *Microcoleus* als Produzent von Anatoxin-a und Dihydroanatoxin-a bekannt (Wood et al., 2018; Puddick et al., 2021).

In den pelagischen Proben dominierte *Cyanobium*, eine Cyanobakteriengattung, die sehr häufig im Freiwasser vieler, oft nährstoffarmer, Gewässer zu finden ist und bisher nicht als Toxinproduzent bekannt ist. Außerdem wurde neben *Tychonema* auch häufig die Gattung *Geitlerinema* detektiert, die auch sehr dominant in den benthischen Proben war. *Geitlerinema* war ursprünglich eine Untergattung der Gattung *Phormidium*, ist inzwischen aber eine eigenständige Gattung innerhalb der Ordnung der Oscillatoriales (Anagnostidis et al., 1989). Bei einer Studie konnte gezeigt werden, dass einige *Geitlerinema*-Stämme ein bisher unbekanntes Cyanotoxin produzierten. Die Stämme für die erwähnte Studie wurden ursprünglich aus brasilianischen Staustufen isoliert (Rangel et al., 2013).

Auch die in den benthischen Proben detektierte Gattung *Wilmottia* ist eine neue Gattung, die von der Gattung *Phormidium* abgespalten wurde. Auch wenn eine sehr große morphologische Ähnlichkeit zu *Phormidium* besteht, konnte keine phylogenetische Ähnlichkeit festgestellt werden. Früher wurde davon ausgegangen, dass *Wilmottia* nur in kalten und temperierten Regionen der Welt vorkommt. Inzwischen ist jedoch erwiesen, dass Vertreter dieser Gattung die unterschiedlichsten Habitate besiedeln können (Strunecký et al., 2011; Machado-De-Lima et al., 2017). Auch *Calenema* ist eine neue Gattung, die erst 2017 beschrieben wurde (Brito et al., 2017).

Die Gattungen *Scytonema*, *Microcoleus* und *Calothrix* sind zur Stickstofffixierung befähigt (Linne von Berg, 2012) und besitzen dadurch bei Stickstoffmangel im Gewässer einen Konkurrenzvorteil. Einige der Gattungen können sich aktiv gegen UV-Strahlung schützen: So hat *Scytonema* gefärbte Zellwände und *Calothrix* eingefärbte Gallertscheiden, die die Zellen umschließen (Linne von Berg, 2012).

Neben *Tychonema* kommt auch *Microcoleus* im Lech als Anatoxin-a Produzent in Frage. Außerdem gibt es *Phormidium*-Stämme, die zur Anatoxin-a Produktion befähigt sind. Im Zuge des Projekts wurde zwar die Gattung *Phormidium* nicht detektiert, allerdings einige Vertreter neuer Gattungen, die aus der Gattung *Phormidium* hervorgegangen sind. Darüber hinaus gibt es auch *Scytonema*-Stämme, die zur Produktion von Saxitoxin befähigt sind (Smith et al., 2012).

6.2. Toxizität

Anatoxin-a ist ein Nervengift, welches den Nikotin-Rezeptor hemmt. Die akute Toxizität dieses Cyanotoxins ist durch schnell einsetzende Lähmungen, Zittern, Krämpfe und den Tod gekennzeichnet (Rogers et al., 2005). Die ersten Symptome treten dabei innerhalb weniger Minuten auf, der Tod folgt meist innerhalb einer Stunde (Puschner et al., 2008). Die letale

Dosis (LD₅₀) bei oraler Aufnahme des Anatoxin-a liegt zwischen 3 und 6 mg/kg Körpergewicht (Cyanocenter, 2021). Nach einer Vergiftung mit einer sub-letalen Dosis tritt eine vollständige Erholung auf (Fawell et al., 1999).

In ausgewählten Proben wurde auch in der Saison 2020 Anatoxin-a nachgewiesen. Die höchsten Konzentrationen wurden dabei im Mandichosee im Herbst erreicht. Auch in Schwabstadt wurde im Herbst einmalig ein Wert über 100 µg/l bestimmt. Der Höchstwert von 220 µg/l wurde in einer Probe gemessen, die am 27.10.2020 vor der Wasserwacht am Mandichosee entnommen wurde. In der Untersuchungsperiode 2019 erreichten die Anatoxin-a Gehalte in den Proben Werte von bis zu 453 µg/l. Die Werte 2020 sind im Vergleich dazu etwas niedriger, liegen aber in einer ähnlichen Größenordnung. Im Jahr 2020 wurden die höchsten Werte ebenfalls an der Probestelle Mandichosee-Wasserwacht erreicht (Bauer et al., 2020). Auch wenn die Werte ähnlich sind, ist festzustellen, dass im Untersuchungsjahr 2020 keine Massenansammlungen von *Tychonema* im Mandichosee vorhanden waren. Somit wäre es für vulnerable Gruppen oder auch Hunde in der Vegetationsperiode kaum möglich gewesen, durch Schlucken letale Dosen von Anatoxin-a aufzunehmen. Bei einer erneuten Massenansammlung von *Tychonema* sollte in Zukunft aber immer höchste Vorsicht geboten sein. Nach den Ergebnissen der Untersuchungsjahre 2019 und 2020 ist davon auszugehen, dass bei einer Massenansammlung erneut mit großen Mengen an Anatoxin-a in den Algenmatten zu rechnen ist. Ausgehend von der Annahme, dass der Anatoxin-a Gehalt pro Gramm Frischgewicht in einem ähnlichen Bereich bleibt, steigt der Anatoxin-a Gehalt im Gewässer vermutlich direkt proportional zur *Tychonema*-Biomasse. In einer Studie wurde beobachtet, dass hohe Temperaturen oder hohe UVB-Strahlung zu einer schnellen Degradation von Anatoxin-a führen können (Kaminski et al., 2013). Beim Abbau entstehen jedoch Stoffwechselprodukte wie Dihydroanatoxin-a (Osswald et al., 2007), über dessen Toxizität Studien mit widersprüchlichen Aussagen existieren. Frühere Studien legen nahe, dass Dihydroanatoxin-a etwa zehnmal weniger toxisch ist als Anatoxin-a (Bates et al., 1979; Wonnacott et al., 1991). Eine neuere Studie zeigt hingegen, dass die orale Aufnahme von Dihydroanatoxin-a wesentlich toxischer wirkt als die Aufnahme von Anatoxin-a (Puddick et al., 2021). In den Proben der Untersuchungen 2019 wurde neben Anatoxin-a, Dihydroanatoxin-a in sehr großen Mengen durch LC-MS/MS detektiert (Bauer et al., 2020). Die Proben der Vegetationsperiode wurden nur hinsichtlich des Anatoxin-a-Gehalts analysiert. Ob es sinnvoll wäre, neben dem Anatoxin-a in Zukunft auch vermehrt das Dihydroanatoxin-a zu untersuchen, ist bisher noch nicht geklärt. Die Expertise in dieser Thematik liegt dabei beim Cyanocenter des Umweltbundesamtes.

