

# **Identifizierung des cyanobakteriellen Phytoplanktons der Darß-Zingster Boddenkette**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

**Vorgelegt von:**

Martin Albrecht

geb. am 07. Aug. 1988 in Rostock  
aus Rostock

Rostock, 25.10.2017

**Gutachter:**

1. Gutachter:

PD Dr. Rhena Schumann,  
Institut f. Biowissenschaften, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Burkhard Büdel,  
Fachbereich Biologie, Technische Universität Kaiserslautern

**Datum der Einreichung:** 25.10.2017

**Datum der Verteidigung:** 29.01.2018

## Inhalt

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>III</b>
<b>Summary</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Cyanobakterien .....	1
1.1.1 Systematik und Taxonomie .....	2
1.1.2 Picocyanobakterien .....	4
1.2 Lagunen und Ästuare.....	5
1.3 Monitoring .....	7
1.4 Hypothesen.....	9
1.5 Umsetzung.....	10
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Probennahmestandorte .....	11
2.2 Zellzählungen .....	13
2.3 Kultivierung und Bestimmung von Isolaten .....	16
2.4 Einzelzellisolierung .....	16
2.5 Molekulargenetische Analysen .....	17
2.5.1 DNA-Isolierung und PCR.....	17
2.5.2 Sequenzierung, Assemblierung und Alignierung.....	18
2.5.3 Phylogenetische Analysen .....	19
2.5.4 16S Amplicon Sequenzierung .....	19
2.5.5 T-RFLP .....	21
2.6 Klonierung.....	22
2.7 Fluorescence <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	24
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
3.1 Zellzählung.....	27
3.2 Kultivierung .....	28
3.2.1 Morphologie .....	28
3.2.2 Molekulargenetische Bestimmung .....	32

3.3	Einzelkolonieanalyse.....	38
3.4	Klonierung.....	39
3.5	T-RFLP.....	44
3.6	16S Amplicon-Analyse.....	49
3.7	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	56
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>61</b>
4.1	Methodeneinflüsse.....	61
4.1.1	Probennahme und Zählungen.....	61
4.1.2	Kultivierung.....	61
4.1.3	Kulturunabhängige Methoden.....	63
4.2	Bestimmungsmethoden.....	66
4.2.1	Datenbanken und molekulare Bestimmung.....	66
4.2.2	Artkonzept der Cyanobakterien.....	67
4.3	Morphologie und Genetik – Welten zusammenführen.....	70
4.4	Fehlbestimmung auf Ebene der Ordnung – Ein akademisches Problem?.....	78
4.5	Massenvorkommen von <i>Cyanobium</i> .....	82
4.6	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	85
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>87</b>
<b>i.</b>	<b>Anhänge.....</b>	<b>99</b>
A.	Wachstum und Morphologie bei unterschiedlichen Salinitäten.....	99
B.	Berechnung Chlorophyllanteile für Stickstofffixierungsraten.....	100
C.	mathFisH-Analyse.....	101
D.	16S Amplicon-Analysen.....	102
<b>ii.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>105</b>
<b>iii.</b>	<b>Publikation.....</b>	<b>106</b>
<b>iv.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>107</b>

## Zusammenfassung

Das Phytoplankton der Darß-Zingster Boddenkette wird seit 25 Jahren mikroskopisch untersucht. In den letzten 15 Jahren waren Cyanobakterien die dominanteste Gruppe. Innerhalb der Cyanobakterien dominierten Picocyanobakterien der Gattung *Aphanothece* (Ordnung: Chroococcales).

Die Cyanobakterien wurden und werden im Monitoring anhand morphologischer Merkmale bestimmt. Die phylogenetische Aussagekraft der morphologischen Merkmale wurde jedoch durch genetische Untersuchungen als unsicher oder falsch identifiziert. Die Identität der abundantesten Cyanobakterien in der Darß-Zingster Boddenkette wurde deshalb mit genetischen Methoden bestimmt. Dazu wurde ein polyphasischer Ansatz mit kulturabhängigen und kulturunabhängigen Methoden genutzt, der neben der genetischen Bestimmung auch die Morphologie umfasste.

Die Morphologie der Isolate veränderte sich im Zuge der Kultivierung im Labor von vielzelligen Kolonien (häufig Chroococcales) hin zu Einzelzellen, die Gattungen der Ordnung Synechococcales zugeordnet wurden (*Synechococcus*-ähnlich). Genetisch wurden die Isolate ebenfalls den Synechococcales zugeordnet (Gattung *Cyanobium*). Die Klonierung und die 16S Amplicon-Analyse, als kulturunabhängige genetische Methoden, erzeugten viele DNA-Sequenzen, die der Gattung *Cyanobium* angehörten. Damit konnte die Identität der abundantesten Cyanobakterien als *Cyanobium* (Ordnung Synechococcales) bestimmt werden.

Die Verschiebung der Identität auf Ordnungsebene durch genetische Methoden ist kein Einzelfall, sondern wurde in dieser Arbeit auch für weitere Lagunen der südlichen Ostsee nachgewiesen und ist in der Literatur sogar weltweit zu finden. Mit der Zugehörigkeit zu Ordnungen verbinden sich auch Eigenschaften der Organismen, wie etwa Potenziale zur Toxinbildung oder Stickstofffixierung. Diese Potenziale sind von Relevanz für Risikobewertungen und Management-Strategien in den Gewässern.

## Summary

The phytoplankton community of the Darß-Zingst Bodden Chain is microscopically investigated for 25 years. Cyanobacteria were the dominant group for the last 15 years. Picocyanobacteria of the genus *Aphanothece* (order Chroococcales) dominated within the cyanobacteria.

Cyanobacteria were and are determined morphologically in monitoring programs. Yet, genetic analyses have shown that phylogenetic information of morphological characters was uncertain or wrong. Therefore, genetic methods were applied to identify the most abundant cyanobacteria in the Darß-Zingst Bodden Chain. A polyphasic approach of culture dependent and culture independent methods was used, which covered genetics as well as morphology.

The morphology of the isolates changed during cultivation from multi-cellular colonies (mostly Chroococcales) to single cells, which were determined as genera of the order Synechococcales (*Synechococcus*-like). The isolates were genetically also determined as Synechococcales (genus *Cyanobium*). The cloning and 16S Amplicon analyses generated a majority of sequences, which belonged to the Synechococcales and *Cyanobium*. Thus, the identity of the most abundant cyanobacteria was *Cyanobium* (order Synechococcales).

The shift of orders in the identity by genetical methods was not a single event, but was found in this work also at other Baltic Sea lagoons and in the literature even worldwide. The assignment to orders is linked with special abilities of the organisms such as potentials for toxin production and nitrogen fixation. These potentials are relevant for risk assessment and water management strategies.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersichtskarte der deutschen Ostseeküste .....	11
Abbildung 2 Karte Darß-Zingster Boddenkette mit Probennahmestationen.....	12
Abbildung 3 Beispiel einer Sekundärstruktur des 16S rRNA Moleküls.....	23
Abbildung 4 Phytoplankton Zingster Strom Abundanz und Biovolumen 2013.....	27
Abbildung 5 Isolatmorphologie nach mindestens einem Jahr in Kultur.....	32
Abbildung 6 16S rRNA-Gen Phylogenie der DZBK-Isolate mit Referenzsequenzen .....	33
Abbildung 7 16S rRNA-Gen Phylogenie der Picocyanobakterien .....	34
Abbildung 8 16S rRNA-Gen Phylogenie der Picocyanobakterien mit den Einzelkolonie-Sequenzen	38
Abbildung 9 16S rRNA Phylogenie mit kondensierten Untergruppen.....	41
Abbildung 10 16S rRNA Phylogenie der Klonierung - Teil Picocyanobakterien .....	42
Abbildung 11 16S rRNA Phylogenie der Klonierung - Teil Chroococcales .....	43
Abbildung 12 Anzahl der T-RFLP OTUs entlang des Gradienten der DZBK.....	45
Abbildung 13 Anzahl der Genotypen verschiedener Bereiche der DZBK .....	45
Abbildung 14 Anzahl OTUs der T-RFLP im Vergleich von April und Oktober 2016 .....	46
Abbildung 15 Anzahl aus der T-RFLP ermittelter OTUs der verschiedenen Lagunen.....	47
Abbildung 16 Vergleich der OTUs aller Lagunen von Frühjahr und Herbst.....	47
Abbildung 17 T-RFLP Vergleich der OTU-Zusammensetzung der Lagunen .....	48
Abbildung 18 Rarefaction-Kurven der 16S Amplicon .....	49
Abbildung 19 Anzahl OTUs des 16S Amplicon .....	51
Abbildung 20 16S Amplicon Vergleich OTUs Frühjahr und Herbst 2016 .....	51
Abbildung 21 16S Amplicon: Vergleich der Lagunen zu beiden Probennahmezeitpunkten.....	52
Abbildung 22 Anteile der Cyanobakterienordnungen .....	52
Abbildung 23 Zusammensetzung der cyanobakteriellen OTUs nach Ordnungen.....	53
Abbildung 24 Sekundärstruktur mit Sonde .....	57
Abbildung 25 Fluoreszenzen der Sonde.....	59
Abbildung 26 Abundanz des Phytoplanktons im Zingster Strom 2013.....	73

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Liste der Probennahmestandorte 2013 und 2016 .....	12
<b>Tabelle 2</b> Zählkategorien der DZBK .....	15
<b>Tabelle 3</b> Methodenübersicht zur Isolatgewinnung in der DZBK.....	16
<b>Tabelle 4</b> Sequenzen aller verwendeten Primer.....	18
<b>Tabelle 6</b> Getestete Bedingungen der Einzelschritte für die Sonde CYA591 .....	25
<b>Tabelle 6</b> Morphologie der Isolate ca. vier Wochen nach Beginn der Kultivierung .....	29
<b>Tabelle 7</b> Herkunft und phylogenetische Zuordnung der DZBK-Isolate .....	37
<b>Tabelle 8</b> Klonierungsergebnisse.....	40
<b>Tabelle 9</b> Anteile derselben abundanten drei OTUs an der Gesamtabundanz .....	46
<b>Tabelle 10</b> Anteil der der Abteilung Cyanobacteria zugeordneten Sequenzen.....	50
<b>Tabelle 11</b> Korrigierter Anteil der Cyanobakteriensequenzen an der Gesamtsequenzanzahl .....	50
<b>Tabelle 12</b> Übersicht cyanobakterieller Gattungen mit 16S Amplicon.....	54
<b>Tabelle 13</b> Übersicht über die mit den verschiedenen Ansätzen nachgewiesenen Ordnungen und Gattungen.....	56
<b>Tabelle 14</b> Sonde, Helfer und Kompetitoren .....	56
<b>Tabelle 15</b> Übersicht Bedingungen positiver Signale der Sonde CYA591 .....	58
<b>Tabelle 16</b> Anteil Abundanzen der Ordnungen Chroococcales und Synechococcales .....	72
<b>Tabelle 17</b> Beschriebene Vorkommen von Picocyanobakterien in Gewässern weltweit.....	74
<b>Tabelle 18</b> Beschriebene Vorkommen von Cyanobium in ausgewählten Gewässern .....	75
<b>Tabelle 19</b> Berechnung der Stickstofffixierung in der DZBK.....	80

## Abkürzungsverzeichnis

16S rRNA	Kleine ribosomale Untereinheit
AIC	Akaike Criterion
ATP	Adenosintriphosphat
BIC	Bayesian Inference Criterion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
Chl a	Chlorophyll a
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DZBK	Darß-Zingster Boddenkette
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EU-MSR	Meeresstrategie richtlinie der Europäischen Union
EU-WRRL	Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union
FA	Formamid
FisH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
Form.	Formaldehyd
Gr. Jasm.	Großer Jasmunder Bodden
GTR	General Time Reversible Model
HELCOM	Helsinki Commission
ICBN	International Code for Botanical Nomenclature (jetzt: ICN)
ICN	International Code for Nomenclature of Algae, Plants and Fungi
ICNP	International Code for Nomenclature of Prokaryotes
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kl. Jasm.	Kleiner Jasmunder Bodden
LAGuS-MV	Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern
LUNG-MV	Landesamt für Umwelt, Natur und Geologie Mecklenburg-Vorpommern
ML	Maximum Likelihood
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Neg.Kon.	Negativkontrolle
NGS	Next Generation Sequencing
OTU	Operational Taxonomic Unit (hier: art-ähnlich)
PE	Provasoli Enriched Seawater Medium
Pos.Kon.	Positivkontrolle
Pot.	Potentiell
Rel.	Relativ
RubisCO	Ribulose-bisphosphat Carboxylase Oxygenase
Sal	Salinität
TRF	Terminale Restriktion Fragment
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
Vorb.	Vorbehandlung
V-Regionen	Variable Regionen
ZS	Zingster Strom



# 1 Einleitung

## 1.1 Cyanobakterien

Cyanobakterien sind eine Domäne der Eubakterien und photoautotroph. Sie betreiben als einzige Prokaryoten oxygene Photosynthese und sind die direkten Vorläufer der Chloroplasten von Algen und Landpflanzen. Sie entwickelten sich vor circa 3 Milliarden Jahren und sind seitdem wichtiger Bestandteil der Biosphäre. Cyanobakterien haben durch die Abgabe von Sauerstoff aus der Photosynthese die Zusammensetzung der Erdatmosphäre nachhaltig verändert und so höheres, heterotrophes Leben ermöglicht.

Cyanobakterien sind weltweit verbreitet und durch viele Anpassungen besonders konkurrenzfähig an Extremstandorten, als Pionierbesiedler und in Gewässern als Blütenbildner (Whitton, 2012). Blütenereignisse dieser Mikroalgen finden bisweilen in den Medien Erwähnung, wenn Trinkwasserquellen oder Badestrände betroffen sind (Metcalf und Codd, 2012). Als Blüten wird die massenhafte Entwicklung von Biomasse in kürzester Zeit aufgrund günstiger Umweltfaktoren wie Wärme, Licht und Nährstoffverfügbarkeit bezeichnet. Cyanobakterien haben durch schnelle Generationszeiten und ihre Fähigkeit zur Stickstofffixierung Konkurrenzvorteile gegenüber anderen Algengruppen (Kononen et al., 1996; Kuosa, 1991). Blüten von Cyanobakterien haben in der Regel negative Folgen für das Gewässer, in dem sie auftreten. Das Gewässer verliert an touristischem Wert durch Trübung und Geruch. Das Absterben der Biomasse am Ende der Blüte führt zur Entwicklung von Keimen und zur Freisetzung der sich im Zellinneren befindlichen Substanzen, zu denen auch Cyanotoxine gehören.

Viele Gattungen der Cyanobakterien besitzen die Fähigkeit zur Toxinproduktion (Codd et al., 2017), wodurch ihre Präsenz generell negativ bewertet wird. Das Monitoring zur Abschätzung von Gefahren findet bisher zumeist über die Bestimmung der Chlorophyll-a-Menge und die mikroskopische Zellzählung statt (Catherine et al., 2017). Einige Cyanobakterien, wie *Microcystis*, *Dolichospermum* oder auch *Nodularia*, sind als Toxin- und Blütenbildner bekannt und über die Morphologie recht sicher zu bestimmen (u.a. Wasmund,

1997). Weit weniger sicher ist die Bestimmung der besonders kleinen Vertreter, der Picocyanobakterien (Zellgröße  $< 2 \mu\text{m}$ ), die in Seen, Lagunen und Meeren in großer Abundanz vorkommen und ebenfalls Toxine produzieren können (Jasser und Callieri, 2017).

### 1.1.1 Systematik und Taxonomie

Die ersten Grundlagen der Cyanobakteriensystematik wurden mittels morphologischer Merkmale geschaffen. Anfangs wurden Cyanobakterien als „Blau-grüne Algen“ den Eukaryoten und der botanischen Systematik und Taxonomie (Internationaler Botanischer Nomenklatorischer Code, ICBN) zugeordnet (Geitler, 1932). Bessere Mikroskope führten zu immer feineren Merkmalen und schließlich zu der Erkenntnis, dass es sich um Bakterien handelt, da der Zellkern und andere Organellen fehlen (Echlin und Morris, 1965). Diese Erkenntnis wurde in späteren Jahren durch erste genetische Analysen bestätigt (Fox et al., 1980). Dennoch blieb die Zuordnung zur botanischen Nomenklatur erhalten. Mit der Elektronenmikroskopie wurden auch ultrastrukturelle Eigenschaften wie die Zellwandstruktur oder die Position der Thylakoide sichtbar und als Merkmal herangezogen. Morphologische und ultrastrukturelle Eigenschaften werden für taxonomische Beschreibungen bis heute genutzt, jedoch auch mit genetischen Methoden verknüpft (Komárek, 2016).

Die Entdeckung der DNA und die Entwicklung der molekularen Bestimmungsmethoden auf Grundlage der DNA-Sequenzen führten zu einem Umbruch in der Systematik. Die klassisch morphologische Systematik deckte sich nicht mit den genetischen Befunden und viele Ordnungen, Familien, etc. waren polyphyletisch, hatten also unterschiedliche evolutionäre Ursprünge (Komárek et al., 2014; Palinska et al., 1996). Es entwickelte sich parallel zum morphologischen System eine genetische Systematik, die auf DNA-Sequenzunterschieden beruhte und sich an dem nomenklatorischen Code der Prokaryoten (ICNP, Parker et al., 2015) orientierte (Oren, 2011).

Inzwischen sind molekulargenetische Methoden günstig, einfach in der Handhabung und dadurch in der Wissenschaft zum Standard der Bestimmung geworden. Im Monitoring werden hingegen oft aus Gründen der fehlender

Expertise und Infrastruktur auch weiterhin Cyanobakterien morphologisch bestimmt und gezählt (HELCOM, 1988). Die ökologische Gewässergütebewertung basiert also größtenteils auf den äußerlich erkennbaren Merkmalen, die hoch variabel und oftmals phylogenetisch uneindeutig sind. Die Systematik und Taxonomie werden ständig nach den neuesten Erkenntnissen der Wissenschaft, also in der Regel aufgrund molekularer Marker, aktualisiert (z.B. Dvořák et al., 2015; Komárek, 2016). Dadurch werden morphologische Gruppen aufgeteilt und die ähnlichen oder gleichen Morphotypen sind dann z.B. auf verschiedene Ordnungen verteilt. Durch die standardmäßige Lichtmikroskopie können diese Unterschiede nicht aufgelöst werden und die ökologische Bewertung der gefundenen Morphotypen ist nicht mehr möglich.

Die Diskrepanz zwischen den beiden Systemen ist lange bekannt, wurde aber noch nicht behoben und wird immer noch diskutiert (Oren und Garrity, 2014; Pinevich, 2015). Eine Annäherung wird durch polyphasische Ansätze erreicht, in denen die morphologischen und genetischen Daten in der Regel mittelbar kombiniert werden (e.g. Dvořák et al., 2015; Komárek, 2016; Komárek et al., 2014). Es werden oftmals Isolate aus Umweltproben gewonnen, die dann kultiviert, morphologisch und genetisch bestimmt werden. Ein anderer Weg ist die direkte Mikroskopie von Umweltproben und eine kulturunabhängige genetische Analyse derselben Probe. Die Ergebnisse werden verglichen, ohne jedoch einen unmittelbaren Verknüpfungspunkt der Daten zu haben. Es bleibt also stets eine Lücke, die zu Unsicherheit über die Zugehörigkeit eines Morphotyps zu einem Genotyp führt.

Fehlerhafte Bestimmung durch die oben beschriebene große Variabilität der Morphologie, durch Ungenauigkeit der Bearbeiter oder Kontamination der Kulturen mit anderen Arten (Komárek und Anagnostidis, 1989) hat zu großen Problemen mit den Sequenzdatenbanken geführt. Sequenzen von Isolaten werden in der Regel mit der Stammnummer und dem Gattungs- und Artnamen versehen. Besonders simple Morphotypen, wie z.B. *Synechococcus* (Komárek und Anagnostidis, 1999), fanden sich in den Datenbanken sehr häufig wieder (*Synechococcus* sp. mit über 5.000 Einträgen für das 16S rRNA-Gen). Mit wachsender Sequenzanzahl wurden immer mehr phylogenetische Gruppen

erfasst und einige Morphotypen waren auf verschiedenste Bereiche der Phylogenie verteilt, also polyphyletisch (z.B. die Gattung *Leptolyngbya* (Komárek et al., 2014 und darin). Abgleiche mit Sequenzdatenbanken sind dadurch eine sehr unsichere Bestimmungsmethode geworden. Der Ausweg ist Referenzsequenzen für Phylogenieberechnungen zu nutzen, um die Zuordnung eigener Daten zu feststehenden Gruppen zu gewährleisten (Ramos et al., 2017). Die Morphologie *in situ* ist damit dennoch nicht zuzuordnen.

### 1.1.2 Picocyanobakterien

Die Picocyanobakterien sind eine phylogenetisch sehr diverse Gruppe der Cyanobakterien, deren einziges gemeinsames Merkmal sehr kleine Zellen sind (u.a. Callieri, 2007). Zu den Picocyanobakterien im engeren Sinn, den  $\alpha$ -Picocyanobakterien, zählen einzellige Vertreter mit einer Zellgröße unter 2  $\mu\text{m}$ . In neuerer Literatur wird der Begriff weiter gefasst: auch Koloniebildner und Zellen bis 5  $\mu\text{m}$  werden jetzt dazugezählt (Jasser und Callieri, 2017), weil sie in ähnlichen Habitaten vorkommen und auch ökologisch ähnlich sind. In den letzten Jahren sind zudem weitere Erkenntnisse über die Ökologie und Taxonomie von Picocyanobakterien ( $\alpha$ -Picocyanobakterien und andere) gewonnen worden. So auch, dass die Picocyanobakterien Toxine bilden können (Jasser und Callieri, 2017) und eine große morphologische Plastizität besitzen. Die Spanne der Plastizität reicht von Zellgrößenveränderungen um den Faktor 10 (z.B. von 2 auf 20  $\mu\text{m}$  Zelllänge) durch Licht und Temperaturänderungen bis hin zur Koloniebildung durch einzellige Isolate in Anwesenheit eines Fressfeindes (Huber et al., 2017; Jezberová und Komárková, 2007a, 2007b). Die Faktoren, die die morphologischen Veränderungen steuern sind bisher nur in Einzelfällen untersucht, verdeutlichen aber die Probleme der Artbestimmung, -ansprache und -abgrenzung mittels morphologische Merkmale.

Picocyanobakterien ( $\alpha$ -Picocyanobakterien und andere) sind in sehr unterschiedlichen aquatischen Habitaten zu finden. Hohe Abundanzen wurden aus den oligotrophen Ozeanen (Chisholm et al., 1992; Pernthaler et al., 2002), aber auch aus eutrophen Süß- und Brackwassern berichtet (Callieri, 2007; Ernst et al., 2003; Komárková-Legnerová und Cronberg, 1994; Schoor et al.,

2008 und darin). Die nachgewiesenen Picocyanobakterien unterschieden sich morphologisch kaum, lassen sich jedoch genetisch trennen (z.B. Robertson et al., 2001). Es gibt eine Gruppe, die nur in marinem Milieu zu finden ist, während eine andere Gruppe vorrangig im brackigen und Süßwassermilieu vorkommt (Urbach et al., 1992). Bisher wurden noch keine Picocyanobakterien gefunden, die sowohl im offenen Ozean als auch im Süßwasser vorkommen. Es gibt damit eine Barriere, die die verschiedenen phylogenetischen Linien trennt.