6.3. Verbreitung und Fortpflanzung

Tychonema wurde 2020 basierend auf den PCR Daten an allen Probenahmestellen außer dem Kraftwerk bei Lechbruck vorgefunden. Bei der Kombination der Ergebnisse der PCR mit den etwas sensibleren Sequenzierdaten wurde allerdings an jeder Probenahmestelle an mindestens einem Probenahmedatum *Tychonema* vorgefunden.

Seltener wurde *Tychonema* an den südlichen Probenahmestellen detektiert. Hierbei dominierten die benthischen Formen. In Richtung Norden wurde häufiger *Tychonema* nachgewiesen. An den Probenahmestellen 14 bis 22 und 23.2 wurde *Tychonema* vorwiegend im Freiwasser detektiert. Da es auch Probenahmestellen gibt, an denen ausschließlich in den benthischen Proben *Tychonema* nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen sehr lokal auf der Algenmatte wachsen und ein Nachweis im Freiwasser nicht zwangsläufig erfolgt. Bei den *Tychonema*-Zellen, die im Freiwasser detektiert wurden, handelt es sich also sehr wahrscheinlich

um eine pelagische Form. Zunächst wurde in Erwägung gezogen, dass es sich hierbei um eine andere Art handeln könnte. Die Sequenzdaten widerlegen diese Vermutung allerdings, da es sich bei beiden Formen um das gleiche *Tychonema* OTU (Art) handelt. Wahrscheinlicher ist es, dass in den Freiwasserproben die Hormogonien nachgewiesen wurden. Hormogonien sind spezialisierte Zellen vieler fädiger Cyanobakterien, die der Fortpflanzung dienen. Diese Hormogonien sind wenigzellige Fadenfragmente, die oftmals zu Kriechbewegungen befähigt sind. Sie dienen der Verbreitung von Cyanobakterien (Herdmann & Rippka, 1988; Linne von Berg, 2012). Abbildung 11 zeigt ein Hormogonium der Gattung *Tychonema*, welches in einer Probe mikroskopisch detektiert wurde, die am 05.05.2020 in Apfeldorf entnommen wurde. Zu diesem Zeitpunkt herrschte in Apfeldorf ein Massenvorkommen von *Tychonema* vor. In Studien wurde beobachtet, dass Hormogonien auch oftmals gebildet werden, wenn Kulturen, die sich in der stationären Phase befinden, in neues Medium überführt werden (Herdmann und Rippka, 1988). Bei *Tychonema* lösen sich die Trichome in vielzählige Hormogonien auf, die Großteils unbeweglich, manchmal jedoch auch zu Kriechbewegungen befähigt sind (Komarek und Anagnostidis, 2008).