Die Picocyanobakterien sind polyphyletisch, verteilen sich also auf verschiedene Kladen (Äste) in den Phylogenien. Eine besonders gut untersuchte und gleichzeitig monophyletische (= ein einziger Ursprung) Gruppe der Picocyanobakterien sind die  $\alpha$ -Picocyanobakterien. Diese basale Gruppe innerhalb der Ordnung Synechococcales zeichnet sich durch einige Besonderheiten aus. So besitzen sie die  $\alpha$ -Form des namensgebenden photochemisch wichtigen Enzyms Ribulose-bisphosphat Carboxylase Oxygenase (RubisCO), die sich von allen anderen Cyanobakterien und Landpflanzen unterscheidet (Hess et al., 2001). Weitere Merkmale dieser besonderen Gruppe sind reduzierte Genome, die weit weniger DNA-Basen enthalten als andere Cyanobakterien (Scanlan et al., 2009). Es wurden bisher über 60 Genome von  $\alpha$ -Picocyanobakterien sequenziert, bei denen keinerlei Nitrogenasegene nachgewiesen werden konnten. Auch die bekannten Cyanotoxingene wurden in den Genomen nicht nachgewiesen (Scanlan et al., 2009). Die Unterscheidung von anderen Picocyanobakterien ist deshalb für Wassermanagementstrategien von großer Bedeutung.

Die  $\alpha$ -Picocyanobakterien umfassen die marin lebenden Gattungen *Prochlorococcus* und *Picosynechococcus* (früher: *Synechococcus*), sowie die limnisch (Süßwasser) und brackig vorkommenden *Cyanobium*-Arten (früher oft als *Synechococcus* bestimmt) (Shih et al., 2013).

### 1.2 Lagunen und Ästuare

Lagunenartige Ästuare sind Systeme, die als Schnittstelle von Fluss und vorgelagerter See viele Besonderheiten zeigen. Sie unterliegen dem Einfluss des angrenzenden Meerwassers und dem Zustrom des Süßwassers der Flüsse. Flüsse tragen oft eine erhöhte Nährstofffracht aus ihrem Einzugsgebiet

in die Ästuare ein. Besonders Lagunen (an der Ostsee: Bodden), können durch hohe Residenzzeiten des Wassers als Nährstofffalle dienen. Die Folge können punktuelle, aber auch ausgedehnte Phytoplanktonblüten sein, die durch Sedimentationsprozesse die Nährstoffe in Form von Biomasse im System halten.

Die vorgelagerte See profitiert von dem vorgereinigten Wasser, in dem keine küstennahen Algenblüten auftreten und die Strände vor Allem touristisch nutzbar bleiben. Die bedeutendsten Nährstoffe, die das Algenwachstum begünstigen sind Stickstoff- und Phosphorverbindungen, wobei gezeigt wurde, dass die Phosphor- und Stickstoffverbindungen limitierend sind (Berthold, 2016; Schindler, 1978).

Nährstoffeintrag führt in den Lagunen zu erhöhter Produktivität (Eutrophie). Die intensive landwirtschaftliche und touristische Nutzung des Umlandes beschleunigt die Eutrophierung (Schlungbaum et al., 1994; Selig et al., 2006). Die vorhandenen Nährstoffe werden in den flachen, strömungsarmen und sich im Frühjahr und Sommer schnell erwärmenden Lagunenbacken zügig in die Biomasse eingebaut. Die Folge sind starke Algenblüten, die durch den beständigen Nährstoffzufluss über lange Zeit Bestand haben können (Schiewer, 1997). Das Ergebnis sind eine trübe Wassersäule mit geringer Sichttiefe, Schlickbildung und die Gefahr von Sauerstoffmangel und Anoxie durch Zehrungsprozesse bei Eisbedeckung über mehrere Wochen (Schlungbaum et al., 1994). Erst mit der Abkühlung des Wassers brechen diese Blüten zusammen und die einströmenden Nährstoffe werden nicht mehr aufgenommen, sind also im Freiwasser nachweisbar (Schumann et al., 2005). Die Blütenereignisse unterliegen einer Saisonalität in ihrer Stärke (Biomasse und Produktivität) aber auch in ihrer Zusammensetzung (Schoor et al., 2008; Schumann et al., 2005; Wasmund and Schiewer, 1994).

Die Phytoplanktongemeinschaften in Ästuaren sind stets ein Gemisch von Süßwasser- und Brack- bzw. Meerwassergemeinschaften. Insbesondere in flachen Lagunen mit ausgeprägten Gradienten in der Salinität und in den Nährstoffmengen müssen die Organismen eine Toleranz bezüglich dieser Faktoren besitzen, um bestehen zu können. Vor Allem Cyanobakterien

dominieren hoch produktive Gewässer. Die treibenden Faktoren dafür sind Licht, Stickstoff und Phosphor (Smith, 1986). Die sehr kleine Zellen der Picocyanobakterien haben zusätzlich durch das große Oberflächen-Volumen-Verhältnis bei geringen Nährstoffkonzentrationen einen Konkurrenzvorteil (Raven, 1998).

Die Picocyanobakterien *Aphanothece*, *Aphanocapsa* und *Merismopedia* wurden sowohl in der Ostsee als auch in den brackigen Lagunen nachgewiesen (DZBK: Geiß et al., 2004; Pilkaityte, 2007; Schoor et al., 2008; *Jasmunder Bodden*: Schiewer, 1997; *Schlei*: Feibicke, 1994) und in die lokale Bestimmungsliteratur aufgenommen (Ostseealgenflora, Pankow, 1990). Die Gemeinschaften von flachen Lagunen gleichen denen von inländischen flachen und eutrophen Seen. Picocyanobakterien kommen dort ganzjährig vor und dominieren zumindest zeitweise das Phytoplankton (zusammengefasst in Callieri, 2007). Diese Gemeinschaften sind typisch für viele flache, eutrophe, ungeschichtete Gewässer mit erhöhter Leitfähigkeit und geringer Sichttiefe (Callieri, 2007).

### 1.3 Monitoring

Monitoring ist die kontinuierliche Überwachung langfristiger Entwicklungen sowie kurzfristiger Änderungen und wird in der Fläche oft von Umweltämtern (z.B. Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern (LUNG-MV)) oder an einzelnen wissenschaftlichen Einrichtungen (z.B. Biologische Station Zingst, Universität Rostock) betrieben. Im Gegensatz zu den punktuellen Untersuchungen z.B. bei akuten Algenblüten, findet das Monitoring in regelmäßigen Intervallen statt und zeichnet die gesamte Entwicklung über ein, mehrere oder in seltenen Fällen auch viele Jahre hinweg auf. Monitoringdaten, u.a. von Phytoplanktongemeinschaften, werden auch länderübergreifend für die ökologische Gewässergütebewertung genutzt (Bundesländer-Messprogramm, OSPAR, EU-WRRL, EU-MSR, HELCOM).

Für den Zingster Strom der Darß-Zingster Boddenkette reicht das Phytoplankton-Monitoring bereits 25 Jahre zurück. Die Veränderungen im Phytoplankton über diesen Zeitraum wurden dokumentiert und zeigten vor mehr als 15 Jahren eine Verschiebung der Gemeinschaft zugunsten der Cyanobakterien, die bis heute besteht (Schiewer, 1997).

Blütenereignisse von Mikroalgen sind meist kurze Zeiten sehr hoher Algenbiomasse. In diesen Phasen bilden einige wenige Arten (i.d.R. 1-2 Arten) einen Großteil der Biomasse. In der Ostsee, aber auch in Seen, Wasserreservoirs und Lagunen werden solche Blütenereignisse häufig von Cyanobakterien dominiert. Sehr bekannte Blütenbildner sind Arten der Gattungen *Microcystis*, *Nodularia* oder *Aphanizomenon* (Wasmund, 1997; Willame et al., 2006). Insbesondere toxische Arten und ihre Entwicklung stehen im Fokus von Untersuchungen (Merel et al., 2013).

Die Cyanotoxine sind auch für Tiere und Menschen gefährlich und können etwa die Leber schädigen. Deshalb werden Strände vorsorglich gesperrt, wenn Cyanobakterienblüten mit bekannten Toxinbildnern wie *Microcystis*- oder *Nodularia*-Arten auftreten (Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern (LAGuS-MV)). Die eigentliche Giftkonzentration wird aber in der Regel nicht bestimmt, sondern die Artenzusammensetzung im Gewässer zur Gefahrenabschätzung genutzt. Blüten von Picocyanobakterien hingegen sind kein Standardszenario für Strandsperrungen, weil sie zwar weltweit, aber nicht sehr häufig in Massen auftreten und viele Vertreter lange Zeit als nicht toxisch galten. Neuere Arbeiten wiesen auch bei Picocyanobakterien Toxingene nach, jedoch sind bei ganzen Gruppen keine bekannten Toxingene gefunden worden (Jasser und Callieri, 2017; Latysheva et al., 2012).

Die Picocyanobakterien sind mit der Standard-Vergrößerung von 200- bis 400-fach sehr schlecht sichtbar und können damit nicht bestimmt werden. Oftmals werden sie deshalb beim Standard-Monitoring (z.B. nach HELCOM) nicht erfasst. Die Kolonien aus Einzelzellen  $< 2\mu\text{m}$  sind mit dieser Methode ebenfalls nicht genau zu bestimmen. Dennoch sind die morphologischen Bestimmungen der Standard im Monitoring und in der ökologischen Gewässergütebewertung. Staatliche Ämter verlangen dafür Listen der vorkommenden Organismen auf Art-Ebene (z.B. EU-WRRL, 2000). Es wurden Indikatorarten festgelegt, anhand derer die Gewässergüte abgeleitet wird. Ökologen nutzen dafür häufig die Klassifizierung nach (Reynolds et al., 2002). In der Wissenschaft wird die Bestimmung von Organismen mit molekulargenetischen Methoden unterstützt (Komárek, 2016). Die morphologischen und genetischen Daten können aber

nur an Isolaten oder mittels aufwändiger *in situ*-Methoden direkt miteinander verknüpft werden (Moter und Göbel, 2000).

Rein genetische Untersuchungen an Umweltproben sind mit Hochdurchsatzmethoden möglich geworden. Das sogenannte Next Generation Sequencing erzeugt mehrere Hunderttausend bis 1,5 Millionen kurze Sequenzen aus Umweltproben in einem einzigen Durchlauf. Diese Menge an Daten bildet, je nach genutzter Genregion und Spezifität der Primer, kulturunabhängig die spezifischen Gruppen ab, die an diesem Standort zu finden sind. Es sind mit dieser Methode auch Aussagen zu Abundanzen der einzelnen Organismen möglich. Die Morphologie der sequenzierten Organismen kann daraus allerdings nicht sicher abgeleitet werden, wodurch die Monitoringdaten mit den wissenschaftlich taxonomischen Daten nicht vergleichbar sind.

### 1.4 Hypothesen

Aus den oben genannten Problemen und Ansätzen ergeben sich verschiedene Fragestellungen und Hypothesen. Den Rahmen für diese Arbeit stellt die Verbindung von wissenschaftlichen Standards und Erkenntnissen mit angewandten Aspekten der Artbestimmung dar.

#### **Der vorherrschende Morphotyp ist genetisch den $\alpha$ -Picocyanobakterien zuzuordnen.**

Es wurden in den vergangenen Jahren morphologisch Picocyanobakterien der Ordnung Chroococcales als abundanteste Phytoplankter in der Darß-Zingster Boddenkette nachgewiesen. Die Morphologie gibt jedoch keine eindeutige Auskunft über den vorhandenen Genotyp. Der vorherrschende Morphotyp in der DZBK sind Picocyanobakterien des *Aphanothece*-Komplexes. Die DNA-Sequenzen aus vorangegangenen Arbeiten zum Phytoplankton der DZBK wurden der Gattung *Synechococcus* zugeordnet und entfielen auf die Gruppe der  $\alpha$ -Picocyanobakterien (Synechococcales). Der Nachweis wurde an wenigen Klonen aus der Darß-Zingster Boddenkette geführt. Zusammen mit der Erkenntnis, dass die Morphotypen innerhalb eines Genotyps sehr variabel sein können, ist die Zuordnung dennoch naheliegend und wird in dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden überprüft.

### **Die genetische Diversität ist geringer als die morphologische.**

Nach Kell (1973) umfasst die Artenliste der Cyanobakterien in der Darß-Zingster Boddenkette 61 Taxa. In den letzten Jahren traten insgesamt etwa 40 Taxa regelmäßig auf (Schoor et al., 2008). Es handelt sich dabei hauptsächlich um Picocyanobakterien der Ordnung Chroococcales. In ersten genetischen Analysen desselben Gewässers wurden jedoch nur wenige Genotypen in einem kulturunabhängigen Ansatz nachgewiesen (Geiß et al., 2004). Auch mit einem genetischen Fingerprint war nur ein Zehntel der morphologischen Artenzahlen zu finden (Schlie, 2009). Es handelt sich also eventuell um eine Überbestimmung durch phänotypische Plastizität innerhalb einer oder weniger Gattungen. Die genetische Vielfalt ist damit unter Umständen deutlich geringer als durch morphologische Untersuchungen anzunehmen wäre.

### **Die Identität der Picocyanobakterien ist bedeutend für die Gewässergütebewertung.**

Eine Änderung in der Identität von Picocyanobakterien auf Ordnungsebene führt zu deutlich veränderten physiologischen Potentialen, die sich daraus ableiten. Die Picocyanobakterien der Chroococcales sind genetisch vielfältiger ausgestattet als die Synechococcales (Scanlan et al., 2009). Die Chroococcales können Stickstofffixierungs- und Toxingene besitzen, die ihnen das Potential zur Stickstoff- und Gefahrenquelle geben. Die Synechococcales hingegen besitzen keine Gene zur Stickstofffixierung und ebenfalls keine der „klassischen“ Toxingene (Microcystin, Nodularin, etc.). Die Synechococcales sind damit hinsichtlich des Managements anders zu bewerten als die Chroococcales.

## **1.5 Umsetzung**

Die dominierenden Cyanobakterien der untersuchten Systeme wurden mit einem polyphasischen Ansatz identifiziert, der die genetische und morphologische Bestimmung *in situ* und *in vitro* umfasst. Dabei wurden verschiedene, sich ergänzende genetische Methoden verwendet und mit den Langzeitdaten der biologischen Station Zingst verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probennahmestandorte

Probennahmen fanden in der Schlei, den Rügener Bodden und der Darß-Zingster Boddenkette (*Abbildung 1*) in den Jahren 2013 und 2016 statt (Tabelle). Alle Proben sind Vollproben und stammen aus Oberflächenwasser (ca. 30 cm Tiefe).

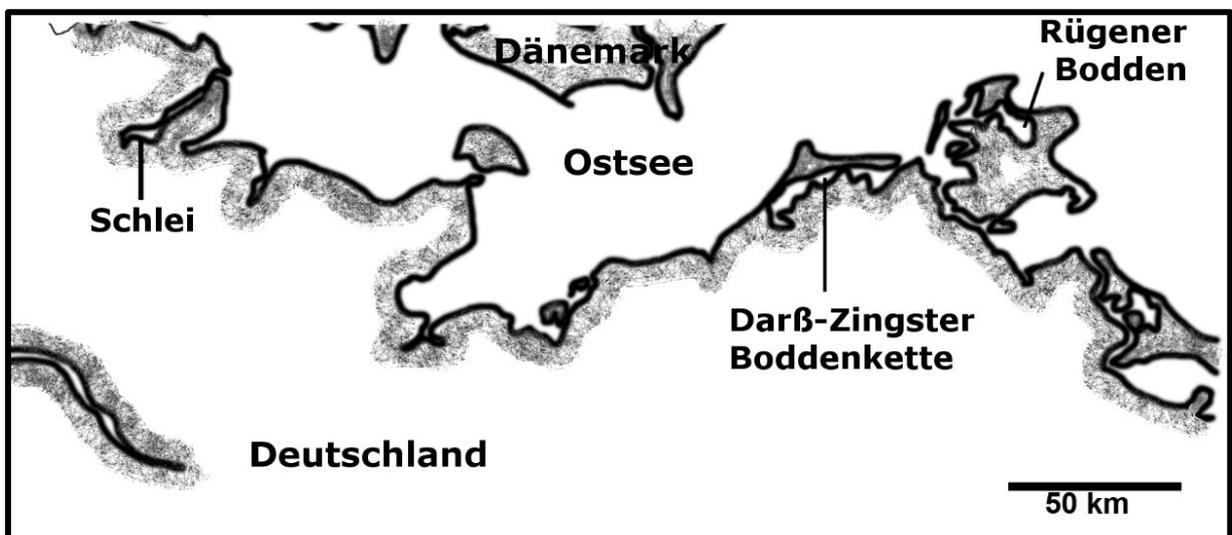


Abbildung 1 Übersichtskarte der deutschen Ostseeküste

Die meisten Proben wurden in der Darß-Zingster Boddenkette genommen. Die einzelnen Stationen der DZBK befinden sich entlang der Salinitäts- und Nährstoffgradienten und an der Station im Zingster Strom (s. Tabelle 1 und *Abbildung 2*). Die Station Zingster Strom wird seit mehr als 40 Jahren im regelmäßigen Monitoring beprobt und es gibt ein enges Netz von Monitoringdaten, von denen einige täglich gemessen werden (Baudler, 2004; Schumann et al., 2006). Die restlichen Stationen der DZBK werden monatlich untersucht.

Tabelle 1 Liste der Probennahmestandorte 2013 und 2016

Gewässer	Standort	Sal.	Saison/Jahr
Schlei	Ufernah	5,4	Frühjahr/Herbst 2016
Kleiner Jasmunder	Ufernah	4,8	Frühjahr/Herbst 2016
Großer Jasmunder	Ufernah	7,65	Frühjahr/Herbst 2016
<b>Darß-Zingster Boddenkette</b>			
DB19 (Ribnitzer See)	R2	2,3	Frühjahr/Herbst 2016
DB16 (Saaler Bodden)	R86/88	3,3	Frühjahr/Herbst 2016
DB10 (Bodstedter Bodden)	R37/44	4,4	Frühjahr/Herbst 2016
ZS (Zingster Strom)	ZS	5,4	Frühjahr 2013, Frühjahr/Herbst 2016
DB06 (Barther Bodden)	R1B65	6,2	Frühjahr/Herbst 2016
DB02 (Grabow)	B53	7,5	Frühjahr/Herbst 2016
DB01 (Pramort)	R37/46	8,0	Frühjahr/Herbst 2016

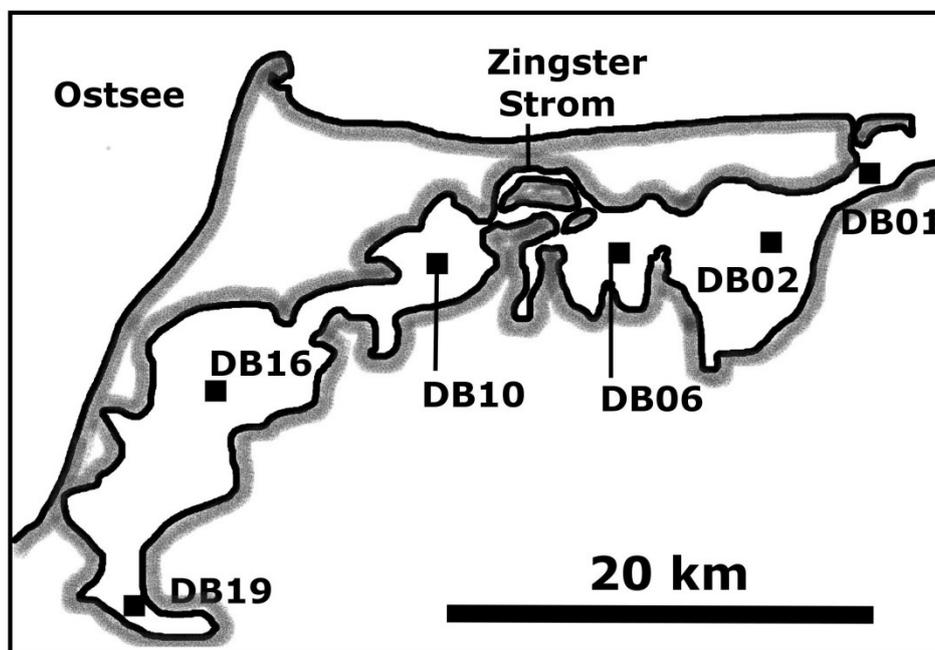


Abbildung 2 Karte Darß-Zingster Boddenkette mit Probennahmestationen

Die Isolate aus der DZBK stammen aus früheren Probenahmen (Albrecht, 2013; Sassenhagen, 2010; Schlie, 2009). Im Jahr 2016 wurden die Schlei, die Rügener Bodden, sowie die DZBK im Frühjahr und Herbst beprobt, um diese mit verschiedenen molekularen Methoden zu untersuchen. Weitere Proben des Jahres 2016 aus der DZBK wurden während des regulären Monitorings genommen. Sämtliche Proben für molekulare Untersuchungen und Zellzählungen waren Oberflächenwasser. Alle Proben des Jahres 2016 hatten

ein Volumen von 5 Litern, die für die genetischen Analysen auf 2 ml durch Zentrifugation (MegaFuge 1.0, Heraeus; 10.000 rpm; 5 min.) konzentriert und anschließend bei -20 °C eingefroren wurden.

Vollproben für die Zellzählungen wurden mit Lugol fixiert (5 Tropfen pro 20 ml Probe) und dunkel gelagert. Proben für Zellzählung mittels Epifluoreszenzmikroskopie wurden mit 1 ml 25 %-igem Glutaraldehyd pro 20 ml Probe versetzt und im Kühlschrank gelagert.

### 2.2 Zellzählungen

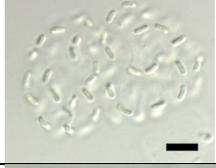
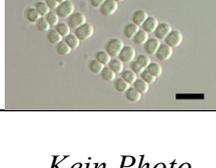
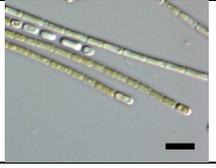
Cyanobakterienkolonien und eukaryotisches Phytoplankton wurden an einem Lichtmikroskop (Euromex) von R. Schumann bei 256-facher Vergrößerung (je 16-fache Vergrößerung durch Okulare und Objektiv) in Sedimentierkammern mit einem Volumen von 1 ml und einer Tiefe von 3 mm gezählt. Es wurden immer mindestens 18 Okulargitternetzfelder von 0,36 mm<sup>2</sup> über den Kammerdurchmesser verteilt ausgezählt. Es wurden mehr als 100 Individuen der drei dominierenden Arten gezählt. Gab es nicht ausreichend dominante Arten, waren entsprechend der HELCOM-Anleitung 500 Individuen insgesamt das Minimum. Die Zählungen wurden nicht wiederholt. Die Zellgrößen der kleinen Cyanobakterien (< 5 µm) wurden mittels Elektronen-Scan-Mikroskopie (SEM) gemessen. Fadendurchmesser wurden an frischen Proben durch Bildanalyse (AnalySiS) ermittelt. Alle Fadenlängen wurden hingegen bei den Zählungen bestimmt. Größere Eukaryoten wurden in Größenklassen sortiert, insbesondere Diatomeen.

Die Picocyanobakterien wurden ebenfalls von R. Schumann mit Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Unterproben von 0,5 bis 1 ml wurden mittels Vakuumfiltration (max. -100 mbar) auf mit Irgalanschwarz vorgefärbte Filter (Track-Etch 0,2 µm; Durchmesser 25 mm, Sartorius) gezogen. Die Filter wurden anschließend mit frisch gefilterter (0,2 µm Zellulose-Acetat-Filter, Whatman) DAPI-Lösung (4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), 92 µmol l<sup>-1</sup> in Phosphatpuffer, pH = 7,6) für fünf Minuten gefärbt. Die DAPI-Lösung wurde abfiltriert (wie zuvor) und die Filter dann in Fluoreszenz-freies Immersionsöl zwischen Objektträger und Deckglas eingebettet und unter UV-Anregung (Filtersatz: U-MWU2) an einem Olympus BX-51-Mikroskop gezählt. Die DAPI-

Färbung wurde hauptsächlich für die Zählung heterotropher Bakterien verwendet. Die Cyanobakterien wurden wenn möglich zuvor unter Nutzung der Autofluoreszenz bei Grünanregung (Filtersatz U-MWG2) ausgezählt. Die Gesamtvergrößerung betrug 1000-fach (Okular: 10-fach; Objektiv: 100-fach, UPlan FL 100 NA 1.3 oil). Es wurden mindestens 200 Zellen pro Filter in mindestens 20 Okulargittern ( $10.000 \mu\text{m}^2$ ) gezählt, wodurch eine Konfidenzspanne von  $\pm 14\%$  (Poisson-Verteilung) erreicht wurde. In regelmäßigen Doppelzählungen lag die Standardabweichung unterhalb von 20 %. Die Zellzahlen diverser Kolonietypen wurden bestimmt. Der „*Aphanothece*“-Komplex vereint alle Kolonien, die aus länglichen Zellen bestehen, z.B. *Cyanodictyon*, *Lemmermaniella* und *Aphanothece*, als einen Morphotypen. Der „*Snowella* und *Woronichinia*“-Komplex umfasst hingegen Kolonien, die aus kugeligen oder eiförmigen Zellen bestehen, deren Durchmesser über  $2 \mu\text{m}$  liegt und die Gallertstiele besitzen. Die wichtigsten Zählkategorien (Schumann et al., 2009) sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Zellzahlen wurden für 10 Kolonien pro Probe bestimmt und der Median pro Monat ermittelt (Zingster Strom:  $n_{\text{Kolonie}} = 30-40$  Zellen). Die Gesamtanzahl der Zellen wurde dann aus der Kolonieanzahl multipliziert mit der Zellzahl pro Kolonie berechnet.