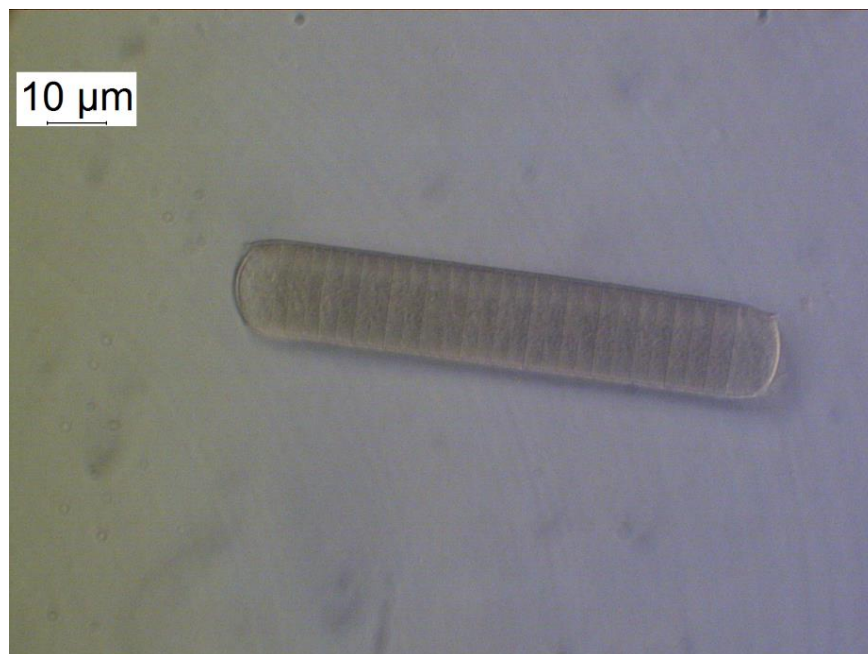


Abbildung 11 Hormogonium der Gattung *Tychonema*, 1000-fach vergrößert. Isoliert an der Probenahmestelle Apfeldorf am 05.05.2020.

An einer Probenahmestelle, der Landzunge Pitzling, wurde *Tychonema* nur in den Freiwasserproben nachgewiesen. Offensichtlich sind die Bedingungen an diesem Standort ungünstig für eine längerfristige Besiedelung des Untergrunds.

6.4. Habitatansprüche

In der Studie wurden auch die Habitatbedingungen an den Probenahmestellen aufgenommen. Dazu wurde die Fließgeschwindigkeit gemessen. Außerdem wurde das Substrat an den Probestellen charakterisiert. Neben diesen abiotischen Faktoren wurden auch die Makrophyten dokumentiert, die an den Probenahmestellen vorgefunden wurden.

Die Fließgeschwindigkeit war an allen Probenahmestellen sehr gering, die Werte waren alle unter der Nachweisgrenze von 10 cm/s. Natürlich gibt es auch viele Stellen im Lech, an denen die Fließgeschwindigkeit höher ist, wie z. B. im Stadtgebiet Landsberg. Diese Stellen wurden aber im Rahmen der Studie nicht untersucht, da bevorzugt Stellen ausgewählt wurden, die gut zugänglich sind und an denen ein *Tychonema*-Vorkommen vermutet wurde. Die Auswahl der Probenahmestellen geht bereits auf die Voruntersuchungen im Rahmen der Studie CYTOXKLIMA zurück. In Flüssen besiedeln Cyanobakterien oftmals den benthischen Lebensraum und bilden dort Matten (Scott und Marcarelli, 2012; Wood et al., 2018). Faktoren die dabei das Vorkommen und die Biomasse von Cyanobakterien bestimmen sind die Turbulenzen des Wasserkörpers, das Trockenfallen des Substrats, Temperatur, Licht, Nährstoffgehalte und Fressfeinde, sogenannte „Weidegänger/Grazer“-Organismen. Das hyporheische Interstitial („Flussbett“) ist dabei ein wichtiger Rückzugsort für alle benthischen Organismen (Scott und Marcarelli, 2012). In diesem Lebensraum können benthische Organismen zeitlich begrenzte ungünstige Bedingungen, wie auch kurzzeitig hohe Fließgeschwindigkeiten überdauern.

An einem Großteil der Probenahmestellen dominierte kiesiges Sediment, welches offenbar für *Tychonema* einen geeigneten Untergrund darstellt. Ein Beispiel dafür zeigt Abb. 12.



Abbildung 12 Feiner *Tychonema*-Rasen auf kiesigem Sediment. Probenahmestelle Lechbruck, Urspring, 22.04.2020.

Oftmals wurden *Tychonema*-Ansammlungen auch auf besonders großflächigen Steinen detektiert (vgl. Abb. 5 C, E, G). Die Probenahmestellen, die von feinem Material der Schlufffraktion dominiert wurden waren Lechaue, Lechbruck-Kneippbecken und Pitzling. In Pitzling wurden zu keinem Zeitpunkt benthische *Tychonema*-Ansammlungen nachgewiesen, am Kneippbecken wurden weder benthische noch pelagische *Tychonema* detektiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Untergrund beim Auftreten von *Tychonema* eine wichtige Rolle spielt. Einerseits kann das durch die Hydrophobizität der Zellen erklärt werden, andererseits durch die erhöhte Lichtabdeckung im Feinsediment: Der Adhäsionsmechanismus vieler benthischer Cyanobakterien beruht darin, dass die Oberfläche der Filamente hydrophobe Eigenschaften besitzt. Die Hydrophobizität scheint der wichtigste Faktor zu sein, der die Adhäsion von Bakterien an das Substrat ermöglicht (Fattom und Shilo, 1984). Es werden hydrophobe Exopolysaccharide

produziert, die die Verankerung auf Sediment oder auch pflanzlichem Material ermöglichen oder unterstützen (Li et al., 2001). Es zeigte sich in Studien, dass alle untersuchten benthischen Cyanobakterien hydrophob waren, wohingegen alle untersuchten pelagischen Cyanobakterien, einschließlich der Hormogonien hydrophile Eigenschaften aufwiesen (Fattom und Shilo, 1984; Li et al., 2001). Ein weiterer Grund, warum *Tychonema* möglicherweise kiesiges Substrat bevorzugt, ist vermutlich, dass die Lichtabschwächung im Feinsediment höher ist. Da dieses Sediment viel flexibler ist und die Stabilität fehlt, wird das Licht stärker abgeschwächt als auf kiesigem Sediment. Das Feinsubstrat ist ein dynamischer Untergrund und Partikel bzw. Zellreste bedecken auf diesem Substrat häufiger die benthischen Organismen (Sekar et al., 2004). An der Probestelle Lechbruck-Campingplatz wurde *Tychonema* (in benthischer Form) am häufigsten detektiert. An dieser Probestelle wuchs *Tychonema* häufig auf einer Wasserpflanze der Gattung Potamogeton. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Wasserpflanzen (Makrophyten) neben dem kiesigen Sediment vermutlich ein gutes Substrat für *Tychonema* bilden. An dieser Stelle gibt es außerdem einen kleinen Zufluss, der möglicherweise auch Nährstoffe in den Stausee einträgt. Das häufige Auftreten der *Tychonema* in diesem Bereich verdeutlicht außerdem, dass *Tychonema* sehr lokal begrenzt innerhalb eines Gewässers auftreten kann. So wurde an der nächstgelegenen Probenahmestelle (Lechbruck-Kneippbecken) zu keinem Zeitpunkt während der Studie *Tychonema* detektiert,

7. Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse

Die Untersuchungen über die Vegetationsperiode 2020 im Lech zwischen Forggensee und Mandichosee haben gezeigt, dass *Tychonema* erneut in diesem Jahr abundant war. *Tychonema* wurde entlang des gesamten untersuchten Lechabschnitts über den Probenahmezeitraum hinweg immer wieder nachgewiesen. Ein Massenvorkommen wurde einmalig am 05.05.2020 in Apfeldorf entdeckt. Am Mandichosee konnten die Trichome mit der höchsten Toxizität detektiert werden, jedoch gab es 2020 kein Massenvorkommen von *Tychonema* im Mandichosee. Es zeigte sich, dass *Tychonema* besonders kiesiges Sediment favorisiert, allerdings kann das dieses Cyanobakterium auch auf Feinsediment vorkommen. Außerdem bieten größere Steine, Totholz und auch Makrophyten einen geeigneten Untergrund für diese benthische Cyanobakteriengattung. Im Mandichosee war das *Tychonema*-Vorkommen im Herbst am deutlichsten ausgeprägt. Sobald die *Tychonema* Hormogonien bildet, ist die Art auch in den pelagischen Wasserproben nachweisbar. Eine weitere Beobachtung im Rahmen der Untersuchungen war, dass nach Starkregenereignissen tendenziell weniger *Tychonema* gefunden werden konnte. Möglicherweise liegt das an der verminderten Einstrahlung in das Gewässer während und nach Starkregenereignissen. Außerdem wurde beobachtet, dass *Tychonema*-Ansammlungen sehr schnell entstehen, aber auch sehr schnell wieder verschwinden können. Die Zellansammlungen an der Wasseroberfläche stellen ehemals benthische Ansammlungen dar, die sich durch den Auftrieb des bei der Photosynthese entstehenden Sauerstoffs vom Gewässergrund ablösen und nach oben gelangen. Diese oberflächlichen Zellansammlungen sind besonders für Hunde und kleine Kinder gefährlich, da sie leicht verschluckt werden können und dort oftmals sehr viele toxische Zellen auf kleinem Raum konzentriert sind.

8. Ausblick

Durch die Untersuchung der Proben an Hand verschiedener Methoden konnte das Wissen in Bezug auf *Tychonema* im Lech deutlich erweitert werden. Neben den benthischen Proben wurden auch pelagische Proben untersucht. Oftmals stimmten die Ergebnisse der PCRs in den verschiedenen Probetypen überein, manchmal wurde *Tychonema* jedoch nur in den benthischen

Proben detektiert. Die Sequenzierung ist oftmals der sensiblere Nachweis und ermöglicht es auch sehr geringe Mengen einer Gattung in einer Probe zu detektieren. Die Anteile werden hierbei jedoch oftmals überinterpretiert. Der Nachweis erfolgt hierbei direkt über wenige Sequenzen, wohingegen bei der PCR im Gel eine Bande sichtbar werden muss. Für die Routineuntersuchungen ist die PCR allerdings praktikabler, da die Ergebnisse um ein Vielfaches schneller vorliegen. Neben den molekularen Analysen liefern auch die makroskopischen und mikroskopischen Betrachtungen einen wichtigen Beitrag. Im Rahmen der Studie wurden viele *Tychonema*-Vorkommen dokumentiert und das Auge der Probennehmer geschult. Dieser Bildkatalog steht nun zur Schulung von Personal der Gewässerüberwachung zur Verfügung (Bildkatalog auf der CD im Anhang) und soll in Zukunft fortgeschrieben werden. Benthische Cyanobakterien sind mit bloßem Auge im Uferbereich gut erkennbar. Zu beachten ist, dass allein die Analyse pelagischer Proben zum Ausschluss des Vorkommens von *Tychonema* nicht ausreicht. Werden allerdings in der pelagischen Probe *Tychonema*-Zellen entdeckt, ist davon auszugehen, dass sich in der Nähe oder flussaufwärts auch ein benthisches *Tychonema*-Vorkommen befindet.