Die Organismen wurden mit der Ostseealgenflora (Pankow, 1990), der Süßwasserflora (Komárek, 2013; Komárek and Anagnostidis, 1999, 2005) bestimmt und mittels weiterer Literatur taxonomisch aktualisiert.

**Tabelle 2 Zählkategorien der DZBK** mit Abundanzindikation, Zuordnung der Gattungen zu Ordnungen, Kurzbeschreibung morphologischer Merkmale und Beispielmikrophotographie. Photos: <sup>1</sup> R. Schumann, <sup>2</sup> I. Sassenhagen

Name/ Ordnung	Abun- danz	Ord- nung	Bestimmungsmerkmale	Photo
<i>Synechococcus</i> spp.	***	Synecho.	Kleine Einzelzellen, stäbchenförmig	
<i>Planktolyngbya</i> <i>contorta</i> <sup>1</sup>	***	Synecho.	Glatte, sehr schmale Fäden mit großen Windungen	
<i>Limnothrix</i> <i>planktonica</i>	**	Synecho.	Fäden mit länglichen, ein wenig eingeschnürten Zellwänden und endständigen Vesikeln in den Zellen	
<i>Aphanothece</i> Komplex <sup>1</sup>	*****	Chrooc.	Kleine (< 2 µm), längliche Zellen in mehr oder weniger unregelmäßigen Kolonien	
<i>Snowella</i> sp. <sup>1</sup>	*	Chrooc	Sphärische Zellen ca. 5 µm, außenständig an Kolonie auf Gallertstielen	
<i>Woronichinia</i> <i>compacta</i> <sup>1</sup>	*	Chrooc.	Konisch zur Außenseite der Kolonie verdickte Zellen; eng stehend in Kolonie	
<i>Microcystis</i> sp.	*	Chrooc.	Große Zellen (ca. 8-10 µm) mit gekörnter Innenstruktur	
<i>Merismopedia</i> sp. <sup>1</sup>	*	Chrooc.	Sehr regelmäßige Kolonien aus 8er-Paketen, Zellen ca. 2-3 µm	
<i>Oscillatoria</i> <i>limosa</i>	*	Oscill.	Breite, kurze Zellen, palettenartig gestapelt, Enden konisch	Kein Photo
<i>Cronbergia</i> sp. (früher: <i>Anabaenopsis</i> ) <sup>2</sup>	*	Nostoc.	Ovale Zellen, mäßig eingeschnürt, endständige Heterozyten, keine Hormogonien	

## 2.3 Kultivierung und Bestimmung von Isolaten

Isolate wurden aus Vollproben der DZBK gewonnen und bestimmt (Albrecht et al., 2017). Die Isolate aus dem Jahr 2013 wurden auf Festmedium (BG11, 075 % Agar) angezogen ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $35\text{ }\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ) und die Kolonien bei erkennbarer Größe auf weitere Festmediumplatten vereinzelt. Abstriche der Transferstäbchen wurden mikroskopiert und die Organismen auf Zugehörigkeit zu den Cyanobakterien überprüft. Nach zwei Wochen wurden die bereits vereinzelt Kolonien auf Unialgalität kontrolliert und diejenigen Isolate, die mehr als einen Morphotyp umfassten, erneut ausgestrichen und anschließend vereinzelt. Die unialgalen Isolate (Gesamtzeit der Kultivierung ca. vier Wochen) wurden morphologisch bestimmt und unter denselben Bedingungen gehältert. Die Isolationsmethoden der weiteren Stämme, die in den Arbeiten von Schlie (2009) und Sassenhagen (2010) hergestellt wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 3 Methodenübersicht zur Isolatgewinnung in der DZBK**

<b>Methode</b>	<b>Medium</b>	<b>Arbeit</b>
Einzelkolonieisolierung (Mikromanipulator, Inversmikroskop)	PE Salinität 7	Schlie 2009
Anreicherungskultur und Einzelkolonie- / Einzelfilament-isolierung (Mikromanipulator, Inversmikroskop)	Anreicherung mit 10 % PE Sal. 7; Kulturen: PE Sal. 7	Sassenhagen 2010
Kultivierung auf Festmedium und Kolonie-Isolierung (Impföse, Stereomikroskop)	BG11 0,75 % Agar	Albrecht 2013

Die Isolate wurden bei 1.000-facher Vergrößerung an einem Lichtmikroskop (BX-51 Olympus) mit differentiellem Interferenzkontrast und der oben genannten Literatur bestimmt. Alle Isolate wurden zudem mit Ausziehtusche gefärbt, um Schleimhüllen sichtbar zu machen.

## 2.4 Einzelzellisolierung

Einzelzellen bzw. Einzelkolonien wurden aus Vollproben und Rohkulturen gewonnen. Die Einzelkolonien wurden mit einem Mikromanipulator bzw.

ausgezogenen Pasteurpipetten (Öffnungsdurchmesser ca. 50 µm) über Verdünnungsstufen isoliert und in Mediumtropfen (PE, Sal. 7) überführt. Anschließend wurde mit Epifluoreszenzmikroskopie (Filtersets: U-MWG2 Grünanregung für Cyanobakterien-Phycobiline und U-MWB2 für Chlorophylle) auf das Vorhandensein der Kolonie, sowie auf weiterer Zellen geprüft. Die isolierten Kolonien wurden in PCR-Reaktionsgefäße überführt und weiter molekular untersucht.

## 2.5 Molekulargenetische Analysen

### 2.5.1 DNA-Isolierung und PCR

Die Proben wurden mit Flüssigstickstoff und Glasperlen (ca. 100 µm) in einer Retsch-Mühle zwei Mal mit 30 Hz für je eine Minute gemahlen. Die DNA wurde danach mit dem DNeasy Plant Minikit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert.

Anschließend wurde das rRNA-Operon mittels PCR vervielfältigt. Der Genbereich, der für die Analysen genutzt wurde, umfasste die 16S-, ITS- und den Anfang der 23S-Region. Es wurden cyanobakterien-spezifische Primer (Tabelle 4) und folgendes PCR-Protokoll verwendet: 3 Min 96 °C; 30 Zyklen 1 Min 96 °C, 2 Min 55 °C und 3 Min 68 °C; zuletzt 10 Min 68 °C. Für die PCR wurde 1 µl DNA in einen 26 µl-PCR-Ansatz gegeben (13 µl Qiagen Taq-Polymerase Mastermix, 12 µl RNase-freies Wasser, je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer).

Das PCR-Produkt wurde anschließend auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen, das mit dem Farbstoff Midori-Green Advanced (Nippon Genetics) versetzt wurde (10 µl Midori/ 100 ml Agarose). Die PCR-Produkte wurden in dem Agarosegel für eine Stunde bei 120 V aufgetrennt. Die Gele wurden mit Blauanregung in der GelPic LED Box (Nippon Genetics) analysiert und dokumentiert. Die PCR-Produkte, die Banden erzeugten, wurden mit dem Qiagen Purification Kit nach Herstellerprotokoll gereinigt und für die Sequenzierung bzw. Klonierung verwendet.

**Tabelle 4 Sequenzen aller verwendeten Primer für die PCR, die Sequenzierung und 16S Amplicon;** <sup>1</sup>Wilmotte et al., 1993; <sup>2</sup>Marin et al., 2005; <sup>3</sup>Nübel et al., 1997; <sup>4</sup>Klindworth et al., 2013

Primer	Sequenz (5'-3')	PCR	Sequenzierung
SSU-4-forw <sup>1</sup>	GAT CCT KGC TCA GGA TKA ACG CTG GC	x	x
Wil 3 <sup>1</sup>	TAC GGR AGG CAG CAG		x
Wil 6 <sup>1</sup>	GCC AGC AGC CGC GGT AA		x
Wil 12 <sup>1</sup>	GYA ACG AGC GCA ACC C		x
Wil 14 <sup>1</sup>	TGT ACA CAC CGC CCG TC		x
Wil 5 <sup>1</sup>	CTG CTG CCT YCC GTA		x
Wil 9 <sup>1</sup>	GGG GTA TCT AAT CCC		x
Wil 16 <sup>1</sup>	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA		x
Wil 18 <sup>1</sup>	TTT GCG GCC GCT CTG TGT GCC TAG GTA TCC		x
CPL-10R <sup>2</sup>	GCC GGC TCA TTC TTC AAC	x	x
CYA106F <sup>3</sup>	CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A	x	
CYA359F <sup>3</sup>	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG	x	
CYA781R <sup>3</sup>	GAC TAC WGG GGT ATC TAA TCC CWT	x	
S-D-Bact-0008-a-S-16 <sup>4</sup>	AGA GTT TGA TCM TGG C		Amplicon
S-D-Bact-0343-a-A-15 <sup>4</sup>	CTG CTG CCT YCC GTA		Amplicon

## 2.5.2 Sequenzierung, Assemblierung und Alignierung

Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit den Sequenzierprimern (Tabelle 4) versetzt und zum Sequenzieren an den Qiagen Sequencing Service verschickt. Die Rohsequenzen wurden mit der Systemsoftware Geneious R8 überprüft und fehlerhafte Sequenzen aussortiert. Die Sequenzen wurden ebenfalls mit Geneious R8 automatisch assembliert und auf Uneindeutigkeiten überprüft. Durch Überlappung der Einzelsequenzen können Uneindeutigkeiten beseitigt werden.

Die so erstellten Konsensussequenzen wurden anhand der Sekundärstruktur manuell mit der Software BioEdit (Hall, 1999) homologisiert (= aligniert). Jede Helix, deren Sequenz im Alignment von den anderen abwich, wurde mit der Web-Anwendung mfold (Zuker, 2003) neu gefaltet und das Alignment entsprechend angepasst. Anhand der Sekundärstruktur wurde eine Maske erstellt, die die entstehenden Lücken im Alignment bei phylogenetischen Analysen ausspart.

### 2.5.3 Phylogenetische Analysen

Die Phylogenien wurden mit verschiedenen Programmen und Algorithmen berechnet. Für Maximum-Likelihood-Analysen (ML) wurde das Programm MEGA6 (Tamura et al., 2013) und für bayesianische Analysen das Programm MrBayes (Huelsenbeck und Ronquist, 2001) verwendet. Für die Berechnung von Phylogenien stehen verschiedene evolutionäre mathematische Modelle zur Verfügung. Zur Auswahl des geeigneten Modells für das jeweilige Alignment wird der in MEGA6 implementierte Modeltest genutzt und für ML-Berechnungen das Akaike-Criterion (AIC; Akaike, 1981), für bayesianische Analysen das Bayesian Inference Criterion (BIC; Schwarz, 1978).

Bayesianische Phylogenien wurden mit dem Modell GTR+G+I für 5.000.000 Generationen berechnet und die statistische Absicherung wird an den Ästen ausgegeben. Bei den ML-Analysen wurden stets 1.000 Bootstrep-Replikate berechnet und die statistische Unterstützung in Prozent angegeben. In den Abbildungen wurden gleiche Kladen mit den Unterstützungen der verschiedenen Algorithmen gekennzeichnet.

### 2.5.4 16S Amplicon Sequenzierung

Das 16S Amplicon Sequencing ist eine Methode des sogenannten Next Generation Sequencing (NGS), die die genetische Analyse von Umweltproben anhand vieler Tausend Sequenzen ermöglicht. Die Sequenzen wurden mit der Plattform Illumina MiSeq (Roche) von S. Gschwendtner generiert. Die Primer für die Illumina-Sequenzierung sind in Tabelle 4 angegeben und stammen von (Klindworth et al., 2013). Das Genstück umfasst ca. 330 bp der variablen Regionen 1 und 2 der 16S rRNA. Für die Analysen wurden bakterienspezifische Primer verwendet, die neben den Cyanobakterien auch alle anderen Bakteriengruppen abdecken. Es wurden die Amplifikate (PCR-Produkte) aus den Vollproben sequenziert. Es wurden immer zusammengehörige Paare eines Genstücks sequenziert (Paired End), die mit der Software Qiime (Caporaso et al., 2010) assembliert (zusammengefügt) und dann weiter verarbeitet wurden. Die Schritte, die die Software für diese großen Datensätze von bis 1,5 Millionen assemblierten Sequenzen durchführt, werden im Folgenden grob umrissen.

Nach der Assemblierung wurden die Sequenzen auf ihre Länge überprüft und die durch falsche Assemblierung zu langen Sequenzen ( $> 450$  bp), sowie zu kurze Sequenzen ( $< 250$  bp) aussortiert. Weiterhin wurden die Sequenzen gegen die zugrunde gelegte Datenbank auf Chimären überprüft. Chimären entstehen, wenn zwei Sequenzen unterschiedlicher Herkunft assembliert wurden. Darauf folgten ein Vergleich aller Sequenzen zueinander und gleiche Sequenzen oder jene, die sich in weniger als einer Nukleotidbase pro 100 Basen unterschieden. Gleiche Sequenzen (bis 1 % Unterschied) wurden zu Einzelsequenzen zusammengefasst. Sequenzen, die nur ein einziges Mal auftraten, wurden als Sequenzierfehler betrachtet und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Durch diese Schritte schrumpfte der Datensatz auf bis zu 5 oder weniger Prozent seiner ursprünglichen Sequenzanzahl.

Die übrigen Sequenzen wurden mit Referenzdatensätzen abgeglichen. In diesem Fall wurde das Referenzalignment von Greengenes (<http://greengenes.secondgenome.com>) für Bakterien verwendet. Die Amplicon-Sequenzen wurden mit dem Referenzalignment homologisiert und anschließend auf ihre Zugehörigkeit zu den phylogenetischen Gruppen überprüft. Das Ergebnis wurde mit der Software R (Skript von S. Gschwendtner) als Chart-Plots für die Klassen und Familien ausgegeben. Auf tiefere taxonomische Ebenen wurde wegen zu geringer Auflösung mit den kurzen Sequenzen verzichtet.

Die quantitative Analyse der Sequenzen zueinander kann als Richtungsweiser für die Abundanz der Gruppen herangezogen werden. Wegen fehlender Replikate sind jedoch keine endgültigen, abgesicherten quantitativen Aussagen möglich.

Für erste Analysen der Amplicon-Daten wurde die Software mothur (mothur.org) verwendet. Es wurden noch oben stehendem Muster Software-eigene Filter verwendet. Die annotierten und vorgefilterten Sequenzen wurden mit den in mothur verlinkten Datenbanken Greengenes, Ribosomal Data Project (RDP, Cole et al., 2014) und SILVA (Quast et al., 2013) abgeglichen und taxonomischen Einheiten zugeordnet. Die Ergebnisse der Analysen mit mothur

wurden jedoch verworfen, weil in allen drei Analysen keine Sequenzen den Cyanobakterien zugeordnet werden konnten.

### 2.5.5 T-RFLP

Die T-RFLP (terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) ist eine Standard-Methode für genetische Fingerabdrücke in Umweltproben. Ein amplifiziertes Genstück wird dabei durch enzymatische Verdauung in kleinere Stücke geschnitten (= Restriktionsverdau), deren Größe (= Fragmentlänge) von ihrer Sequenz und den möglichen Schnittstellen der Enzyme abhängt. Die Fragmente werden in einem Sequenzer analysiert, jedoch werden nur die am Ende (= terminal) mit einem Fluorophor am Primer versehenen Fragmente erfasst. Für verschiedene Genotypen ergeben sich verschiedene Muster in den Fragmenten, die daraufhin unterschieden werden können. Mittels T-RFLP kann die Anzahl verschiedener Genotypen und damit die genetischer Diversität eines Standortes bestimmt werden.

Für diese Arbeit wurde ein circa 1300 bp langes Stück der 16S rRNA verwendet, das mit cyanobakterienspezifischen Primern (BS-1F-FAM und CPL-10R) amplifiziert wurde. Der Vorwärtsprimer BS-1F wurde mit dem Fluorophor 6-Carboxyfluorescein (FAM) versehen. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Hae-III (New England Biolabs) über Nacht bei 37 °C verdaut, anschließend gereinigt mit dem SureClean-Kit (Bioline) und mit 96 %-igem Ethanol gefällt. Die gefällten Produkte wurden in 20 µl HID1 (gemischt mit 0,3 µl Größenstandard ROX500) gelöst, dann für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gelagert. Die fluoreszenzmarkierten Fragmente wurden mit einem ABI 3130 (Applied Biosystems) Sequenzer getrennt und die T-RFLP Elektropherogramme mit der Software GeneMapper (Applied Biosystems) analysiert.

Die Ergebnisse der Analyse wurden mit einem R-Skript nach Abdo et al. (2006) ausgewertet. Die Fragmente kleiner als 50 bp und länger als 500 bp wurden von der Analyse ausgeschlossen. Fragmente, die weniger als 50 bp umfassen, können Primer sein, Fragmente >500 bp können wegen der Marker-Begrenzung nicht quantifiziert werden. Die Fragmente zwischen 50 und 500 bp wurden mit einem Algorithmus, der echte Signale aus dem Grundrauschen

erkennt, normalisiert und standardisiert. Das Grundrauschen wurde über alle Proben und alle Signale ermittelt (Abdo et al., 2006). Die Anzahl der ausgegebenen Taxonomischen Einheiten (= Fragmente) hängt stark von dem Faktor ab, der die Bestimmungsgrenze der einzelnen Signale festlegt. In dieser Arbeit wurden die Faktoren 3 (Abdo et al., 2006) und 5 (Karin Glaser, pers. Kommunikation) getestet. Nach der Normalisierung wurde die Abundanz der TRFs als Anteil an der Summe aller Signalfächen berechnet.

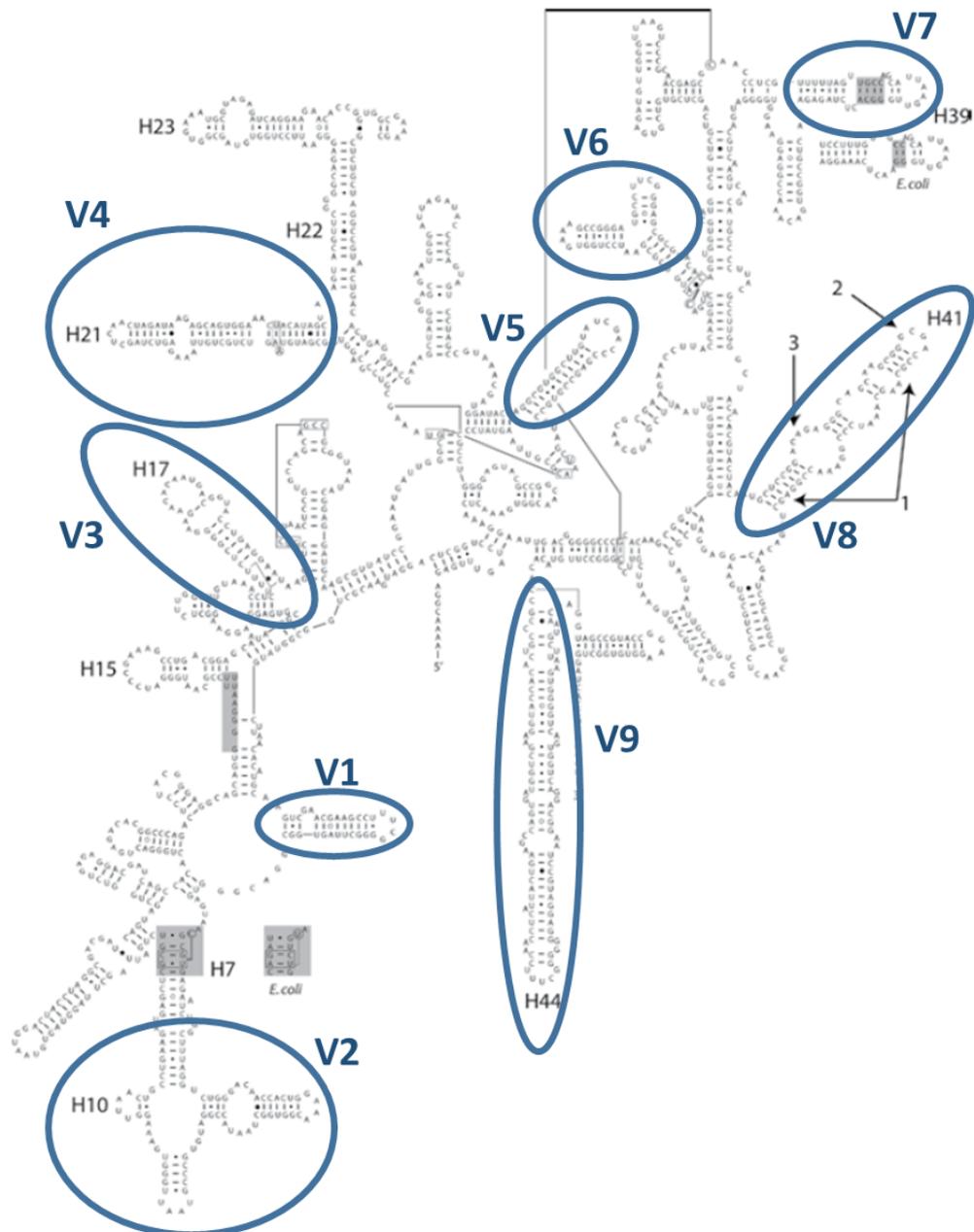
### 2.6 Klonierung

Die Klonierung ist eine Methode, bei der einzelne Kopien der gewünschten DNA in einen anderen Organismus eingebracht und durch diesen klonal vervielfältigt werden.

In dieser Arbeit wurde aus einer Umweltprobe die DNA extrahiert und mit den Primern CYA359F und CYA781R (Nübel et al., 1997; Tabelle 4) amplifiziert. Das amplifizierte Produkt war ein circa 600 bp langes Stück der 16S rRNA und umfasste die variablen Regionen 2-5 (s. Abbildung 3). Das Genstück wurde in das *lac*-Operon des Zielbakteriums transformiert.

Das Fragment wurde in die Vektoren pGEM-T-Vector (Invitrogen) enzymatisch ligiert. Die Ligation fand über Nacht bei ca. 0-5 °C statt. Der ligierte Vektor wurde anschließend in kompetenten, d.h. zur Aufnahme fremden Genmaterials vorbereitete, Bakterien transformiert. Die verwendeten Bakterien waren *Escherichia coli* K12 DH-5 $\alpha$ , die mittels chemischer Waschschrirte für die Transformation vorbereitet wurden und eine Ampicillin-Resistenz enthalten.

Der Ligationsansatz wurde zu den Bakterien gegeben und nach einer Hitzebehandlung bei 42 °C für 1 Minute auf Festmediumplatten aufgetragen. Das Festmedium war ein 1,5 %-iger Agar mit LB-Medium und Glukose, der zusätzlich mit Antibiotika (Ampicillin), X-Gal (zur Färbung nicht transformierter Bakterienkolonien) und IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) als Gen-Aktivator für das *lac*-Operon versetzt wurde.



**Abbildung 3** Beispiel einer Sekundärstruktur des 16S rRNA Moleküls (*Nostoc commune* verändert nach Řeháková et al., 2014)

Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Agarplatten auf Bakterienkolonien überprüft. Die Kolonien, die keine blaue Färbung aufwiesen, wurden mit sterilen Zahnstochern isoliert und in Flüssigmedium (LB + Glukose) bei 37 °C über Nacht unter Schütteln vermehrt. Die Bakterienkulturen wurden in einem weiteren Schritt genetisch untersucht. Dazu wurde die DNA durch Erhitzen der Kulturenprobe extrahiert und entsprechend 2.5.1 mittels PCR und den CYA359F und CYA781R amplifiziert und mittels Gelelektrophorese

ausgewertet. Bei Vorhandensein von DNA-Banden im Gel wurden die PCR-Produkte gereinigt und sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend mit der NCBI-Datenbank abgeglichen und phylogenetisch untersucht, anhand eines auf die Länge der Klonsequenzen gekürztes Referenzalignments (600 bp).

### 2.7 Fluorescence *in situ* Hybridisierung (FisH)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ist eine Methode zur direkten Abbildung bestimmter genetischer Eigenschaften eines Organismus. Dazu werden Oligonukleotidsonden mit einem Fluorophor markiert. Die Oligonukleotidsonden binden an den Genabschnitt, an den sie sich komplementär anlagern können und sind bei erfolgreicher Bindung mit Epifluoreszenz-Mikroskopen nachzuweisen.

Die Sonde wurde anhand eigener Referenzsequenzen und der ARB-Silva Datenbank erstellt. Es wurde die V3-Region der 16S rRNA genutzt. Als Fluorophor wurde FITC (Fluoresceinisothiocyanat; Biozym) verwendet, das mit Blauanregung (Filtersatz: U-MWB2) grüne Fluoreszenz emittiert.

Zur Vermeidung der falsch positiven Signale durch Nicht-Ziel-Organismen, wurden zusätzlich zur Sonde Kompetitoren entwickelt. Die Kompetitoren haben die exakt gleiche Sequenz, wie die nicht Nicht-Ziel-Organismen und binden deshalb an diese besser als die Sonde selbst. Die Kompetitoren verhindern so eine Bindung der Sonde an die Nicht-Ziel-Organismen. Dadurch werden falsch positive Signale verhindert.

Weiterhin wurden Helfer-Sequenzen für die Sonde entwickelt, die die Sekundärstruktur um die Sonde herum für die Hybridisierung offen halten und es der Sonde ermöglichen an die Zielregion zu binden. Die Helfer sind der Sonde vor- und nachgelagert und etwas länger als die Sonde selbst.

Die Sonde wurde zunächst mit der Webanwendung math-FisH (Yilmaz et al., 2011) *in silico* auf ihre Hybridisierungsfähigkeit getestet und die Bedingungen für die Hybridisierung abgeschätzt. Es wurden unterschiedliche Bedingungen bei den Schritten zur Vorbereitung der Zellen, zur Verwendung zusätzlicher Oligonukleotidsequenzen als Helfer und Kompetitoren, sowie bei der Hybridisierung selbst getestet (Tabelle 5). Die verschiedenen

Einzelbedingungen wurden miteinander kombiniert, um das bestmögliche Ergebnis zu ermitteln. Kulturenreferenzen dienten als Positivkontrolle und wurden stets mitgeführt. Negativkontrollen ohne Sonde dienten dem Abgleich zur Vermeidung falsch positiver Signale durch Streulicht. Des Weiteren wurde mit dem Fluorophor DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; 10 mg·ml<sup>-1</sup>) gegengefärbt, um die Zellen und ihre Permeabilität für Fluorophore abzubilden.

Die Zellen bzw. Proben wurden über mehrere Schritte permeabilisiert, beginnend mit der Fixierung der Probe mit Formaldehyd (Endkonzentration 4 %). Die Proben wurden in einem weiteren Schritt durch Waschen mit 10 %-igem PBS-Puffer entfixiert und in einem PBS-Ethanol-Gemisch (1:1) resuspendiert und gelagert. Die entfixierten Zellen wurden auf 47 mm Rotilabo

**Tabelle 5 Getestete Bedingungen der Einzelschritte für die Sonde CYA591**

<b>Vorbereitung</b>				
<b>Schritt</b>	<b>Material</b>	<b>Spanne</b>	<b>Intervall</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>Fixierung</b>	Formaldehyd	2-4 %	2 %	Endkonzentration
<b>Schleimentfernung</b>	NaEDTA 50 mmol·l <sup>-1</sup>	30-90 Min	30 Min	
<b>Permeabilisierung</b>	Lysozym (10 mg·ml <sup>-1</sup> )	30-90 Min	30 Min	
<b>Einbettung</b>	Agarose (0,1 %)	Ja/Nein	-	
<b>Oligonukleotide (alle: 10 µmol·l<sup>-1</sup>)</b>				
<b>Zweck</b>	<b>Name(n)</b>	<b>Getestete Kombinationen</b>		
<b>Sonde</b>	CYA591	Verwendet: Ja (Probe, Pos.Kon.)/ Nein (Neg.Kon.)		
<b>Helfer</b>	H1, H2A	Ohne	Einzel	Gemeinsam
<b>Kompetitoren</b>	C1, C2	Ohne	Einzel	Gemeinsam
<b>Hybridisierung</b>				
<b>Bedingung</b>	<b>Spanne</b>	<b>Intervall</b>	<b>Weiteres</b>	
<b>Formamidkonzentration</b>	5-40 %	5 %	46 °C; 180 Min, (ohne Vorb., Helfer und Kompetitoren)	
	25-35 %	5 %	Bei 36 °C	
<b>Temperatur</b>	36 und 46 °C	-	-	
<b>Dauer</b>	90-270 Min	90 Min	-	

Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 3  $\mu\text{m}$  vakuumfiltriert (max. -100 mbar). Die Filter wurden in 0,1 %-iger Agarose eingebettet, damit die Zellen sich bei der Hybridisierung und den Waschschrinen nicht von den Filtern lösten.

Etwaige Schleimhüllen der Organismen wurden mittels EDTA ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit Lysozym ( $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; Puffer bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) permeabilisiert. Die Filter wurden daraufhin mit Reinstwasser gespült und getrocknet, anschließend in kleine Stücke geschnitten und dann für die Hybridisierung verwendet.

Nach der Hybridisierung wurden die Filterstücke mit einem Waschpuffer von nicht gebundener Sonde befreit, mit DAPI gefärbt und in Vecta-Shield (Bleicheschutzöl) eingebettet. Die Filterstücke wurden bei 1000-facher Vergrößerung (10-fach Okular, 100-fach Objektiv) mikroskopiert. Der Fluorophor der Sonde wurde mit Blauanregung (U-MWB2) und anschließend die DAPI-Gegenfärbung mit UV-Anregung (U-MWU2) sichtbar gemacht.

Alle Farb-Kanalverstärkungen der Mikroskopkamera wurden auf null und die Belichtungszeit manuell auf 20 ms (Autofluoreszenz und Sonde) bzw. 5 ms (DAPI) festgesetzt. Als Referenz zur Bestimmung der Belichtungszeit dienten die Negativkontrollen, anhand derer das Streulicht bestimmt wurde. Die Einstellungen beruhten darauf, dass bei den Negativkontrollen kein falsch positives Signal auftreten sollte.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellzählung

Fixierte Umweltproben aus dem Frühjahr 2013 wurden von R. Schumann zunächst mikroskopisch untersucht. In den neun Proben wurden Phytoplanktonabundanzen in der Höhe von 1,3-3,8 Millionen Zellen ml<sup>-1</sup> bestimmt (Albrecht et al., 2017). Mehr als 98 % der Abundanz und 65 % des Biovolumens wurden von Cyanobakterien gebildet (Abbildung 4). Die meisten Zellen entfielen auf Kolonien des *Aphanothece*-Komplexes (55 % Abundanz), *Synechococcus*-ähnliche Einzelzellen (31 %) und Cyanobakterienfäden ohne Heterozyten (14 %). Das eukaryotische Phytoplankton hatte einen deutlich größeren Anteil im Biovolumen als in der Abundanz, denn die Phytoplanktonabundanz wurde von Zellen der Picocyanobakterien (< 2 µm) gebildet. Der Einfluss der eukaryotischen Zellen auf das Biovolumen war deshalb überproportional groß. Der Anteil Chlorophyta von einem Prozent in der Abundanz erhöhte sich auf 24 % im Biovolumen. Der Anteil der Chroococcales hingegen verringerte sich im Biovolumen auf 22 % und damit sogar unter den Anteil der Chlorophyta. Die fädigen Cyanobakterien ohne Heterozyten dominierten das Biovolumen mit einem Anteil von 43 %. Der Hauptvertreter dieser Gruppe war *Planktolyngbya contorta*.

### Zingster Strom 2013

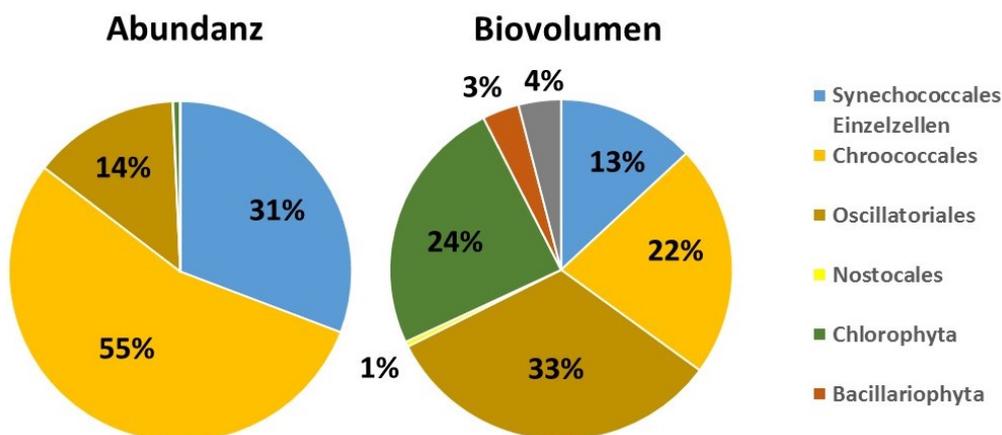


Abbildung 4 Phytoplankton Zingster Strom Abundanz und Biovolumen 2013; n=9

Trotz ihres geringen Anteils am Biovolumen waren die Kolonien der Chroococcales für das Phytoplankton des Zingster Stroms eine entscheidende

Komponente. Die sehr kleinen Zellen der Kolonien befanden sich meist in ausgeprägten Schleimhüllen, die das Volumen der eigentlichen Zellen stark überstiegen und zur Trübung beitrugen.

### 3.2 Kultivierung

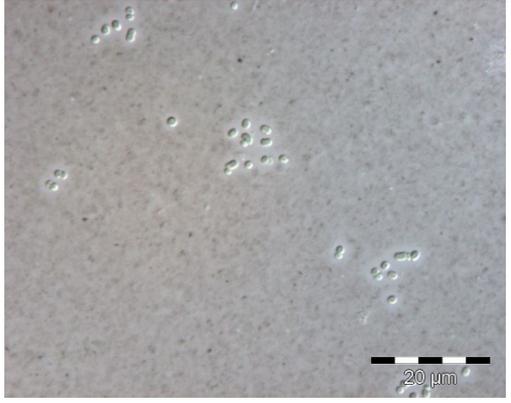
Die Zellzählung am Mikroskop erlaubt den direkten Blick in die Umweltproben und die morphologische Betrachtung der Gemeinschaften. Es fehlen jedoch Informationen zu den dominanten Vertretern des Phytoplanktons, wie physiologische Leistungsfähigkeit oder die direkte genetische Bestimmung. Dafür und als Biodiversitätsarchiv sind Isolate unverzichtbar. Deshalb wurden auch hier Isolate hergestellt. Es konnten 48 Isolate aus Proben des Zingster Stroms vom Frühjahr 2013 gewonnen werden. Aus den Jahren 2009 und 2010 stammen 17 weitere Isolate (Schlie, 2009; Sassenhagen, 2010).

#### 3.2.1 Morphologie

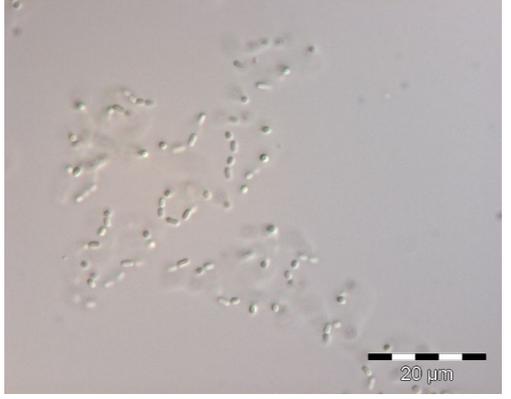
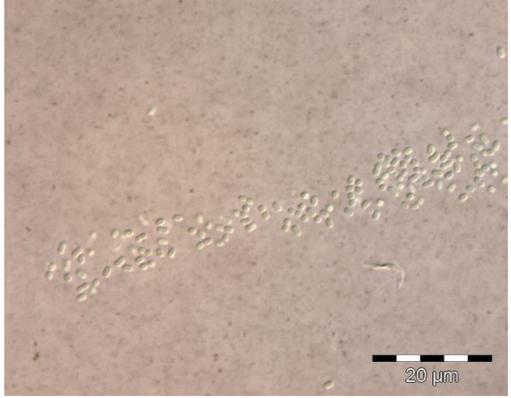
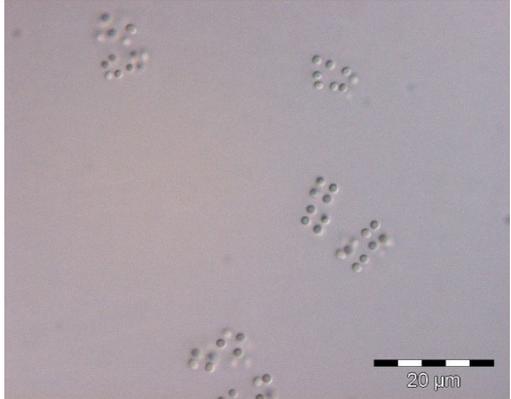
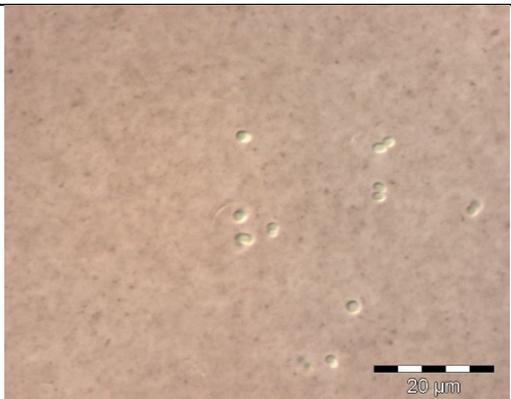
Die Morphologie der Isolate von 2013 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten aufgezeichnet. Die erste morphologische Bestimmung fand 3-4 Wochen nach Beginn der Hälterung auf Medium statt. Einige Stämme wuchsen noch in regelmäßigen 4er-Paketen oder bildeten größere Kolonien. Die Ergebnisse der morphologischen Bestimmung sowie Mikrophotographien sind in Tabelle 6 dargestellt.

Es wurden bei den Isolaten aus 2013 acht Morphotypen gefunden. Die Morphotypen gehörten den Ordnungen Chroococcales (Tabelle 6: 3-8) und Synechococcales (Tabelle 6: 1 und 2) an. Durch die Größe der Zellen und Kultivierungseffekte war die Bestimmung auf Artebene nicht immer eindeutig möglich. Die Unsicherheit in der Bestimmung der Isolate ist verschiedenen Faktoren wie phänotypischer Plastizität oder fehlender Abdeckung von Brackwasserarten in der Süßwasserflora geschuldet. Die wichtigsten zugrunde gelegten Merkmale sind deshalb zusammen mit den Mikrophotographien in der Tabelle 6 aufgelistet. Einundvierzig Isolate wurden als Gattungen und Arten der Ordnung Chroococcales zugeordnet. Viele von ihnen besaßen Schleimhüllen (ca. 80 %), die entweder eine Gruppe Zellen umfasste oder aber von jeder Zelle einzeln gebildet wurde.

Tabelle 6 Morphologie der Isolate ca. vier Wochen nach Beginn der Kultivierung (aus Albrecht, 2013)

Morph. Bestimmung	Hauptmerkmale	Farbe	Mikrophoto
(1) CZS 47H <i>Limnothrix</i> cf. <i>oblique-acuminata</i>	Schmale Fäden mit länglichen Zellen und Aerotopen, Spitzen leicht konisch und gekrümmt	Rot-braun	 20 µm
(2) CZS 45B <i>Limnothrix</i> cf. <i>rosea</i>	Breitere Fäden, rechteckige Zellen mit endständigen Aerotopen	Rot-braun	 20 µm
(3) CZS 39E <i>Aphanothece</i> cf. <i>nidulans</i>	Unregelmäßige Kolonien, ovaloide bis coccoide Zellen mit durchsichtigen Schleimhüllen	Blau-grün	 20 µm
(4) CZS 43A <i>Rhabdoderma</i> cf. <i>linearis</i>	Coccoide Zellen mit Aerotopen, teilweise gekrümmt, kurze Pseudofilamente	Blau-grün	 20 µm

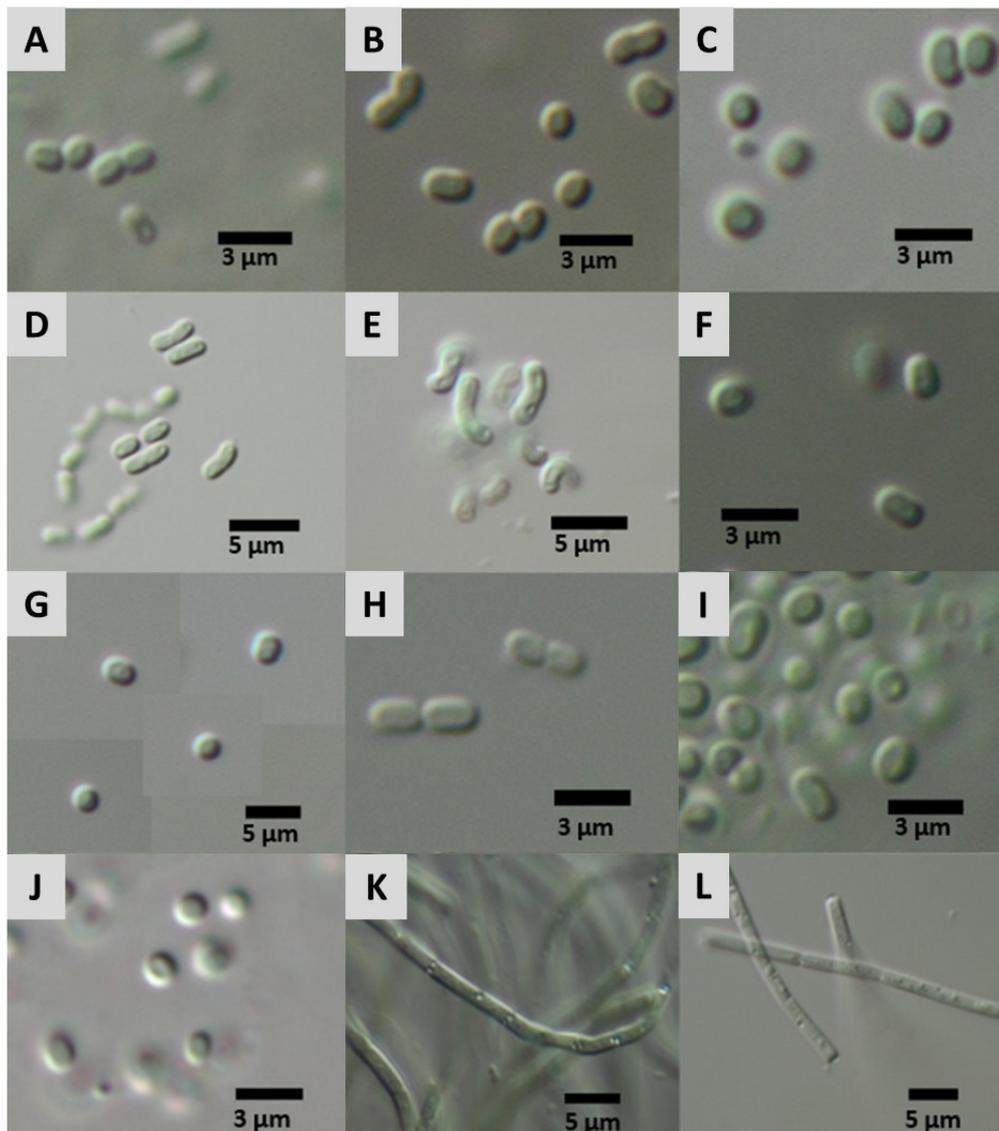
Fortsetzung Tabelle 6 Morphologie der Isolate ca. vier Wochen nach Beginn der Kultivierung (aus Albrecht, 2013)

Morph. Bestimmung	Hauptmerkmale	Farbe	Mikrophoto
(5) CZS 45I cf. <i>Cyanodictyon planctonicum</i>	Coccoide Zellen in loser Kolonie, kurze Pseudofilamente, Einzelzellen mit dicker Gallerte	Blau-grün	
(6) CZS 27J cf. <i>Aphanocapsa incerta</i>	Kleine kugelige bis ovale Zellen, Einzelzellen ohne Gallerte	Blau-grün	
(7) CZS 34G cf. <i>Chroococcus vacuolatus</i>	Kleine Zellen in mehr oder weniger regelmäßigen 4er-Paketen, sehr feine Gallerte	Blau-grün	
(8) CZS 34H <i>Synechocystis</i> cf. <i>diplocca</i>	Einzelzellen, elliptisch, nach Teilung ovaloid, keine Schleimhüllen	Blau-grün	

Die fädigen Isolate waren rot-braun gefärbt und umfassten zwei Morphotypen, die der Gattung *Limnothrix* zugeordnet wurden. Die einen Fäden waren dünner (*L. obliqueacuminata*), die anderen waren dicker mit flachen Enden (*L. cf. rosea*). Die in den Zellzählungen dominante *Planktolyngbya contorta* konnte nicht kultiviert werden.

Nach mehr als einem Jahr in Kultur waren die unterscheidbaren Morphotypen der Chroococcales in einzellige Stadien sehr ähnlicher Morphologie übergegangen ( Abbildung 5: A-J). Selbst bei Salinitäten bis 20 wuchsen die Isolate, zeigten aber keine Änderung ihrer Morphologie (Anhang Tabelle A2). Es gab keinen Stamm mehr, der regelmäßige Kolonien oder Zellpakete ausbildete und auch der *Cyanodictyon*-Morphotyp (Chroococcales) war in der Form nicht mehr nachweisbar. Damit waren nach einem Jahr fast alle nicht fädigen Isolate nur noch als *Synechococcus*-ähnlich (Synechococcales) zu bestimmen. Unterscheidungen waren lediglich über die Zellform (rund bzw. länglich) oder das Vorhandensein von Aerotopen möglich. Die Bildung von Pseudofilamenten war nur noch bei einzelnen Isolaten zu beobachten und kein beständiges Merkmal der Kulturen. Auch die Zellgrößen variierten nach Zustand der Kultur erheblich. Die meisten Isolate bildeten Schleimhüllen, was nach bisheriger Bestimmungsliteratur untypisch für die Gattung *Synechococcus* und die nah verwandten  $\alpha$ -Picocyanobakterien war. Die Zuordnungen der Isolate zu Gattungen und Ordnungen nach 3-4 Wochen in Kultur und nach mehr als einem Jahr in Kultur fielen aus den o.g. Gründen unterschiedlich aus und verschoben sich zugunsten der einzelligen Gattungen *Synechococcus*, *Cyanobium* und *Rhabdoderma*. Damit änderte sich auch die Zuordnung zu den Ordnungen zugunsten der Synechococcales.