Bei der Sequenzierung hat sich gezeigt, dass im Lech viele Cyanobakteriengattungen vorhanden sind, die von der LSI in Studien, die in der Vergangenheit abgeschlossen wurden, nicht in pelagischen Proben detektiert wurden. Ein einfacher Grund dafür ist, dass viele dieser Gattungen erst in den letzten Jahren als neue Gattungen entstanden sind. Außerdem handelt es sich oftmals um benthische Gattungen, die in pelagischen Proben selten sind. Die Studie hat erneut gezeigt, dass es sehr wichtig ist, das Wissen im Bereich der benthischen Cyanobakterien auszubauen. Diese bisher weitgehend übersehene Gruppe an Cyanobakterien ist mit Sicherheit nicht nur im Lech, sondern auch in vielen anderen Flüssen und auch in Seen vorhanden und besiedelt dort nicht nur die Uferbereiche, sondern auch tiefere Schichten, die vom Gewässerrand aus nicht einsehbar sind. So hat sich zum Beispiel gezeigt, dass die euphotische (lichtdurchflutete) Zone im Mandichosee bis in etwa 6 m Tiefe reicht. Mit einer maximalen Tiefe des Mandichosees von knapp 8 m erreicht das Licht einen Großteil des Gewässergrunds und ermöglicht so das Wachstum von benthischen Cyanobakterien in einem sehr großen Bereich.

9. Glossar

Benthisch	Auf dem Gewässergrund lebend
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay; Antikörper-basiertes Nachweisverfahren zur Detektion von Antigenen (Proteinen etc.)
Gen	Abschnitt auf der DNA, der Informationen für biologisch aktive RNA enthält
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; Analytische Methode in der Chemie zur Identifizierung und Quantifizierung bestimmter Stoffe mittels Standards
Illumina MiSeq	Methode zur Hochdurchsatz-Sequenzierung von DNA
<i>In situ</i>	im Laborversuch
<i>In silico</i>	am Computer

LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung; Kombination aus Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie zur Identifizierung und Quantifizierung von Substanzen
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LfU	Bayerisches Landesamt für Umwelt
LSI	Limnologische Station Iffeldorf der TU München
Neurotoxin	Nervengift
OTU	Operational Taxonomic Unit
Pelagisch	im Freiwasser lebend
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Polymerase	Enzym, welches die Polymerisation von Nukleotiden katalysiert.
Primer	Oligonukleotid, welches als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme (z. B. Polymerasen) dient
RNA	Ribonukleinsäure
Schmelztemperatur	auch Annealingtemperatur; Temperatur in der PCR Reaktion, bei der sich Primer an die komplementären Genabschnitte anlagern
Secchi-Scheibe	Weißer Scheibe (oftmals aus Metall oder mit einem Gewicht beschwert), die vom Boot aus ins Wasser gelassen wird. Die Wassertiefe bei der man die Secchi-Scheibe nicht mehr sehen kann wird mittels eines markierten Seils bestimmt. Diese Tiefe ist die Secchi-Tiefe.
Secchi-Tiefe	Die Secchi-Tiefe wird mit einer Secchi-Scheibe gemessen und gibt Auskunft über die Sichttiefe in einem Gewässer. Aus der Sichttiefe lässt sich durch Multiplikation mit dem Faktor 2,5 die euphotische Zone berechnen.
StMGP	Bayerisches Staatsministerium für Gesundheit und Pflege
StMUV	Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz
Temperaturgradienten-PCR	PCR, in der mittels eines Gradienten verschiedene Annealingtemperaturen getestet werden können
UBA	Umweltbundesamt

10. Literaturverzeichnis

Anagnostidis, K. (1989). Geitlerinema, a new genus of oscillatoriacean cyanophytes. *Plant systematics and evolution*, 164(1), 33-46.

Augsburger Allgemeine, 2019. <https://www.augsburger-allgemeine.de/bayern/Merching-Tote-Hunde-am-Mandichosee-Blualgen-auf-dem-Vormarsch-id55206926.html> (aufgerufen am 12.05.2021)

Bates, H. A., & Rapoport, H. (1979). Synthesis of anatoxin a via intramolecular cyclization of iminium salts. *Journal of the American Chemical Society*, 101(5), 1259-1265.

Bauer, F., Fastner, J., Bartha-Dima, B., Breuer, W., Falkenau, A., Mayer, C., & Raeder, U. (2020). Mass Occurrence of Anatoxin-a-and Dihydroanatoxin-a-Producing *Tychonema* sp. in Mesotrophic Reservoir Mandichosee (River Lech, Germany) as a Cause of Neurotoxicosis in Dogs. *Toxins*, 12(11), 726.

Bauer, F. & Raeder, U. (2021). Klimawandel fördert toxische Cyanobakterien – Detektion von Cyanotoxingenen in Gewässern, Verbundprojekt Klimawandel und Gesundheit (2017-2020).

Brito, A., Ramos, V., Mota, R., Lima, S., Santos, A., Vieira, J., Vieira, C. P., Kastovsky, J., Vasconcelos, V. & Tamagnini, P. (2017). Description of new genera and species of marine cyanobacteria from the Portuguese Atlantic coast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 111, 18-34.

Capelli, C., Cerasino, L., Boscaini, A., & Salmaso, N. (2018). Molecular tools for the quantitative evaluation of potentially toxigenic *Tychonema bourrellyi* (Cyanobacteria, Oscillatoriales) in large lakes. *Hydrobiologia*, 824(1), 109-119.

Chorus, I., & Welker, M. (2021, second edition). Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Conklin, K. Y., Stancheva, R., Otten, T. G., Fadness, R., Boyer, G. L., Read, B., Zhang, X. & Sheath, R. G. (2020). Molecular and morphological characterization of a novel dihydroanatoxin-a producing *Microcoleus* species (cyanobacteria) from the Russian River, California, USA. *Harmful algae*, 93, 101767.