Im Gegensatz zu den einzelligen veränderten die fädigen Isolate ihre Morphologie über die Zeit der Kultivierung nicht (vgl. Tabelle 6 und Abbildung 5). Die morphologische Bestimmung blieb damit bestehen.



**Abbildung 5** Isolatmorphologie nach mindestens einem Jahr in Kultur (nach Albrecht et al., 2017)

### 3.2.2 Molekulargenetische Bestimmung

Der genetische Ansatz wurde durch die Probleme morphologischer Bestimmung zum Standard in der Wissenschaft. Die genetischen Marker sind in der Regel stabil und qualitativ unabhängig von Kultivierungseinflüssen. Deshalb wurden die Isolate der DZBK aus den Jahren 2013, aber auch die von Schlie (2009) und Sassenhagen (2010) genetisch untersucht. Der Marker war das 16S rRNA-Gen. Die anhand der Sekundärstruktur homologisierten Sequenzen wurden in Maximum Likelihood und Bayesian Phylogenien analysiert (Abbildung 6).

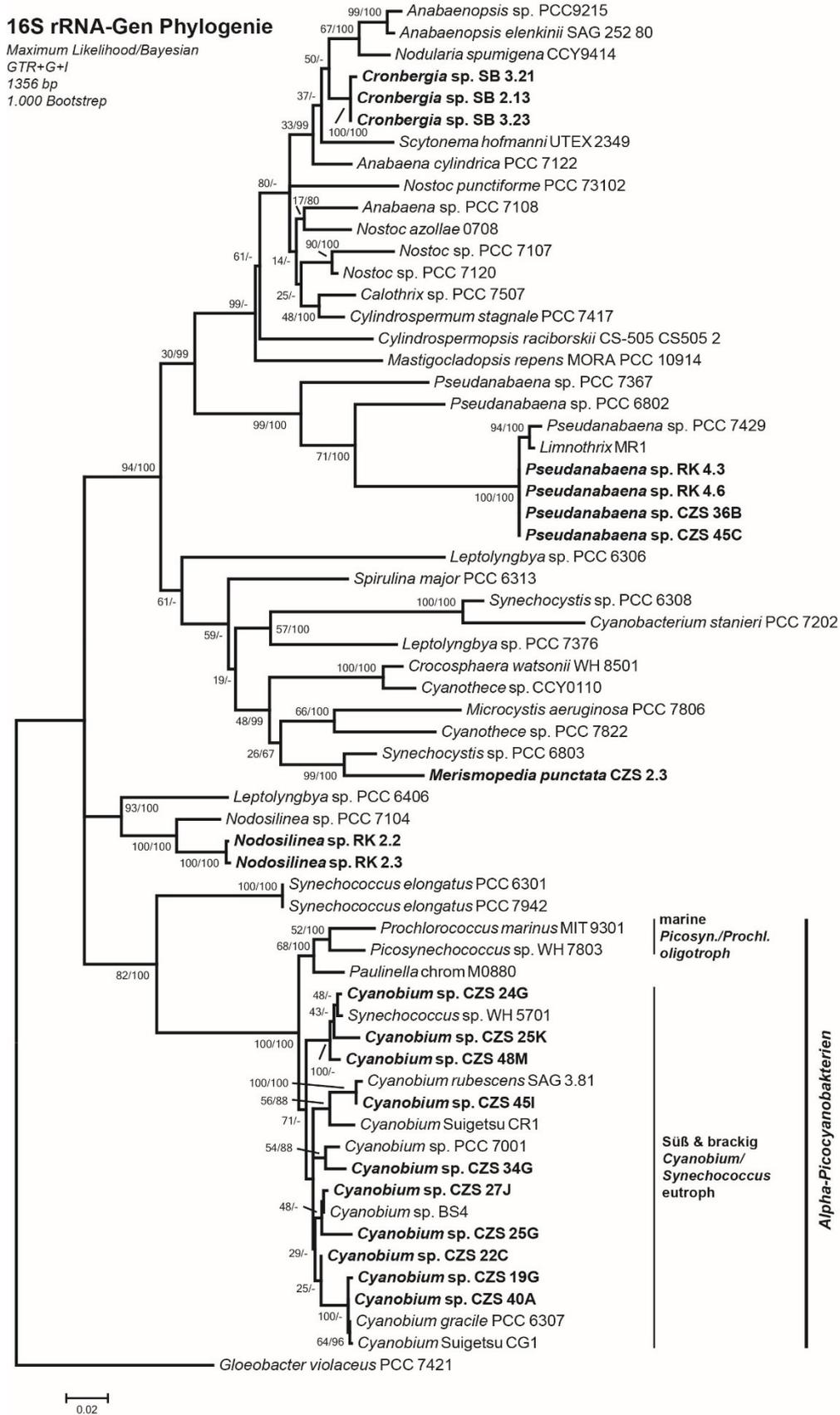
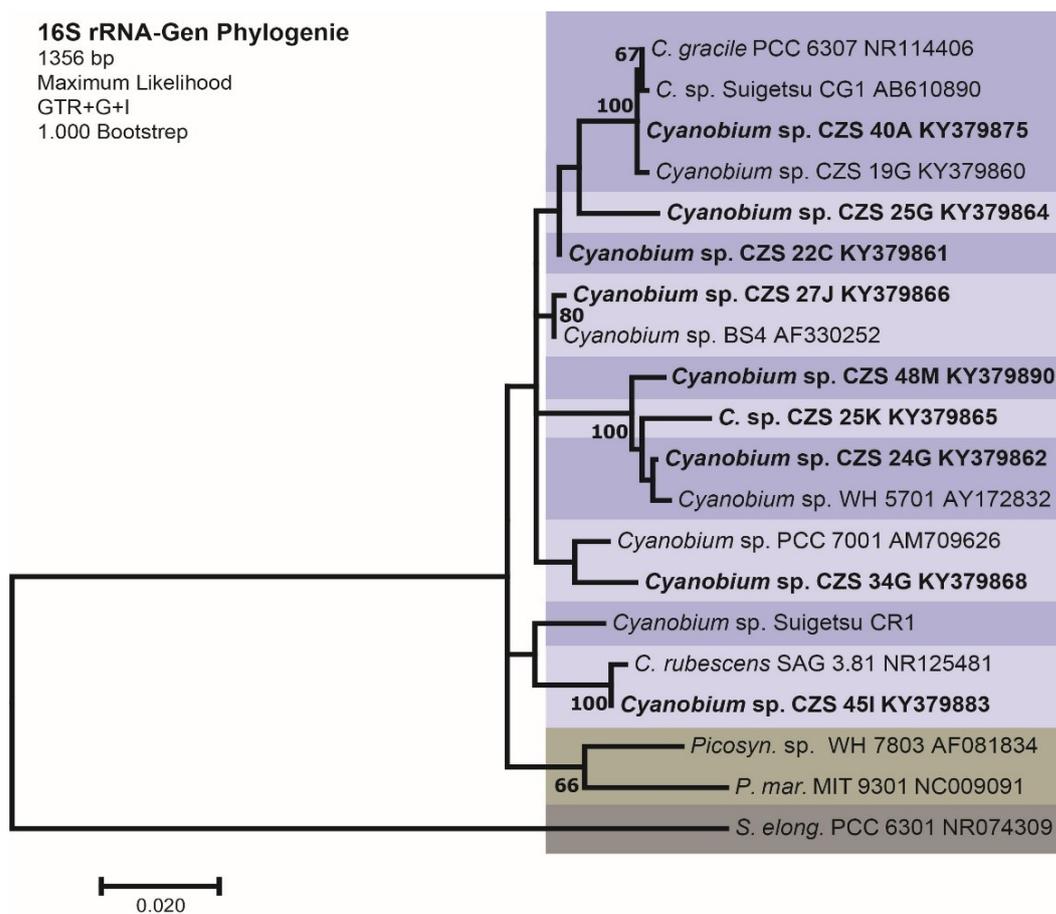


Abbildung 6 16S rRNA-Gen Phylogenie der DZBK-Isolate mit Referenzsequenzen (verändert nach Albrecht et al., 2017)

Für die Phylogenie aller Cyanobakteriengruppen (Abbildung 6) wurden ein Alignment von 1356 Basenpaaren der 16S rRNA verwendet. Beide Analysen stimmten größtenteils überein und zeigten gleiche Gruppierungen, etwa bei den Nostocales und  $\alpha$ -Picocyanobakterien. Anhand von Referenzsequenzen, teilweise von Typstämmen, ließen sich die DZBK-Isolate auf Gattungsebene sicher zuordnen.

Die meisten Isolate wurden der Gattung *Cyanobium* Rippka & Cohen-Bazire 1984 zugeordnet (Albrecht et al., 2017). *Cyanobium* ist phylogenetisch eine Schwestergattung zu den marinen *Picosynechococcus* und *Prochlorococcus* und gehört zu den  $\alpha$ -Picocyanobakterien. Die Isolate bildeten innerhalb ihrer Gattung weitere Unterkladen (im Folgenden Arten genannt), die die leicht verschiedenen Genotypen darstellten. Eine weitere Maximum Likelihood-Phylogenie, ausschließlich mit den  $\alpha$ -Picocyanobakterien, ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7** 16S rRNA-Gen Phylogenie der Picocyanobakterien; Außengruppe: *Synechococcus elongatus*

Als Außengruppe diente der Typstamm der Gattung *Synechococcus elongatus* PCC 6301. *Synechococcus elongatus* PCC 6301 gehört nicht zu den  $\alpha$ -Picocyanobakterien, stellt aber die nächst verwandte Gattung dar.

Die *Cyanobium*-Isolate bildeten eine monophyletische Gruppe (Abbildung 6), die von Isolaten aus dem Süß- oder Brackwasser besteht. Sie reihen sich ein bei Isolaten aus dem Bodensee, der Ostsee und diversen anderen eutrophen Gewässern. Diese ökologische Zuordnung findet sich auch in der Trennung zu den marinen oligotroph vorkommenden Stämmen der Gattungen *Picosynechococcus* und *Prochlorococcus*. In der auf die Picocyanobakterien reduzierten Phylogenie Abbildung 7 zeigt sich eine Trichomie, die durch die veränderte Sequenzwahl verursacht wurde. Die Gattung *Cyanobium* ist in der reduzierten Phylogenie daher nicht mehr monophyletisch, die Trennung in verschiedene Arten wird aber deutlicher.

Die *Cyanobium*-Isolate verteilten sich auf 9 verschiedene Kladen, die in etwa Arten entsprechen. Eine genaue Auftrennung von Arten innerhalb der Gattung *Cyanobium* war mit der 16S rRNA nicht möglich, weil das Gen sehr konserviert und deshalb die statistische Unterstützung sehr gering war. Deshalb wurde auch die variabelere Internal Transcribed Spacer Region (ITS) untersucht. Die ITS-Sequenzen variierten stark in ihrer Länge und stammten damit wahrscheinlich von verschiedenen Genkopien, die nicht alle Merkmale enthielten. Da für diese Arbeit die Tiefe der Identifizierung mittels 16S rRNA (Synechococcales >  $\alpha$ -Picocyanobakterien > *Cyanobium*) ausreichend war und die Artdefinition für *Cyanobium* noch entwickelt werden muss, wurde auf die Klonierung und Sequenzierung der ITS aller Isolate verzichtet.

Ebenfalls in der Ordnung der Synechococcales befanden sich die Stämme, die genetisch als *Pseudanabaena* bestimmt wurden. Sie hatten in der Analyse denselben Ursprung wie der Typstamm der Gattung und waren nur durch geringe phylogenetische Abstände von ihm getrennt.

Die andere Gruppe heterozytenloser Fäden war auch Teil der Ordnung Synechococcales. Die DZBK-Isolate (RK 2.2, RK 2.3), die als *Nodosilinea* sp. in der Phylogenie angegeben sind, lassen sich nicht endgültig zuordnen, weil die Gattung *Leptolyngbya* erst kürzlich in mehrere Gattungen (u.a. *Nodosilinea*)

aufgeteilt wurde (Perkerson et al., 2011) und die Neuordnung noch nicht abgeschlossen ist. Anhand einer Analyse mit einer eigenen, kuriierten Datenbank, wurden sie jedoch als aff. *Nodosilinea* sp. identifiziert (Jeffrey Johansen, pers. Kommunikation). Der Gattungsname wurde trotz Unsicherheiten für die Isolate angewandt, um sie einer phylogenetischen Linie der polyphyletischen Gattung *Leptolyngbya* zuordnen zu können.

Das einzige Isolat aus der Ordnung Chroococcales war *Merismopedia punctata* CZS 2.3, das von Schlie (2009) anhand der bekannten *in situ*-Morphologie auf Artebene sicher bestimmt werden konnte. Genetisch war der Stamm ähnlich zu *Synechocystis* sp. PCC 6803, zusammen mit anderen Chroococcales wie *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Die morphologische Bestimmung wurde durch die phylogenetische Position bestätigt. In BLAST-Analysen hatte der Typstamm der Gattung mit die höchste Übereinstimmung mit dem Stamm CZS 2.3. Es gab keine weiteren Isolate innerhalb der Chroococcales, die z.B. den *in situ* abundanten Gattungen *Aphanothece* oder *Cyanodictyon* entsprochen hätten.

Die einzigen Nostocales-Kulturen der DZBK (SB 2.13, SB 3.21 und SB 3.23) wurden von Sassenhagen (2010) aus dem Saaler Bodden isoliert. Sie wurden anhand ihrer Morphologie und 16S rRNA-Sequenz der Gattung *Cronbergia* zugordnet. Die Gattung war zuvor rein morphologisch als *Anabaenopsis* betrachtet worden, die genetischen Daten belegten jedoch eine Trennung. Die Gattungen *Anabaenopsis* und *Cronbergia* sind nah verwandt und wurden 2010 voneinander getrennt (Komárek et al., 2010).

Eine Übersicht über die Stämme, die Sequenzen, sowie die phylogenetische Zuordnung auf Gattungsniveau ist in Tabelle 7 gegeben. Die zusammengefassten Kategorien innerhalb der Gattung *Cyanobium* stellen den Arten ähnliche Gruppierungen dar (Albrecht et al., 2017 Appendix).

Tabelle 7 Herkunft und phylogenetische Zuordnung der DZBK-Isolate (Albrecht et al., 2017 Appendix)

Stamm	Ursprungsort	Monat/ Jahr der Isolierung	Acc. number	Phylogenetische Zuordnung Gattung/ Art
<b>CZS 25K</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>05/2013</b>	<b>KY379865</b>	<b><i>Cyanobium</i> CZS 25K</b>
<b>CZS 24G</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>05/2013</b>	<b>KY379862</b>	<b><i>Cyanobium</i> sp. WH5701</b>
CZS 24I	Zingster Strom	05/2013	KY379863	
CZS 48K	Zingster Strom	05/2013	KY379889	
<b>CZS 48M</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>05/2013</b>	<b>KY379890</b>	<b><i>Cyanobium</i> CZS 48M</b>
CZS 05I	Zingster Strom	04/2013	KY379858	
CZS 34I	Zingster Strom	05/2013	KY379869	
CZS 34J	Zingster Strom	05/2013	KY379870	
CZS 34K	Zingster Strom	05/2013	KY379871	
CZS 48D	Zingster Strom	05/2013	KY379887	
CZS 48J	Zingster Strom	05/2013	KY379888	
<b>CZS 25G</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>05/2013</b>	<b>KY379864</b>	<b><i>Cyanobium</i> CZS 25G</b>
<b>CZS 27J</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>05/2013</b>	<b>KY379866</b>	<b><i>Cyanobium</i> sp. BS4</b>
CZS 3/1	Zingster Strom	04/2009	KY379856	
CZS 13D	Zingster Strom	04/2013	KY379859	
CZS 40E	Zingster Strom	05/2013	KY379876	
CZS 40F	Zingster Strom	05/2013	KY379877	
<b>CZS 34G</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>05/2013</b>	<b>KY379868</b>	<b><i>Cyanobium</i> sp. PCC7001</b>
CZS 3/4	Zingster Strom	04/2009	KY379857	
<b>CZS 40A</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>05/2013</b>	<b>KY379875</b>	<b><i>Cyanobium gracile</i> PCC6307</b>
CZS 30E	Zingster Strom	05/2013	KY379867	
CZS 44D	Zingster Strom	05/2013	KY379880	
CZS 19G	Zingster Strom	04/2013	KY379860	
CZS 39E	Zingster Strom	05/2013	KY379874	
CZS 41D	Zingster Strom	05/2013	KY379878	
CZS 43A	Zingster Strom	05/2013	KY379879	
CZS 46B	Zingster Strom	05/2013	KY379884	
<b>CZS 22C</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>04/2013</b>	<b>KY379861</b>	<b><i>Cyanobium</i> CZS 22C</b>
<b>CZS 45I</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>05/2013</b>	<b>KY379883</b>	<b><i>C. rubescens</i> SAG 3.81</b>
<b>CZS 2/3</b>	<b>Zingster Strom</b>	<b>04/2009</b>	<b>KY379855</b>	<b><i>Merismopedia</i> sp.</b>
<b>RK 2.2</b>	<b>Saaler Bodden</b>	<b>09/2010</b>	<b>KY379891</b>	<b><i>Nodosilinea</i> sp. PCC7104</b>
<b>RK 2.3</b>	<b>Saaler Bodden</b>	<b>09/2010</b>	<b>KY379892</b>	
<b>RK 4.3</b>	<b>Saaler Bodden</b>	<b>09/2010</b>	<b>KY379893</b>	<b><i>Pseudanabaena</i> sp. PCC7429</b>
RK 4.6	Saaler Bodden	09/2010	KY379894	
CZS 35E	Zingster Strom	05/2013	KY379872	
CZS 36B	Zingster Strom	05/2013	KY379873	
CZS 45B	Zingster Strom	05/2013	KY379881	
CZS 45C	Zingster Strom	05/2013	KY379882	
CZS 47H	Zingster Strom	05/2013	KY379886	
<b>SB 2.13</b>	<b>Saaler Bodden</b>	<b>09/2010</b>	<b>KY379895</b>	<b><i>Cronbergia</i> sp.</b>
SB 3.21	Saaler Bodden	09/2010	KY379896	
SB 3.23	Saaler Bodden	09/2010	KY379897	

### 3.3 Einzelkolonieanalyse

Die Morphologie der Isolate veränderte sich über die Zeit der Kultivierung. Damit ist den meisten Isolaten ihre ursprüngliche Morphologie nicht mehr zuzuordnen. Deshalb wurden aus Proben der DZBK über 60 Einzelkolonien isoliert, um sie direkt morphologisch und anschließend genetisch zu bestimmen. Morphologisch wurden die Kolonien als *Aphanothece* sp. bestimmt. Es waren unregelmäßige, lockere Kolonien mit stäbchenförmigen Zellen von 2-3 µm Länge. Von den über 30 isolierten Kolonien konnte nur aus dreien ausreichend DNA für eine PCR gewonnen werden, bei den anderen war entweder zu wenig DNA vorhanden oder die Kolonie in der Glaskapillare verblieben. Aus einer Wiederholungs-PCR mit den eingerückten Primern Wil6 und Wil18 (nested-PCR) konnte ein 1020 bp langes Stück der 16S rRNA gewonnen werden. Die Sequenzen wurden phylogenetisch bestimmt (Abbildung 8) und die Einzelkolonien dort als *Cyanobium* identifiziert.

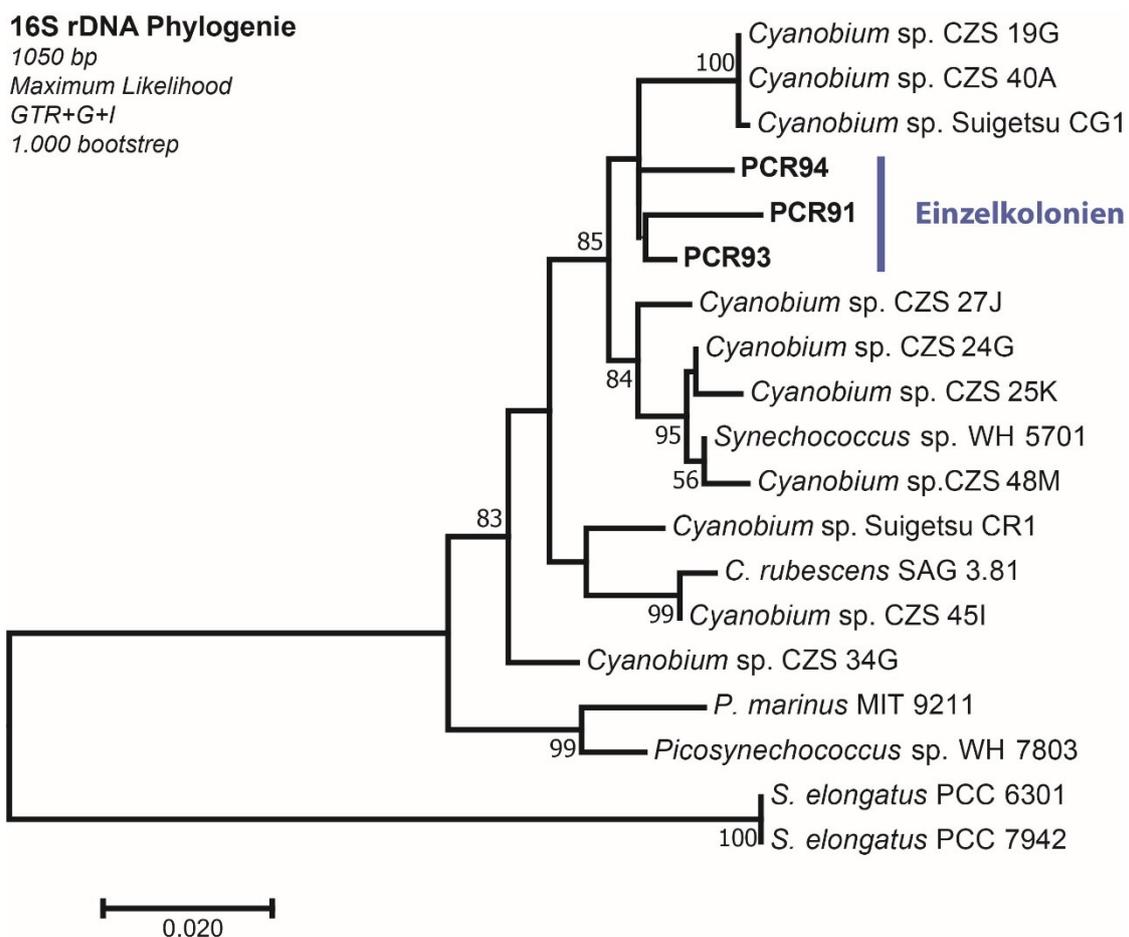


Abbildung 8 16S rRNA-Gen Phylogenie der Picocyanobakterien mit den Einzelkolonie-Sequenzen

Die Einzelkolonien bildeten eine separate Gruppe innerhalb der Gattung *Cyanobium* (Synechococcales). Es kann sich um zwei Arten handeln, jedoch ist die statistische Absicherung sehr schlecht und auch die Trichomie zeugt von ungenügender Auftrennung. Der durch die nested-PCR verkürzte Genabschnitt löst die Arten von *Cyanobium* damit schlechter auf als in der Phylogenie mit dem 1356 bp Alignment (Abbildung 6). Die Zuordnung zur Gattung *Cyanobium* war jedoch sicher.

Die morphologische und genetische Bestimmung der Einzelkolonien unterschieden sich damit genauso voneinander, wie die Zellzählung zur genetischen Bestimmung der Isolate. Es wurde morphologisch *Aphanothece* sp. (Chroococcales) nachgewiesen und genetisch dieselben Kolonien als *Cyanobium* sp. (Synechococcales) bestimmt. Die sehr geringe Anzahl der geglückten Einzelkolonieanalysen lässt aber keine endgültige Aussage über die genetische Identität der *in situ* dominanten Organismen zu.

### 3.4 Klonierung

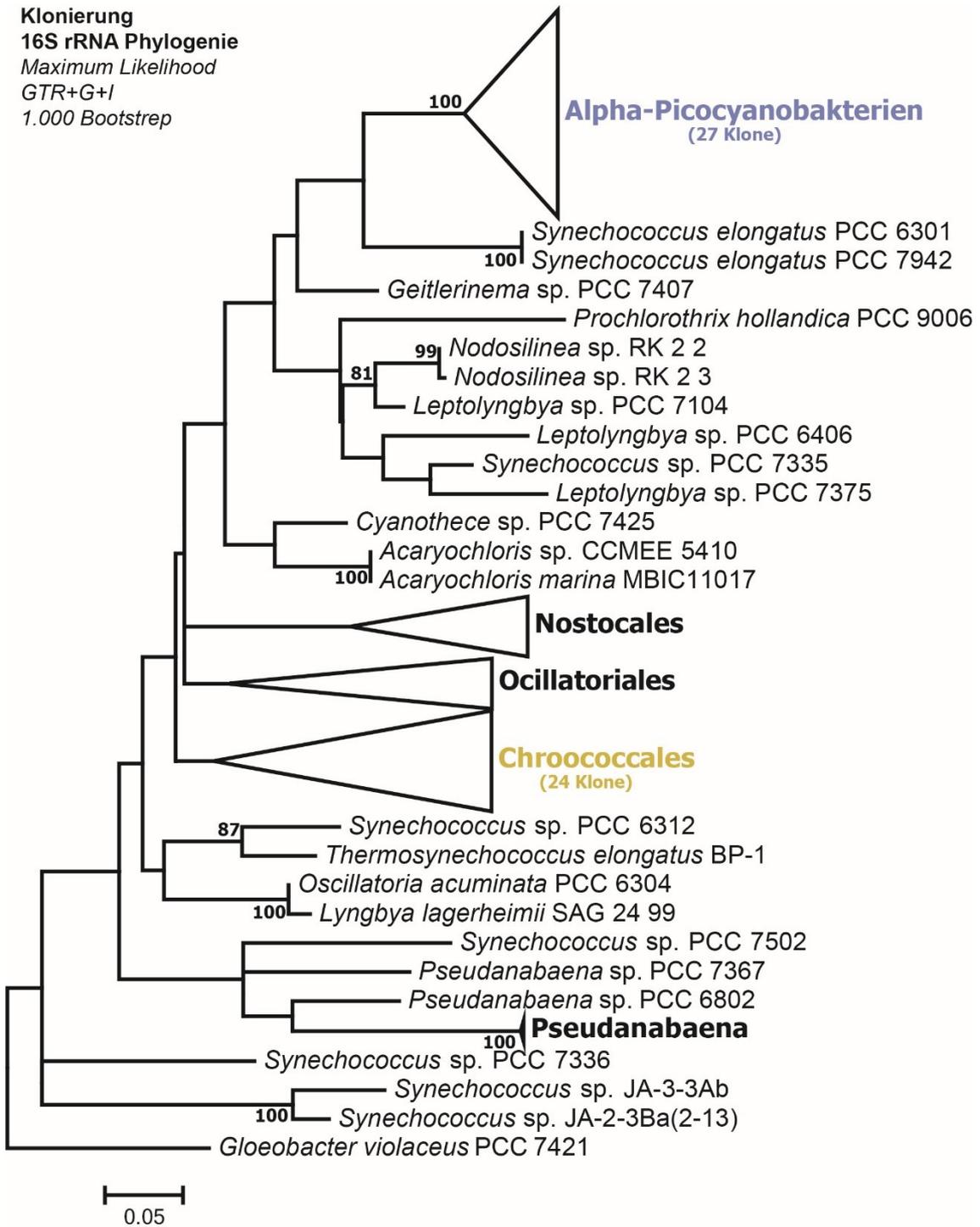
Die genetische Identifizierung *in situ* über einen Klonierungsansatz gibt Einblick in die genetische Vielfalt auch der Arten, die mit Kultivierungsansätzen oder in der Einzelkolonieanalyse nicht erfasst wurden. Es konnten aus der DZBK-Probe 51 Klone erzeugt werden, die den Vektor mit der gewünschten DNA enthielten. Die 51 Sequenzen wurden zunächst mit BLAST gegen die NCBI-Datenbank abgeglichen. Dabei wurden acht verschiedene Gattungen ermittelt (Tabelle 8). Die Gattung *Snowella* war mit 22 Klonen in der BLAST-Analyse am häufigsten vertreten. Die Gattung wurde auch bei mikroskopischen Analysen nachgewiesen. Das gleiche galt für *Aphanocapsa*, *Synechococcus* und *Woronichinia*, die sowohl mit BLAST als auch in Zellzählungen bestimmt wurden. Die Gattungen *Cyanobacterium*, *Aphanocapsa*, *Limnococcus* und *Woronichinia* sind Teil der Chroococcales, die Gattungen *Cyanobium* und *Picosynechococcus* hingegen sind Teil der Synechococcales.

**Tabelle 8** Klonierungsergebnisse anhand der BLAST-Suche und phylogenetischen Zuordnung. S = Synechococcales; C = Chroococcales

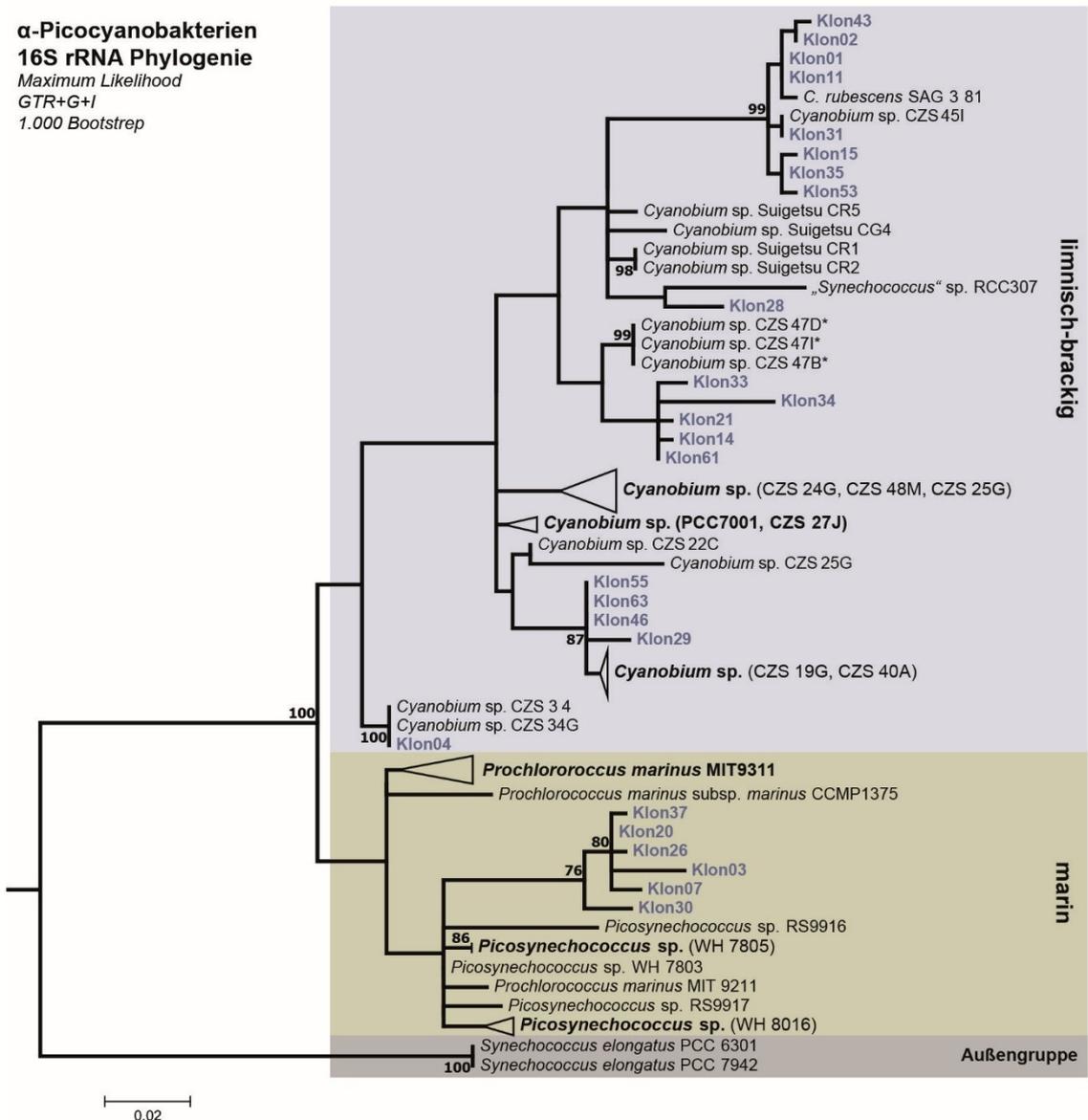
Anzahl Klone		BLAST-Ergebnisse		Phylogenetische Gruppe
8	S	<i>Synechococcus</i>	S	<i>Cyanobium</i>
6	S	<i>Synechococcus</i>	S	<i>Picosynechococcus</i>
5	C	<i>Cyanobacterium</i>	S	<i>Cyanobium</i>
4	S	<i>Cyanobium</i>	S	<i>Cyanobium</i>
3	C	<i>Aphanocapsa</i>	S	<i>Cyanobium</i>
22	C	<i>Snowella</i>	C	<i>Snowella</i>
2	C	<i>Limnococcus</i>	C	<i>Gloeocapsa</i>
1	C	<i>Woronichinia</i>	C	<i>Snowella</i>

Die phylogenetische Identifizierung der Klone ergab andere Gattungen als die BLAST-Analyse (Tabelle 8). Die Klone, die mit BLAST als *Cyanobacterium*, *Synechococcus* und *Aphanocapsa* identifiziert wurden, waren phylogenetisch Teil der Gattungen *Cyanobium* und *Picosynechococcus* (Abbildung 9 und Abbildung 10). Für die Zuordnung der Klone zu den Ordnungen hatte das große Änderungen zur Folge, denn acht der mit BLAST den Chroococcales zugeordneten Sequenzen waren phylogenetisch  $\alpha$ -Picocyanobakterien (Synechococcales).

Innerhalb der Gattung *Cyanobium* teilten sich die Klone auf fünf mögliche Arten auf (Abbildung 10). Teilweise konnten sie Arten zugeordnet werden, denen auch Isolate der DZBK angehören (*Cyanobium rubescens* (CZS 45I) und *Cyanobium* sp. PCC 7001 (CZS 34G). Teilweise stellten sie auch eigene Linien auf, die getrennt von den bereits bekannten Arten waren. Ob es sich dabei jedoch um eigenständige Arten handelte, ließ sich aus den phylogenetischen Positionen nicht ableiten.



**Abbildung 9 16S rRNA Phylogenie mit kondensierten Untergruppen. Gruppen, die Klone enthielten, sind farblich gekennzeichnet**



**Abbildung 10 16S rRNA Phylogenie der Klonierung - Teil Picocyanobakterien (Sequenzlänge: 600 bp); \* Stämme existieren nicht mehr**

Die Trennung der Klone innerhalb der α-Picocyanobakterien in die Gattungen *Cyanobium* und *Picosynechococcus* war statistisch sehr gut unterstützt (Bootstrepwert: 100; Abbildung 10). Die Zuordnung innerhalb der marinen Gruppe hingegen war ungenau, denn die monophyletischen Gattungen *Prochlorococcus* und *Picosynechococcus* wurden auf verschiedene Linien aufgetrennt (polyphyletisch). Zudem treten Polytomien mit bis zu sieben Ästen auf, die eine unklare Trennung darstellen. Die Klone bildeten einen eigenen monophyletischen Ast in der Polytomie. Das könnte einer eigenen Gattung oder Art entsprechen, die bisher noch nicht beschrieben ist. Die Klone wurden

wegen der Polytomien und schlechten genetischen Auflösung den *Picosynechococcus* zugeordnet und nicht als eigenständig angesehen.

Die Phylogenie der Chroococcales (Abbildung 11) stellt die Teilung der Klone in zwei Untergruppen dar. Zwei Klone waren nah verwandt mit *Gloeocapsa* sp. PCC73106. Die Trennung von diesem Stamm war mit 98 % Bootstrep-Unterstützung sehr sicher. Diese klare Trennung deutete auf die Zugehörigkeit der Klone zu einer anderen Gattung hin, für die bislang keine Referenz vorhanden ist.

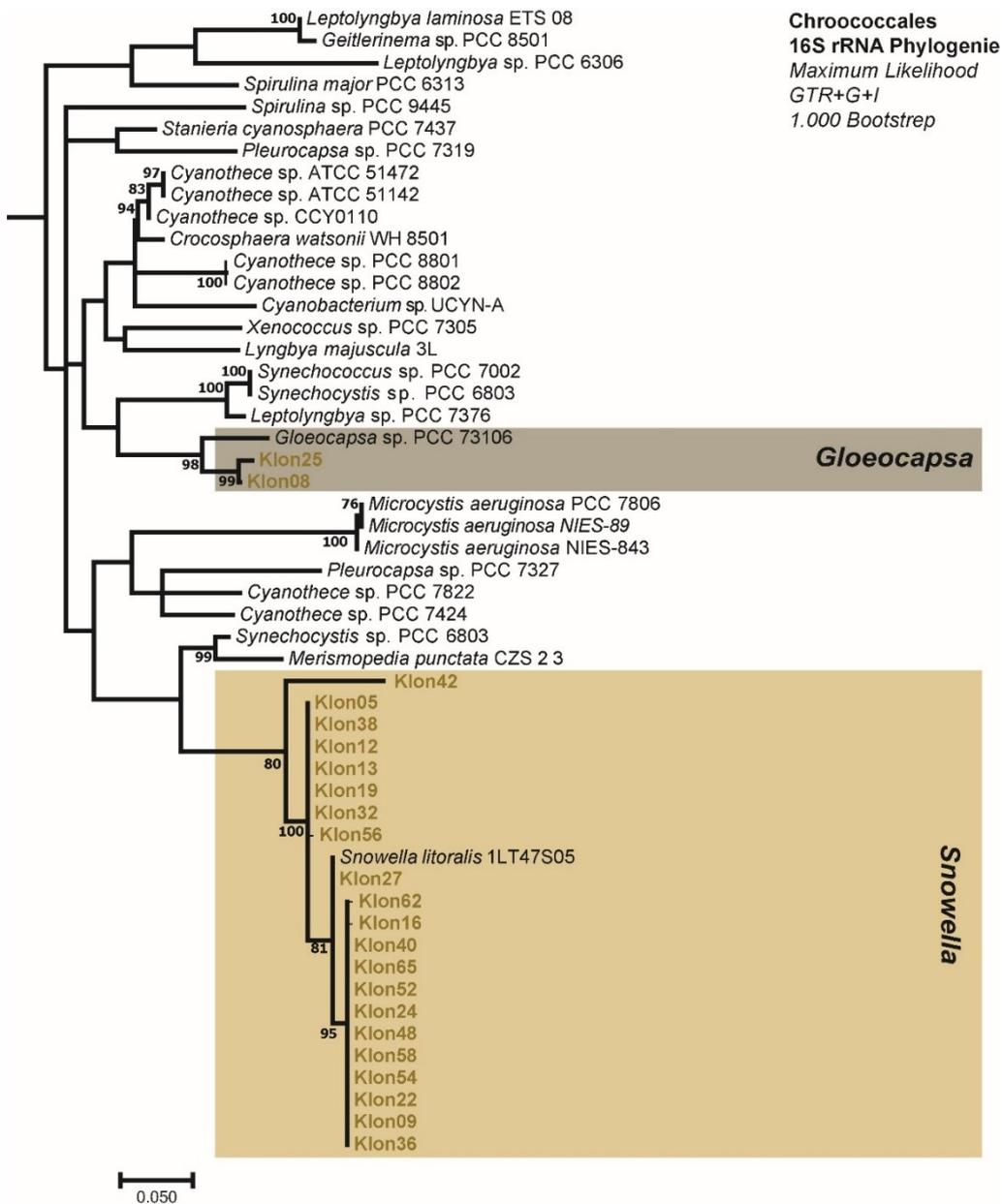


Abbildung 11 16S rRNA Phylogenie der Klonierung - Teil Chroococcales; (Sequenzlänge: 600 bp)

Die anderen Klonsequenzen innerhalb der Chroococcales waren dem Stamm *Snowella litoralis* 1LT47S05 sehr ähnlich. Die 22 Klone wurden direkt der Gattung *Snowella* zugeordnet. Die große Anzahl von *Snowella*-Sequenzen war vor dem Hintergrund sehr geringer Zellabundanz in den Zählungen überraschend. Die Klone teilten sich auf verschiedene Äste, die Arten entsprechen können. Das Fehlen weiterer Referenzsequenzen von *Snowella*-Arten in den Datenbanken erlaubte keine weitergehende Bestimmung der Klone.

Insgesamt konnten 10 verschiedene artähnliche Genotypen nachgewiesen werden. Die Aussagekraft der hier gezeigten Klonierungsdaten war wegen der geringen Anzahl Klone eingeschränkt. Dennoch wurden die Ergebnisse auf Basis der Isolate teilweise bestätigt und ebenfalls  $\alpha$ -Picocyanobakterien nachgewiesen. Die Chroococcales waren aber durch die Klonbibliothek deutlich stärker abgebildet.

### 3.5 T-RFLP

Die genetische Vielfalt anhand der Isolate und der Klonierung fiel im Vergleich zu den 23 morphologisch beschriebenen Arten mit 13 bzw. 10 Arten recht gering aus. Die *in situ*-Diversität wurde deshalb mit dem genetischen Fingerprint T-RFLP in der DZBK, sowie vergleichend an den Jasmunder Bodden und der Schlei bestimmt. Die T-RFLPs wurden an Proben aus April und Oktober 2016 aufgenommen.

Es wurden in der DZBK sieben Stationen beprobt. Die Anzahl an OTUs (Art-Niveau) schwankte pro Station zwischen 5 und 23 (Abbildung 12). Insgesamt wurden 44 OTUs in den Bodden der DZBK nachgewiesen. Die Anzahl nahm von Westen nach Osten hin zu. Circa 10 % der OTUs waren ausschließlich in den westlichen Bodden (Stationen DB10, 16 und 19) und 50 % nur in den östlichen Bodden (Stationen DB01, 02, 06) nachzuweisen (Abbildung 13 links). Der Anteil in allen Proben vorkommender OTUs lag bei ca. 25 %.

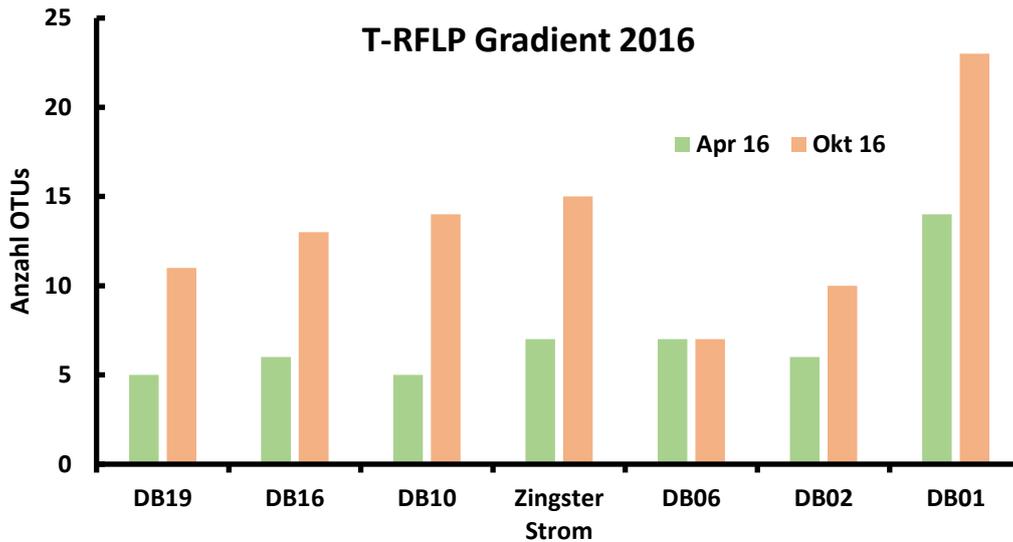


Abbildung 12 Anzahl der T-RFLP OTUs entlang des Gradienten der DZBK im April und Herbst 2016

Die besonders hohe Anzahl an OTUs, die ausschließlich die östlichen Stationen vorkamen, war hauptsächlich der Herbstprobe am Ostseezugang (DB01) zuzuschreiben. Die Abbildung 13 rechts stellt den Vergleich von West, Ost und Zingster Strom ohne ebendiese Probe dar. Ohne die Oktoberprobe von DB01 verringerte sich die Anzahl der OTUs um 40 % von 44 auf 27. Die in allen anderen Proben abundantesten drei OTUs fehlten in dieser einen Probe völlig, was für ein Methodenproblem oder aber einen veränderten Wasserkörper durch Einstrom aus der Ostsee spricht.

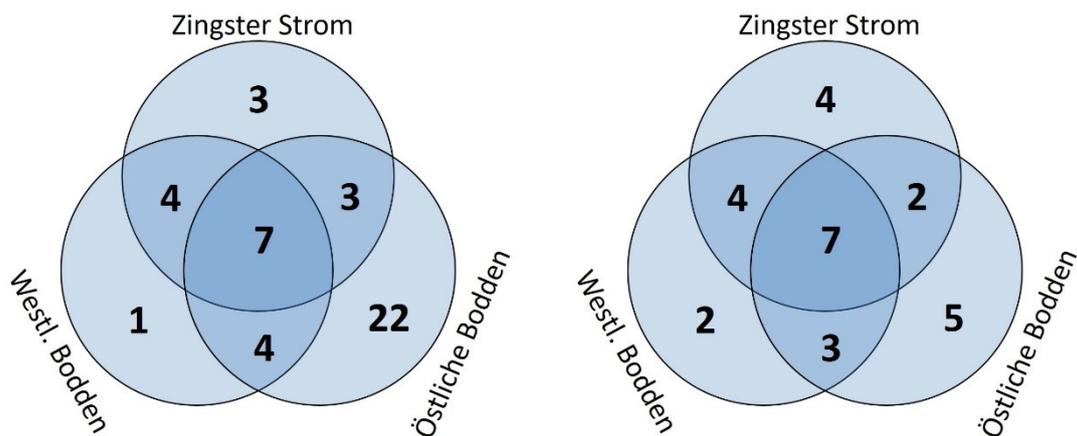
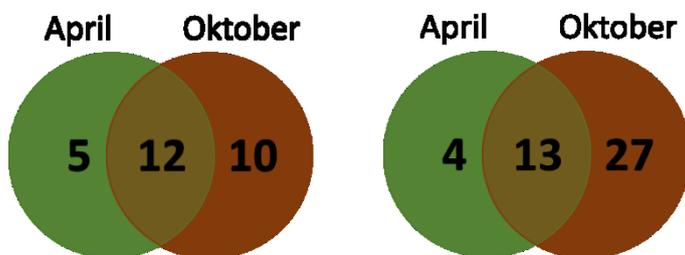


Abbildung 13 Anzahl der Genotypen verschiedener Bereiche der DZBK. Links: alle Stationen April und Oktober. Rechts: ohne Oktoberprobe von Station DB01; Östliche Bodden: Stationen DB19, DB16, DB10; Östliche Bodden: Stationen DB06, DB02, DB01

Die Proben wurden auch hinsichtlich der Zeitpunkte Frühjahr (April) und Herbst (Oktober) miteinander verglichen (Abbildung 14). Die Herbstproben waren bei Einbeziehung aller Stationen deutlich verschieden von den Frühjahrsproben. Mehr als die Hälfte aller OTUs entfiel ausschließlich auf die Herbstproben. (Abbildung 14 links). Ohne die Station DB01 veränderte sich die Verteilung zulasten der eigenständigen OTUs im Herbst (Abbildung 14 rechts). Der Anteil gemeinsamer Genotypen stieg dadurch von einem Drittel auf fast die Hälfte. Die Anzahl herbst-eigener OTUs war trotzdem doppelt so hoch wie im Frühjahr. Anhand der morphologischen Zählraten der letzten Jahre (z.B. Schoor et al., 2008) kann das fädigen Cyanobakterien zurückgeführt werden, die im Herbst in größerer Anzahl und Formenvielfalt vorkamen.