Cyanocenter, 2021. <https://toxische-cyanobakterien.de/hintergrundinformation/cyanotoxine/> (aufgerufen am 15.06.2021)

Fattom, A., & Shilo, M. (1984). Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1), 135-143.

Fawell, J. K., Mitchell, R. E., Hill, R. E., & Everett, D. J. (1999). The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II anatoxin-a. *Human & experimental toxicology*, 18(3), 168-173.

Herdman, M., & Rippka, R. (1988). Cellular differentiation: Hormogonia and baeocytes. *Methods in enzymology*, 167, 232-242.

Humbert, S., Zopfi, J., & Tarnawski, S. E. (2012). Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. *Environmental Microbiology Reports*, 4(5), 484-490.

Kaminski, A., Bober, B., Lechowski, Z., & Bialczyk, J. (2013). Determination of anatoxin-a stability under certain abiotic factors. *Harmful Algae*, 28, 83-87.

Komarek, J. & Anagnostidis, K. (2008). Cyanoprokaryota, Teil 2: Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Lagkouvardos, I., Joseph, D., Kapfhammer, M., Giritli, S., Horn, M., Haller, D., & Clavel, T. (2016). IMNGS: a comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Li, P., Harding, S. E., & Liu, Z. (2001). Cyanobacterial exopolysaccharides: their nature and potential biotechnological applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 18(1), 375-404.
- Linne von Berg, K.-H., Hoef-Emden, K., Marin, B. & Melkonian, M. (2012). Der Kosmos-Algenführer, Süßwasseralgen unter dem Mikroskop, Kosmos Verlag, Stuttgart.
- Machado-De-Lima, N. M., Martins, M. D., & Branco, L. H. (2017). Description of a tropical new species of *Wilmottia* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) and considerations about the monophyly of *W. murrayi*. *Phytotaxa*, 307(1), 43-54.
- Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., & Vasconcelos, V. (2007). Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment international*, 33(8), 1070-1089.
- Pruesse, E., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28(14), 1823-1829.
- Puddick, J., van Ginkel, R., Page, C. D., Murray, J. S., Greenhough, H. E., Bowater, J., Selwood, A. I., Wood, S. A., Prinsep, M. R., Truman, P., Munday, R. & Finch, S. C. (2021). Acute toxicity of dihydroanatoxin-a from *Microcoleus autumnalis* in comparison to anatoxin-a. *Chemosphere*, 263, 127937.
- Puschner, B., Hoff, B., & Tor, E. R. (2008). Diagnosis of anatoxin-a poisoning in dogs from North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 89-92.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kaštovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komarek, J. & Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 11-26.
- Rangel, M., Brunetti, R. L., Garcia, A. N., Cambui, C. C. N., Conserva, G. A. A., Neves, A. C., Neves, A. C., Sant'Anna, C. L. & Carvalho, L. R. (2013). Acute effects of three *Geitlerinema* spp. (Cyanobacteria) extracts administered in mice: symptoms and histopathological aspects. *Phytochemistry reviews*, 12(3), 543-553.
- Rogers, E. H., Hunter III, E. S., Moser, V. C., Phillips, P. M., Herkovits, J., Munoz, L., Hall, L. L. & Chernoff, N. (2005). Potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 25(6), 527-534.
- Salmaso, N., Cerasino, L., Boscaini, A., & Capelli, C. (2016). Planktic *Tychonema* (Cyanobacteria) in the large lakes south of the Alps: phylogenetic assessment and toxigenic potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(10), fiw155.

Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L. R., van Nes, E. H. (1997). On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology*, 78(1), 272-282.

Schwoerbel, J. & Brendelberger, H. (2021, 11. Auflage). Einführung in die Limnologie – Stoffhaushalt, Lebensgemeinschaften, Technologie. Springer Spektrum, Heidelberg.

Scott J.T. & Marcarelli A.M. (2012) Cyanobacteria in Freshwater Benthic Environments. In: Whitton B. (eds) Ecology of Cyanobacteria II. Springer, Dordrecht.

Sekar, R., Venugopalan, V. P., Satpathy, K. K., Nair, K. V. K., & Rao, V. N. R. (2004). Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates. In *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges* (pp. 109-116). Springer, Dordrecht.

Smith, F. M., Wood, S. A., Wilks, T., Kelly, D., Broady, P. A., Williamson, W., & Gaw, S. (2012). Survey of Scytonema (Cyanobacteria) and associated saxitoxins in the littoral zone of recreational lakes in Canterbury, New Zealand. *Phycologia*, 51(5), 542-551.

Strunecký, O., Elster, J., & Komárek, J. (2011). Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium “Phormidium” murrayi = Wilmottia murrayi. *Fottea*, 11(1), 57-71.

Wonnacott, S., Jackman, S., Swanson, K. L., Rapoport, H., & Albuquerque, E. X. (1991). Nicotinic pharmacology of anatoxin analogs. II. Side chain structure-activity relationships at neuronal nicotinic ligand binding sites. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259(1), 387-391.

Wood, S. A., Biessy, L., & Puddick, J. (2018). Anatoxins are consistently released into the water of streams with Microcoleus autumnalis-dominated (cyanobacteria) proliferations. *Harmful algae*, 80, 88-95.