**Abbildung 14 Anzahl OTUs der T-RFLP im Vergleich von April und Oktober 2016. Links: alle Stationen und Zeitpunkte; Rechts: ohne Station DB01 im Oktober**

Innerhalb der einzelnen Proben war die Häufigkeit der OTUs ungleichmäßig verteilt. Es gab drei OTUs, die in fast allen Proben den Großteil der Abundanz

stellten. Die Häufigkeit reichte von 46 bis 96 % aller TRFs einer Probe (Tabelle 9). Einzig in der Oktoberprobe DB01 kamen diese OTUs überhaupt nicht vor. Die der DB01 nächste Station, DB02 im Oktober, war ebenfalls durch eine geringe Abundanz dieser Genotypen gekennzeichnet. Die hohe Abundanz einiger weniger Arten ist typisch für Blütenereignisse. Die verringerte Dominanz der drei wichtigsten OTUs hin zum Ostseezugang spricht wiederum für einen veränderten Wasserkörper und Austausch mit der Ostsee.

**Tabelle 9 Anteile derselben abundanten drei OTUs an der Gesamtabundanz aller OTUs der jeweiligen Station und Probe**

	DB19	DB16	DB10	ZS	DB06	DB02	DB01
April	94 %	90 %	94 %	95 %	94 %	96 %	71 %
Oktober	76 %	67 %	70 %	66 %	83 %	46 %	0 %

Die genetische Vielfalt der Cyanobakterien war in der Darß-Zingster Boddenkette mit 27 (ohne DB01, Oktober) in etwa so hoch, wie mit den Zellzählungen ermittelt. In Anbetracht weltweit vielerorts nachgewiesener kryptischer Diversität, bei der ein Morphotyp mehrere Genotypen in sich vereint, erschien die Anzahl an TRFs gering. Die Station Zingster Strom vereinte die meisten Arten der westlichen und östlichen Bodden in sich (17 von 27, ohne DB01) und wurde deshalb als Einzelstation der DZBK zum Vergleich mit den Einzelstationen der anderen Lagunen ausgewählt.

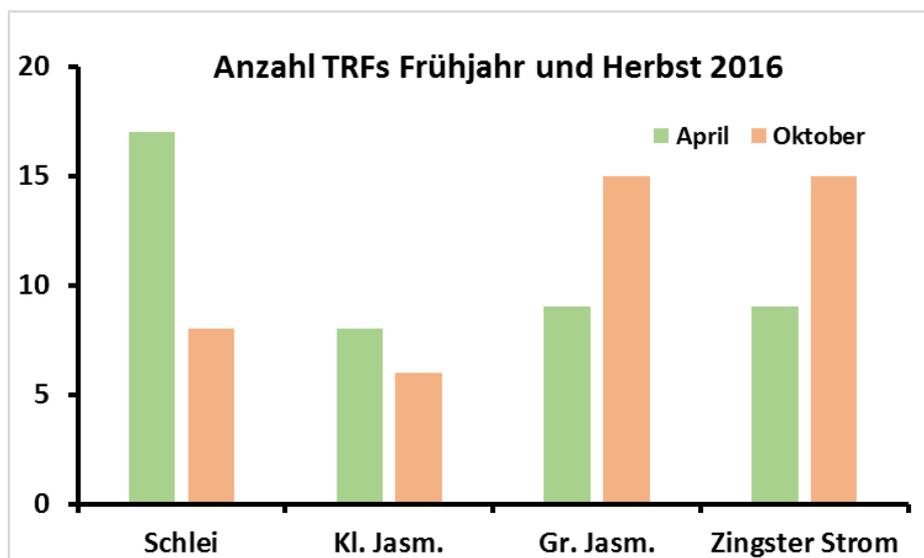


Abbildung 15 Anzahl aus der T-RFLP ermittelter OTUs der verschiedenen Lagunen im April und Oktober 2016

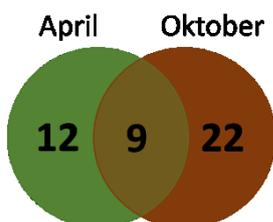
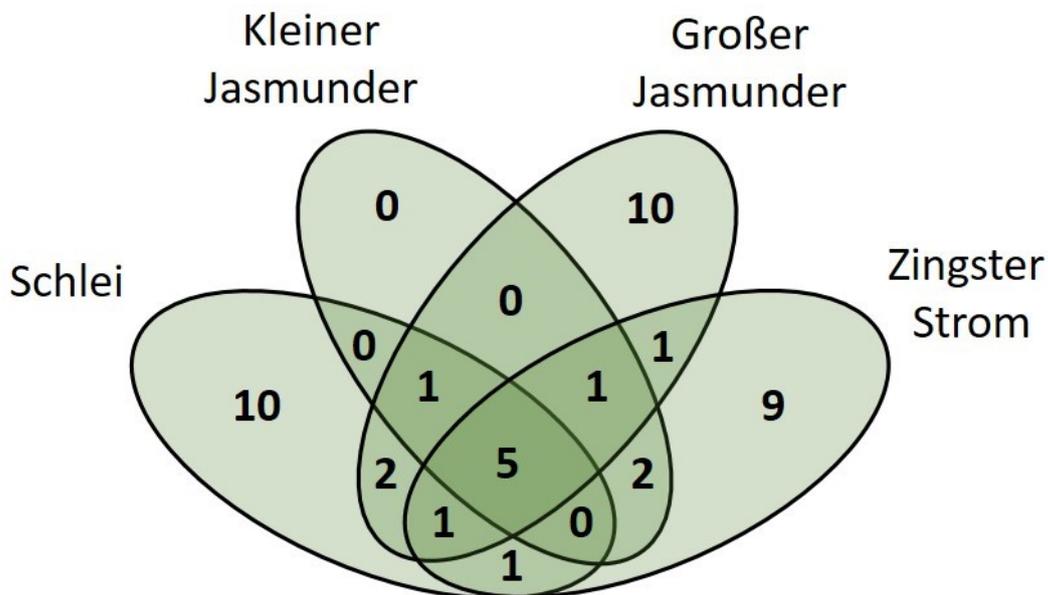


Abbildung 16 Vergleich der OTUs aller Lagunen von Frühjahr und Herbst

Die Anzahl der OTUs pro Station schwankte zwischen 9 und 21 (Schlei: 20; Kl. Jasm.: 9; Gr. Jasm.: 21; Zingster Strom: 20). Die Schlei und der Kleine Jasmunder Bodden hatten im Frühjahr eine höhere Diversität als im Herbst, während der Große Jasmunder Bodden und der Zingster Strom jeweils im Herbst mehr OTUs beherbergten (Abbildung 15). Insgesamt kamen 9 der 43 OTUs aller Gewässer sowohl im Frühjahr als auch im Herbst vor (Abbildung 16).

Die Abbildung 16 fasst alle Stationen zusammen und vergleicht lediglich die Frühjahr- und Herbstproben. Die Übereinstimmung in den OTUs resultierte teilweise daraus, dass dieselbe Station zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen wurde und dort dieselben OTUs auftraten. Der Vergleich der OTUs der verschiedenen Station miteinander ist in Abbildung 17 dargestellt. Es wurden 5 OTUs (11 %) bei allen Stationen, 9 OTUs (20 %) bei 2 und 3 Stationen und 29 OTUs (66 %) nur an einzelnen Stationen nachgewiesen. Der Kleine Jasmunder Bodden besaß keine OTUs, die ausschließlich dort vorkamen, während die anderen Stationen von 9 bzw. 10 eigenen Arten gekennzeichnet waren. Der Hauptgrund dafür dürfte die geringe OTU-Anzahl sein, die mit 9 weniger als halb so groß war, wie an den anderen Stationen.



**Abbildung 17 T-RFLP Vergleich der OTU-Zusammensetzung der Lagunen miteinander (Frühjahr und Herbst zusammengefasst)**

Im Gegensatz zum Gradienten der DZBK waren hier die Häufigkeiten der OTUs gleichmäßiger verteilt. Die abundantesten OTUs unterschieden sich zwischen den einzelnen Gewässern und auch ihre relative Häufigkeit war weitaus geringer. Die den Gewässern eigenen OTUs stellten die Mehrheit der Arten dar. Damit waren die Unterschiede in der Organismenzusammensetzung zwischen den Gewässern größer als ihre gemeinsamen Arten. Die Identität der OTUs ließ sich mit der T-RFLP nicht jedoch ermitteln und nur die Diversität abschätzen.

### 3.6 16S Amplicon-Analyse

Das 16S Amplicon wurde, ähnlich wie die T-RFLP, zur Bestimmung der Diversität angewandt. Der Vorteil der Ampliconanalyse lag in der Identifizierung der Diversität anhand der DNA-Sequenzen. Das Amplicon gleicht dahingehend dem Klonierungsansatz. Die Anzahl der Sequenzen überstieg die der Klonierung bei Weitem. Pro Probe wurden zwischen 150 und 600 Sequenzen

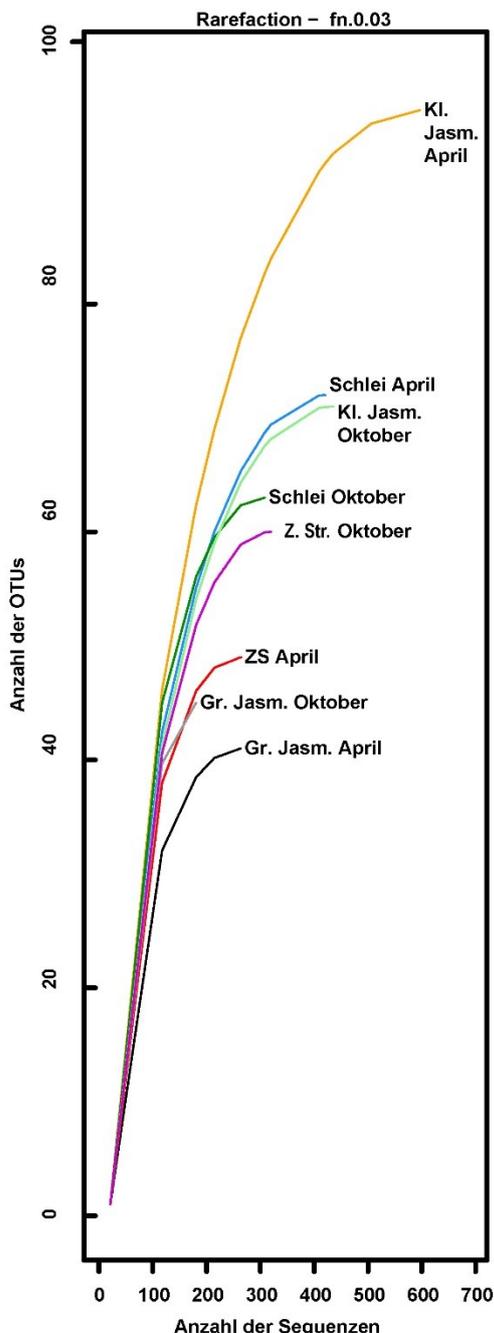


Abbildung 18 Rarefaction-Kurven der 16S Amplicon inkl. heterotropher Bakterien für alle Proben 2016. ZS: Zingster Strom

generiert. Es wurden Primer verwendet, die auch heterotrophe Bakterien und Chloroplasten-DNA erfassen. Die mit qiime prozessierten Sequenzen wurden bei einer Ähnlichkeit von mehr als 97 % aller Basen zu OTUs zusammengefasst. Die OTUs wurden wie die Fragmente der T-RFLP als Art-ähnlich betrachtet.

Die Anzahl der Sequenzen aus den Amplicon-Analysen war mit maximal 600 pro Probe gering, was sich auch in den Rarefaction-Kurven niederschlug (Abbildung 18). Dennoch zeigten die Anstiege und Endpunkte dieser Kurven, dass ein Großteil der Sequenzen abgedeckt wurde, da die meisten Kurven bereits in die Sättigung übergingen. Damit wäre bei steigender Sequenzanzahl zwar eine leichte, aber keine starke Erhöhung der OTU-Anzahl zu erwarten gewesen. Die Anzahl der OTUs fällt in dieser 16S Amplicon-Analyse gering aus. Für die Cyanobakterien deckte sich

dies allerdings mit den Daten sowohl der T-RFLP und Klonierung als auch denen der Isolat-Analyse.

Für die Analyse der cyanobakteriellen Gemeinschaft wurden alle Sequenzen extrahiert, die der Abteilung Cyanobacteria angehörten. Deren Anteil lag zwischen 46 und 68 % aller Sequenzen (Tabelle 10). Diese Zahlen umfassten neben den eigentlichen Cyanobakterien auch die Chloroplasten, deren Anteil von 3 bis 57 % aller Cyanobakteriensequenzen betrug. Besonders in der Herbstprobe der Schlei waren mehr Chloroplastensequenzen vorhanden als Cyanobakteriensequenzen, was für einen großen Anteil an eukaryotischen Algen am Phytoplankton spricht. Die Abundanz der Cyanobakterien wurde für alle Stationen um die Chloroplasten korrigiert (Tabelle 11).

**Tabelle 10 Anteil der der Abteilung „Cyanobacteria“ zugeordneten Sequenzen**

	Schlei		Kl. Jasm.		Gr. Jasm.		Zingster Strom	
	N <sub>total</sub>	Anteil						
April	248	60%	286	48%	160	64%	115	46%
Oktober	200	68%	283	66%	90	55%	187	61%

**Tabelle 11 Korrigierter Anteil der Cyanobakteriensequenzen an der Gesamtsequenzanzahl**

	Schlei		Kl. Jasm.		Gr. Jasm.		Zingster Strom	
	N <sub>total</sub>	Anteil						
April	128	31%	276	47%	141	56%	112	45%
Oktober	87	29%	259	61%	66	40%	158	51%

Die verbliebenen Sequenzen wurden für die verschiedenen Stationen in einer Matrix aufbereitet, die die OTUs und deren Abundanz in den Proben umfasste. Anhand der Matrix ließ sich Anzahl der OTUs pro Probe ermitteln. Die wenigsten OTUs wurden in der Oktoberprobe des Großen Jasmunder Boddens gefunden (5) und die meisten in der Oktoberprobe des angrenzenden Kleinen Jasmunder Boddens (27; Abbildung 19). Im Zingster Strom und dem Kleinen Jasmunder Bodden waren jeweils im Oktober mehr OTUs zu finden als im April. Die Schlei und der Große Jasmunder Bodden zeigten ein umgekehrtes

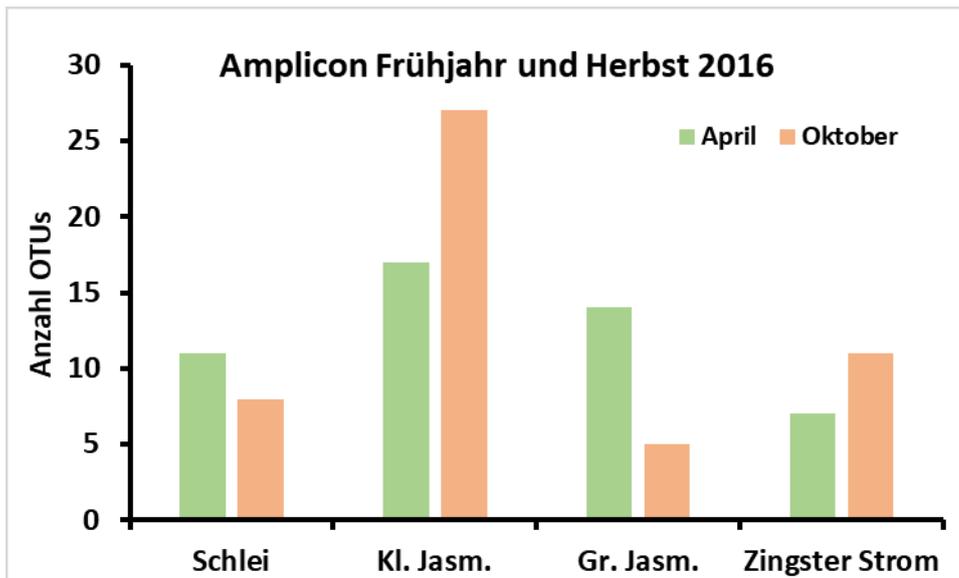


Abbildung 19 Anzahl OTUs des 16S Amplicon

Verhältnis vom Frühjahr zum Herbst. Insgesamt gab es zwischen den Proben aus dem Frühjahr und dem Herbst eine Überschneidung von 20 % aller OTUs.

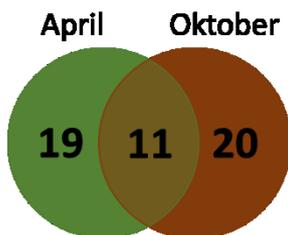


Abbildung 20 16S Amplicon Vergleich OTUs Frühjahr und Herbst 2016

Die vier untersuchten Lagunen wurden auch miteinander hinsichtlich ihrer gemeinsamen OTUs untersucht. Zehn Prozent aller cyanobakteriellen OTUs kamen in allen, weitere 22 % in zwei oder drei Lagunen und 68 % ausschließlich in einer Lagune vor (Abbildung 21). Die Werte stimmten mit denen aus der T-RFLP-Analyse fast überein und deuteten auf die Robustheit der Methode. Ein sehr auffälliger Unterschied bestand jedoch in der Zusammensetzung der originären OTUs. Der Kleine Jasmunder Bodden hatte in der Amplicon-Analyse den größten Anteil an OTUs, die in keiner anderen Lagune vorkamen. In den T-RFLP-Daten waren keinerlei OTUs ausschließlich diesem Gewässer zugeschrieben.

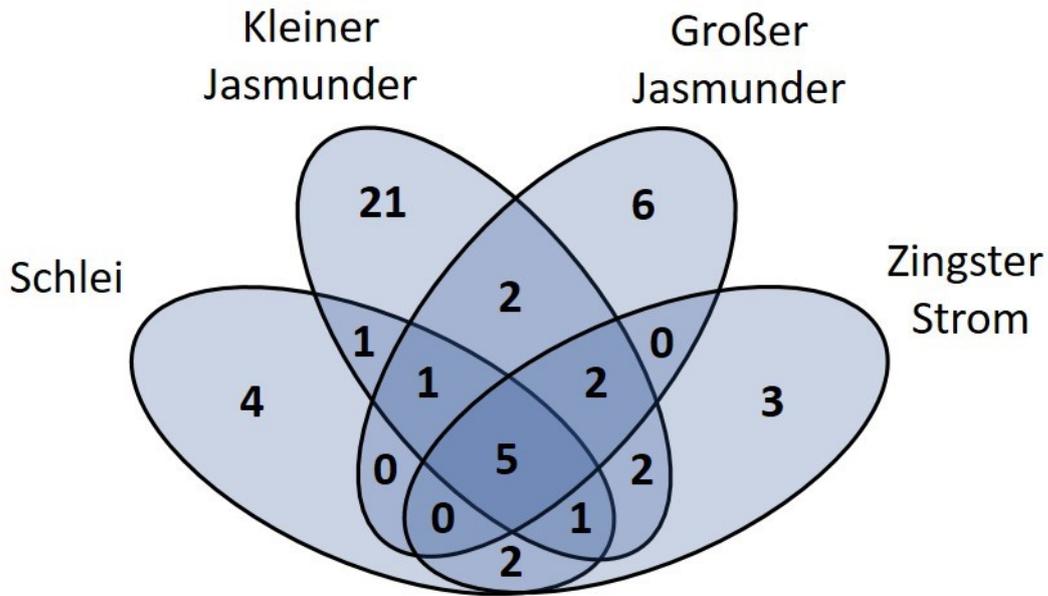


Abbildung 21 16S Amplicon: Vergleich der Lagunen zu beiden Probennahmezeitpunkten

Die Sequenzen der OTUs wurden mithilfe der Referenzdatenbank GreenGenes bis zur Gattungsebene zugeordnet. Die Auftrennung auf Ebene der Ordnung ist in Abbildung 22 dargestellt. Die einzelnen Untergruppen der Ordnung Synechococcales wurden anhand ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Familien (z.B. Pseudanabaenales als Fäden) oder Gattungen

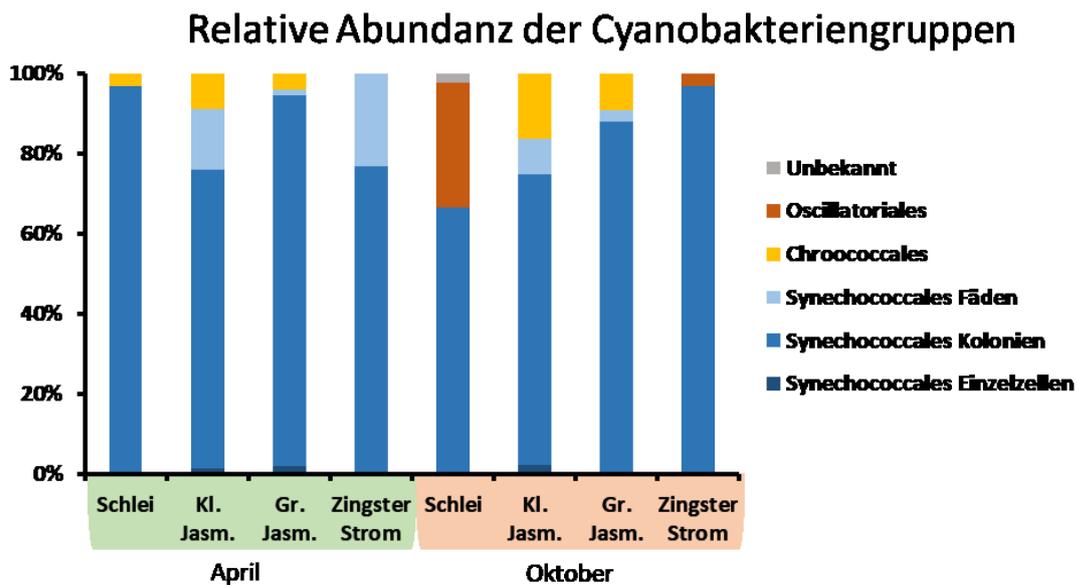


Abbildung 22 Anteile der Cyanobakterienordnungen an der Gesamtzahl der Cyanobakteriensequenzen

(*Cyanobium* = Kolonie; *Synechococcus* = einzellig) zugeordnet. Es wurden nur wenige einzellige *Synechococcales* gefunden, während die Gruppe der Koloniebildner in jeder Probe mindestens 65 % der Abundanz stellte. Die fädigen *Synechococcales* hatten insbesondere in den April-Proben einen höheren Anteil an den Cyanobakteriensequenzen (bis zu 25 %). Die *Chroococcales* wurden nur im Zingster Strom nicht nachgewiesen, hatten aber auch in den anderen Proben einen Anteil, der immer unter 20 % lag. In den Oktoberproben von Schlei und Zingster Strom traten die einzigen *Oscillatoriales* auf. In der Schlei stellten sie fast 30 % aller Cyanobakteriensequenzen, während es im Zingster Strom nur etwa 5 % waren. Die einzige nicht zugeordnete OTU war Teil der Oktoberprobe der Schlei.

Die Verteilung der OTUs auf die Ordnungen an den verschiedenen Stationen glich ihrer Abundanz (vgl. Abbildung 22 Abbildung 23). Die *Synechococcales* dominierten sowohl die Abundanz als auch die Anzahl der OTUs. Die Abbildung 23 zeigt die Verteilung der OTUs auf die Stationen. Die *Synechococcales* Kolonien stellten die größte Gruppe der OTUs (mind. 75 % aller OTUs in jeder Probe).