Zwirgmaier, K., Keiz, K., Engel, M., Geist, J., & Raeder, U. (2015). Seasonal and spatial patterns of microbial diversity along a trophic gradient in the interconnected lakes of the Osterseen Lake District, Bavaria. *Frontiers in microbiology*, 6, 1168.

11. Anhang

Tabelle Anhang 1 Gemessene Werte für Anatoxin-a. Die Messungen erfolgten durch das LGL.

Probe		Toxinmessung LGL	
Probestelle	Datum	[µg/l] ATX (unverdünnt)	[µg/l] ATX (50 x verdünnt)
Lechaue	22.04.2020	8,7	nicht gemessen
Lechbruck US	22.04.2020	0,24	-
Kreut	22.04.2020	0,38	-
Lechaue	05.05.2020	0,6	-
Lechbruck US	05.05.2020	0,1	-
Kreut	05.05.2020	0,5	-
Apfeldorf	05.05.2020	1,8	-
Kaufering	05.05.2020	0,16	-
Schwabstadi	05.05.2020	0,2	-
Prittriching	05.05.2020	1,1	-
Roßhaupten	23.06.2020	9,2	nicht gemessen
Roßhaupten	21.07.2020	9,14	> 50
Prittriching	21.07.2020	11,21	> 50
Unterbergen	21.07.2020	0,6	-
Mandichosee WW	04.08.2020	0,16	-
Mandichosee PP	04.08.2020	0,19	-
Mandichosee WW	01.09.2020	0,23	-
Mandichosee PP	01.09.2020	0,21	-
Mandichosee KW	01.09.2020	0,19	-
Forggensee	15.09.2020	0,18	-
Roßhaupten	15.09.2020	0,23	-
Lechbruck CP	15.09.2020	0,56	-
Lechbruck US	15.09.2020	0,11	-
Kaufering	15.09.2020	0,18	-
Unterbergen	15.09.2020	10,93	13,03
Mandichosee WW	15.09.2020	15,73	218,36
Mandichosee WW	29.09.2020	0,14	-
Forggensee	13.10.2020	0,55	-
Lechbruck CP	13.10.2020	4,57	-
Schwabstadi	13.10.2020	14,33	40,9
Unterbergen	13.10.2020	14,88	89,64

Mandichosee WW	13.10.2020	15,19	144,84
Mandichosee WW	27.10.2020	15,76	220,48
Mandichosee KW	27.10.2020	0,81	-
Lechbruck CP	10.11.2020	0,44	-
Kaufering	10.11.2020	15,7	nicht gemessen
Schwabstadl	10.11.2020	15,36	212,5
Mandichosee WW	10.11.2020	2,29	-
Mandichosee KW	10.11.2020	16,28	143,77

Bei zwei Messwerten wird der Messwert der verdünnten Probe gewertet. Die Werte sind bereits umgerechnet.

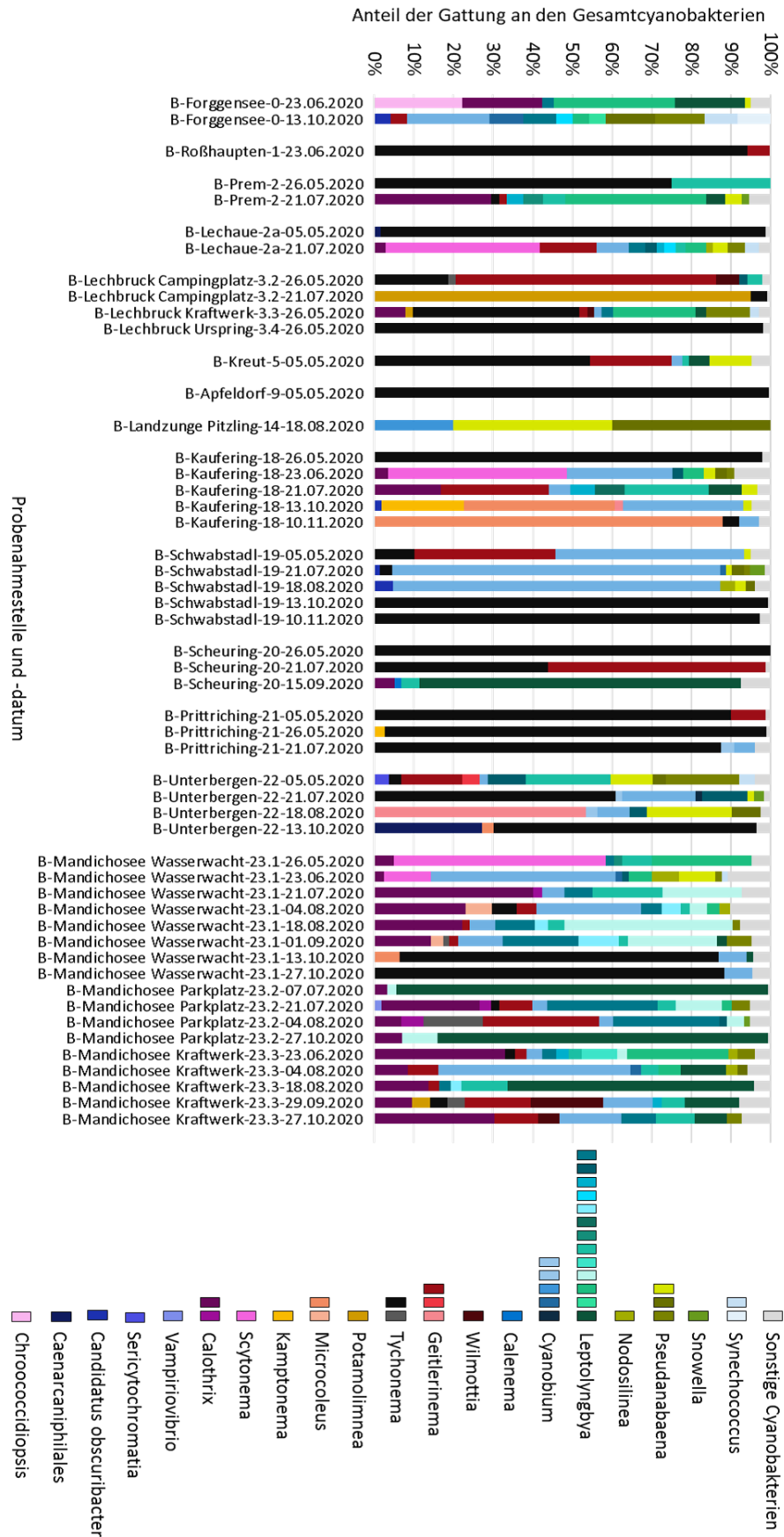


Abbildung Anhang 1 Übersicht über die Cyanobakteriengattungen in den benthischen Proben.

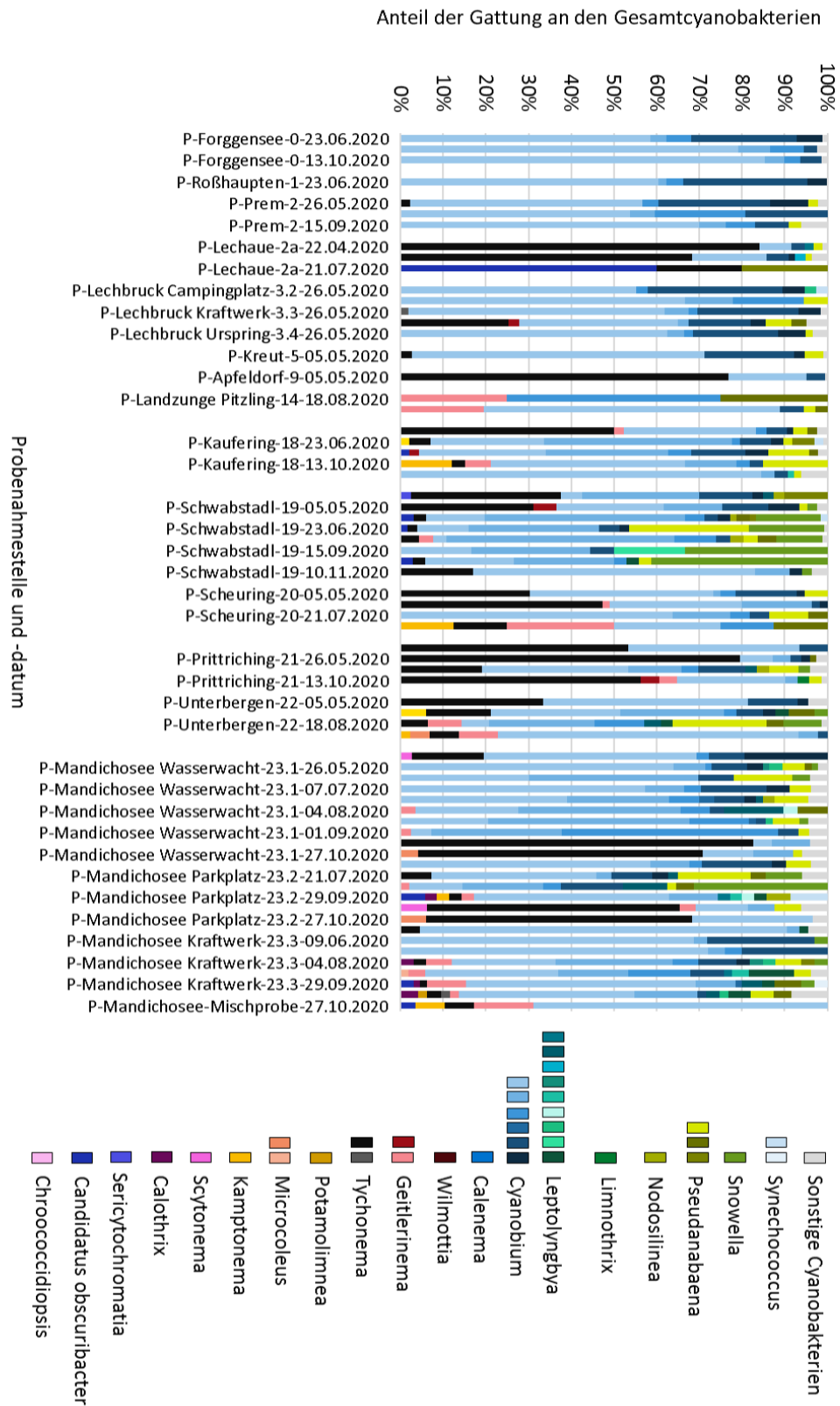


Abbildung Anhang 2 Übersicht über die Cyanobakteriengattungen in den pelagischen Proben.

Weiterer Anhang auf der beiliegenden CD: Gesamtergebnisse, Bildkatalog.