### Verteilung der OTUs auf die Cyanobakteriengruppen

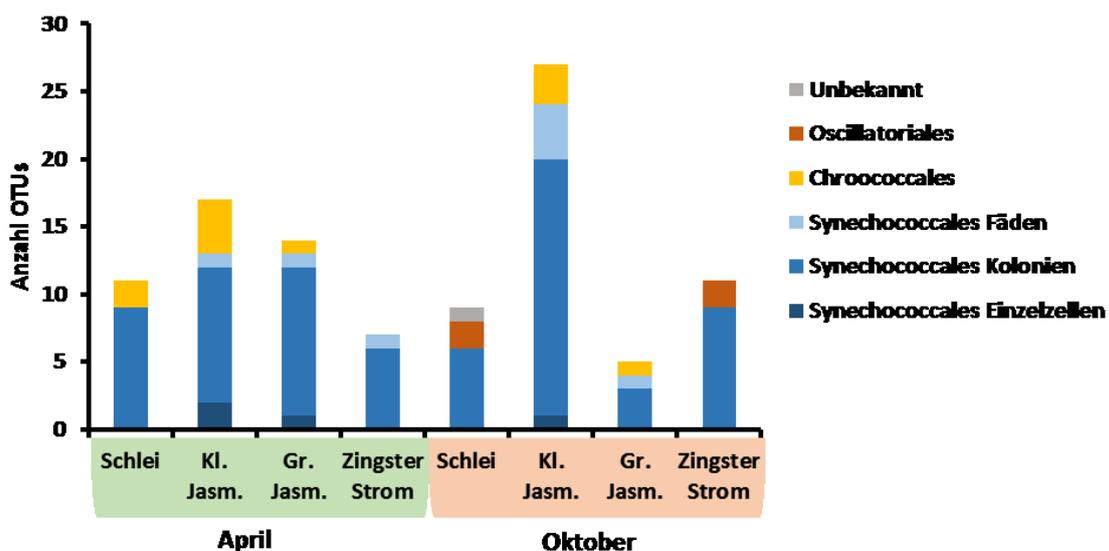


Abbildung 23 Zusammensetzung der cyanobakteriellen OTUs nach Ordnungen.

Die Zuordnung der OTUs zu Gattungen war mit der Analyse in qiime und GreenGenes Referenzdatenbank nur bedingt möglich. Deshalb wurden die Sequenzen der nicht klassifizierten OTUs mittels BLAST mit der NCBI-Datenbank abgeglichen und die Ergebnisse ergänzend herangezogen. Insgesamt wurden so 10 Gattungen bestimmt, die dann in Ordnungen bzw. deren morphologische Untergruppen einsortiert wurden (Tabelle 12).

**Tabelle 12 Übersicht cyanobakterieller Gattungen mit 16S Amplicon und Vorkommen in den Proben**

Ordnung	Gattung	April				Oktober				
		Schlei	Kl. Jas.	Gr. Jas.	ZS	Schlei	Kl. Jas.	Gr. Jas.	ZS	
Synecho- coccales	<i>Picosynechococcus</i>	0	2	1	0	0	1	0	0	
	<i>Cyanobium</i>	9	10	11	6	6	19	3	9	
	<i>Prochlorothrix</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	
	<i>Pseudanabaena</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	
	<i>Nodosilinea</i>	0	1	1	1	0	1	1	0	
Oscilla- toriales	<i>Planktothrix</i>	0	0	0	0	2	0	0	2	
Chroo- coccales	<i>Snowella</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	
	<i>Merismopedia</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	
	<i>Microcystis</i>	0	2	0	0	0	2	1	0	
	<i>Limnococcus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	
	Unbekannt	0	0	0	0	1	0	0	0	

Drei OTUs wurden als *Picosynechococcus* bestimmt und den Synechococcales Einzelzellen (dunkelblau) zugeordnet. Diese OTUs traten in wenigen Proben auf und in geringer Abundanz. Es wurde im Gegensatz zu Zellzählungsergebnissen der DZBK kein *Synechococcus* in großer Zahl nachgewiesen. Die häufigste Gattung in der Anzahl OTUs (35 von 50) und ihrer Abundanz war *Cyanobium*. Alle Sequenzen, die als *Cyanobium* bestimmt wurden, waren den Synechococcales Kolonien zugeordnet worden, weil diese sowohl in Kolonien als auch einzellig vorkommen können. *Cyanobium* war die einzige Gattung, die der Kategorie Synechococcales Kolonien zugeordnet werden konnte, bestimmte jedoch die OTU-Diversität und –Abundanz in allen Proben.

Die fädigen Synechococcales waren durch drei Gattungen vertreten, von denen *Nodosilinea* sowohl in den Rügener als auch den Darß-Zingster Bodden mit höherer Abundanz vorkam. Die anderen beiden Gattungen, *Prochlorothrix* und

*Pseudanabaena* waren nur in der Oktoberprobe des Kleinen Jasmunder Boddens mit geringer Abundanz vertreten.

Die Oscillatoriales waren durch zwei OTUs in Oktoberproben von Schlei und Zingster Strom vertreten. Beide OTUs wurden als *Planktothrix* bestimmt. Nur eine der beiden OTUs hatte in der Schlei eine große Abundanz.

Die Ordnung der Chroococcales war nach den Kolonien und Fäden der Synechococcales dritthäufigste Gruppe in den 16S Amplicon-Analysen. Vier Gattungen konnten nachgewiesen werden. Die Gattung *Snowella* kam ausschließlich in den Frühjahrsproben der Schlei und Rügener Bodden vor und umfasste zwei OTUs. *Merismopedia* war auch mit zwei OTUs vertreten, die sich auf die Frühjahrsproben der Schlei und des Kl. Jasmunder Boddens aufteilten. Die Gattung *Microcystis* war ebenfalls mit zwei OTUs vertreten, die sowohl im Frühjahr als auch im Herbst im Kl. Jasmunder Bodden, sowie im Herbst auch im Gr. Jasmunder Bodden vorkamen. *Limnococcus* kam mit nur einer OTU in der Herbstprobe des Kl. Jasmunder Boddens vor.

Es konnte für einige Gattungen eine Saisonalität festgestellt werden. Die Chroococcales-Gattungen *Snowella* und *Merismopedia* wurden ausschließlich in den Frühjahrsproben nachgewiesen. Fädige Vertreter der Synechococcales (*Prochlorothrix*, *Pseudanabaena*) und Oscillatoriales (*Planktothrix*) kamen hingegen ausschließlich im Herbst vor. Die einzige fädige Gattung, die ganzjährig nachgewiesen werden konnte, war *Nodosilinea*.

Der Nachweis der Gattungen *Picosynechococcus*, *Cyanobium*, *Nodosilinea*, *Pseudanabaena*, *Snowella*, sowie *Merismopedia* deckt sich mit den Ergebnissen aus Zählungen, Kultivierungsansatz und Klonierung (Tabelle 13 **Übersicht über die mit den verschiedenen Ansätzen nachgewiesenen Ordnungen und Gattungen. Klonierung und Isolate wurden nur am Zingster Strom untersucht.**).

Tabelle 13 Übersicht über die mit den verschiedenen Ansätzen nachgewiesenen Ordnungen und Gattungen. Klonierung und Isolate wurden nur am Zingster Strom untersucht.

Ordnung	<i>In situ</i>		<i>In vitro</i> Isolate
	Amplicon	Klonierung	
Synecho- coccales	<i>Picosynechococcus</i>	<i>Picosynechococcus</i>	
	<i>Cyanobium</i>	<i>Cyanobium</i>	<i>Cyanobium</i>
	<i>Prochlorothrix</i>		
	<i>Pseudanabaena</i> <i>Nodosilinea</i>		<i>Pseudanabaena</i> <i>Nodosilinea</i>
Oscilla- toriales	<i>Planktothrix</i>		
Chroo- coccales	<i>Snowella</i>	<i>Snowella</i>	
	<i>Merismopedia</i>		<i>Merismopedia</i>
	<i>Microcystis</i> <i>Limnococcus</i>		
		<i>Gloeocapsa</i>	
Nostocales			<i>Cronbergia</i>

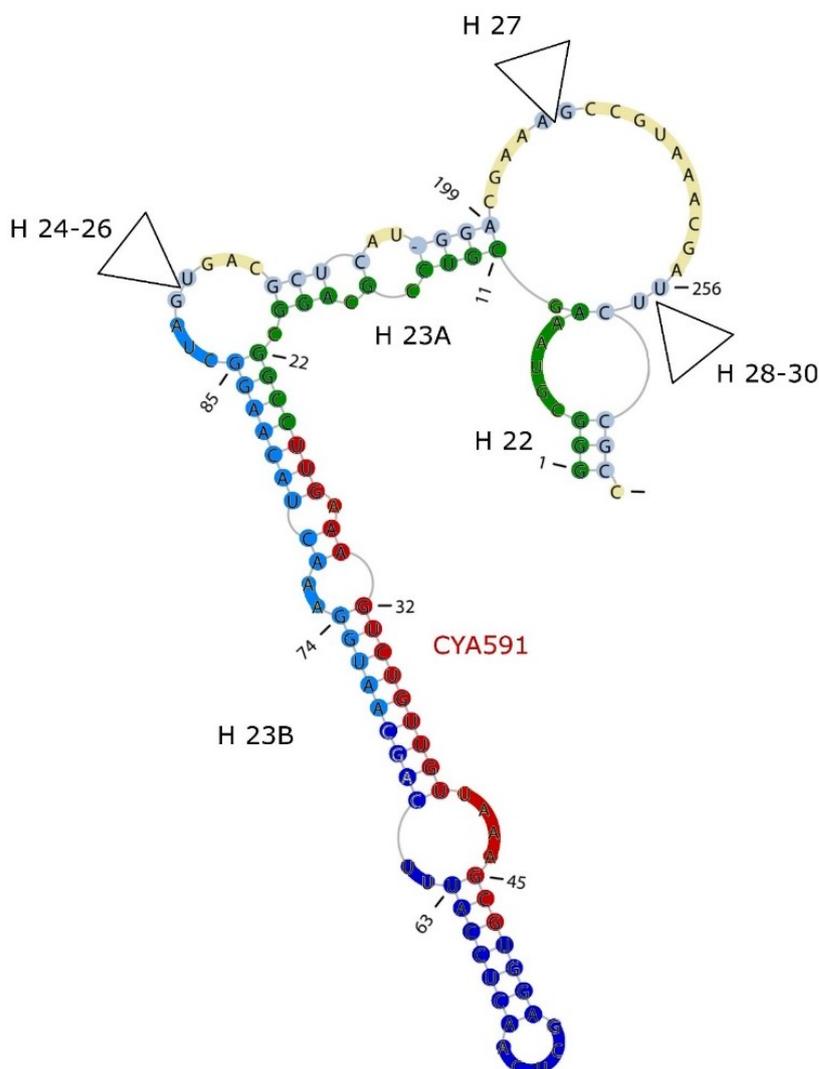
### 3.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

In den kulturabhängigen und kulturunabhängigen Ansätzen wurde die Gattung *Cyanobium* immer wieder nachgewiesen. Die einzige direkte Verknüpfung von Morphologie und Genetik beschränkte sich auf drei erfolgreiche Einzelkolonieanalysen. Damit stand der direkte Nachweis des Genotypes *in situ* noch aus. Deswegen wurde eine Fluoreszenzsonde entwickelt, die spezifisch für die  $\alpha$ -Picocyanobakterien war (Tabelle 14). Es wurden lediglich zwei weitere Organismen mit abgedeckt: *Calothrix* sp. und ein heterotrophes Bakterium.

Tabelle 14 Sonde, Helfer und Kompetitoren

Oligonukleotid	Sequenz
Sonde CYA591	CGCT TTAA CAAC AGAC TTTC AA
Helfer 1 (5')	GRCC GCCT GCGG ACGC TTTA CGCC C
Helfer 2A (3')	AYYG CYKR AATG GAGT TRAG CTCC A
Helfer 2B (3')	CWAG YCTT GTAG TTTC CAYY GCTK R
Kompetitor 1	CGCT TTAA CAAC AGAC TTTC TAAA C
Kompetitor 2	CGCT TTAA CAAC AGAC TTTT AAAA C

Die hier entwickelte Sonde band laut *in silico*-Analysen nur sehr schlecht an die gewünschte Genregion (Anhang Abbildung A1). Die Zielregion der Sonde befand sich in einer Helixstruktur der RNA, die durch die Basenpaarbindungen das Binden der Sonde verhinderte (Abbildung 24). Die Lösung waren Helfersequenzen (Tabelle 14), die in den Genregionen vor (Helfer 1) und nach (Helfer 2A und 2B), sowie innerhalb der Helix banden. Die durch das Formamid geöffneten Doppelstränge der Helix wurden so am Wiederverknüpfen gehindert und die Sonde konnte sich anlagern.

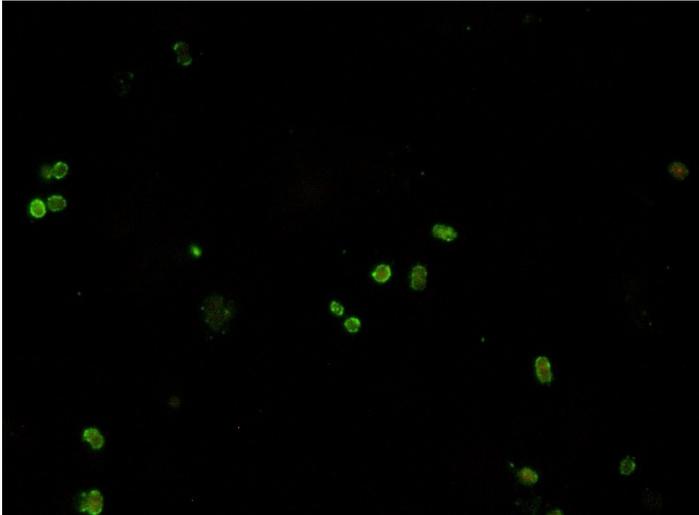


**Abbildung 24** Sekundärstruktur mit Sonde (CYA591, rot), Helfer 1 (grün), Helfer 2A (dunkelblau) und Helfer 2B (hellblau). H22-30 bezeichnen die Helices der 16S rRNA; Sekundärstrukturbild erstellt mit PseudoViewer3.0 (Bio-Soft Net).

Die Sonde CYA591 wurde bisher an dem Isolat *Cyanobium* sp. CZS 48M der DZBK unter verschiedenen Bedingungen getestet. Die Tests mit nur 2 % Formaldehyd-Konzentration als Fixierung, sowie ohne den Lösungsschritt der Schleimhülle und die angeschlossene Permeabilisierung durch das Lysozym schlugen fehl. Weiterhin wurden die Helfer einzeln und in Kombination getestet. Die ersten positiven Signale traten bei der Kombination der Helfer 1 und 2A zusammen mit der Fixierung bei 4 % Formaldehyd über Nacht, sowie dem Lösungsschritt mit Na<sub>2</sub>EDTA und der Permeabilisierung mit Lysozym auf. Die erfolgreichen Varianten sind in der Tabelle 15 zusammengefasst. Die besten Ausbeuten wurden bei 36 °C Hybridisierungstemperatur für drei Stunden und einer Formamidkonzentration von 35 % erreicht. Auffällig war die ungleiche Verteilung der gefärbten Zellen auf den Filterstücken. Es gab immer nur recht kleine Bereiche, in denen dann aber fast alle Zellen gefärbt waren. Der Anteil nicht gefärbter Zellen pro Filterstück lag dadurch bei circa 70-80 %. Die Gegenfärbung mit DAPI funktionierte hingegen immer (Abbildung 25).

**Tabelle 15 Übersicht Bedingungen positiver Signale der Sonde CYA591; <sup>1</sup> an einzelnen Stellen der Filterstücken.** Form.: Formaldehyd-konzentration; EDTA: NaEDTA 50 mM; Lys.: Lysozym (10 mg/ml); Agar.: Agarose; H.1/2A: Helfer 1/2A; K1/2: Kompetitoren 1 und 2; FA: Formamid-konzentration

Vorbereitung				Oligonukleotide				Hybridisierung			Ergebnis
Form.	EDTA [min]	Lys. [min]	Agar. 0,1 %	H. 1	H. 2A	K 1	K 2	FA	Temp	Zeit [min]	Signal
2 %	-	-	-	-	-	-	-	5 %	46 °C	180	Einzelne Zellen
2 %	60	30	-	x	x	-	-	30 %	36 °C	180	Einzelne Zellen
2 %	60	30	-	x	x	-	-	35 %	36 °C	180	Mehrere Zellen <sup>1</sup>
4 %	60	30	-	x	x	-	-	30 %	36 °C	180	Mehrere Zellen <sup>1</sup>
4 %	60	30	-	x	x	-	-	35 %	36 °C	180	Viele Zellen <sup>1</sup>
4 %	60	30	x	x	x	-	-	35 %	36 °C	180	Viele Zellen <sup>1</sup>



### Sonde CYA591

E<sub>ex</sub>: 540 nm (Blau)

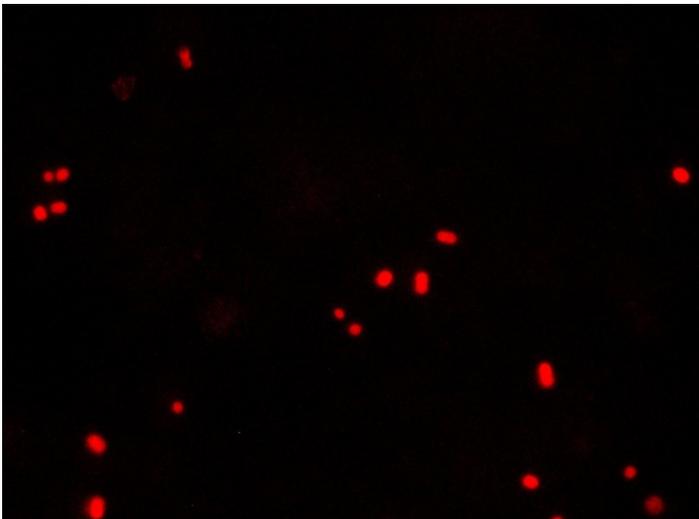
Belichtungszeit: 150 ms

Bearbeitung:

- Aufhellen: +102 %
- Kontrast: +102 %

Schwellenwert Positivsignal

- 50 ms



### Autofluoreszenz

E<sub>ex</sub>: 620 nm (Grün)

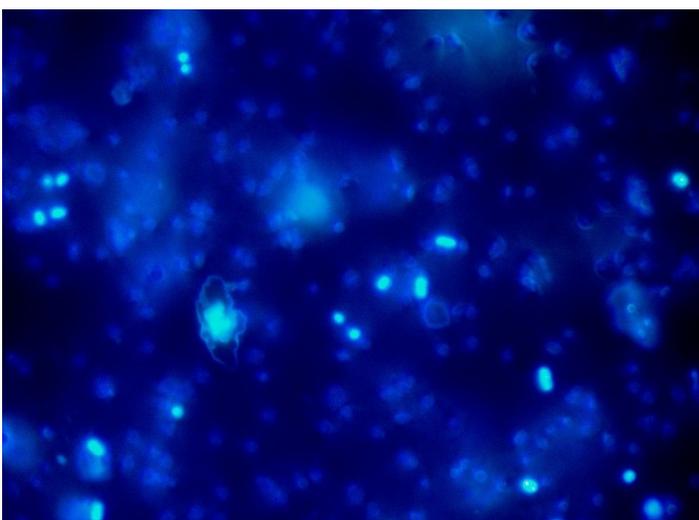
Belichtungszeit: 150 ms

Bearbeitung:

- Aufhellen: +102 %
- Kontrast: +102 %

Schwellenwert Positivsignal

- 20 ms



### DAPI-Färbung

E<sub>ex</sub>: 340 nm (UV)

Belichtungszeit: 40 ms

Bearbeitung:

- Aufhellen: +102 %
- Kontrast: +102 %

Schwellenwert Positivsignal

- 5 ms

**Abbildung 25** Fluoreszenzen der Sonde, der Photosysteme (Autofluoreszenz) und der DAPI-Gegenfärbung (Vordergrund hell leuchtend: gefärbte Zellen; Hintergrund schwächer gefärbt: Filterporen)

Unspezifische Färbungen anderer Bakterien in den nicht-axenischen Kulturen traten nicht auf. Bei Zugabe beider oder einzelner Kompetitoren gab es kein Signal. Die Positivkontrolle mit den höchsten Ausbeuten deckte nur etwa 20-30 % der auf den Filtern befindlichen Zellen ab und war zudem nicht immer reproduzierbar. Die Kompetitoren (einzeln und zusammen) verhinderten das Binden der Sonde an die Zielorganismen. Die Nicht-Ziel-Organismen lassen sich durch ihre Morphologie (*Calothrix*) bzw. das Fehlen von Autofluoreszenz (heterotrophe Bakterien) sehr gut von den Zielorganismen unterscheiden. Deshalb kann in zukünftigen Experimenten auf die Anwendung der Kompetitoren verzichtet werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodeneinflüsse

#### 4.1.1 Probennahme und Zählungen

Die gewählten Methoden hatten großen Einfluss auf die Ergebnisse der Analysen. Der erste Selektionsschritt für die taxonomische und quantitative Bestimmung der Phytoplanktongemeinschaft war die Auswahl von Probennahmestandorten und die Art der Probennahme. Netzproben mit einem Phytoplanktonnetz (Maschenweite 20  $\mu\text{m}$ ) enthalten keine oder weniger einzellige Picocyanobakterien, weil sie deutlich kleiner sind als die Maschen des Netzes. In dieser Arbeit wurde sich für Vollproben entschieden, die für die genetischen Analysen *in situ* durch Zentrifugation stark konzentriert wurden. Es sollten damit nahezu alle Gemeinschaftsvertreter repräsentiert sein.

Ein weiterer Selektionsschritt ist die Auswahl der Vergrößerung des Mikroskops für Zählungen. Bei zu geringer Vergrößerung (z.B. 200-fach) sind die kleinsten Zellen kaum noch zu erkennen. Sie lassen sich quantitativ nicht mehr vollständig erfassen und fallen bei Analysen häufig raus (Siokou-Frangou et al., 2010). In dieser Arbeit wurde mit 1000-facher Vergrößerung gearbeitet und die Morphologien mikrophotographisch dokumentiert. Die morphologische Bestimmung unterliegt oftmals einem Bearbeiterfehler, der besonders bei kryptischen Spezies mit wenigen, uneindeutigen oder schwer zugänglichen Merkmalen eine große Rolle spielt und sich kaum vermeiden lässt (Komárek et al., 2014). Mikrophotographien sind essentiell für die Nachvollziehbarkeit von Bestimmungen und sollten deshalb, ähnlich wie genetische Daten, allgemein zugänglich archiviert werden.

#### 4.1.2 Kultivierung

Die Dokumentation (und Archivierung) der Morphologie von Beginn einer Kultivierung an ist ebenfalls anzuraten. Organismen verändern unter Kulturbedingungen schnell und stark ihre Morphologie (Whitton, 1969) und eignen sich deshalb schon nach recht kurzer Zeit nur noch bedingt zur morphologischen Bestimmung. Dennoch sind Isolate die Basis für die meisten Bestimmungen, morphologisch, genetisch und zellbiologisch. Isolate werden

von den nomenklatorischen Codes für Prokaryoten (ICNP, Parker et al., 2015), sowie für Algen, Pilze und Pflanzen (ICN, McNeill et al., 2012) als Typusmaterial zur gültigen Beschreibung von Arten bzw. Genotypen verlangt. Die Gewinnung von Isolaten selbst ist ein höchst selektiver Prozess. Entweder werden einzelne Vertreter der Gemeinschaften vom Bearbeiter ausgewählt, etwa nach Gesichtspunkten der Größe, Form, Färbung usw. oder es werden bestimmte Arten durch die Anwendung von Kulturmedien selektiert. Im Ergebnis werden oft Generalisten oder nur einzelne Spezialisten erfasst, die unter ebendiesen Bedingungen gut wachsen können. Ein gewisser Anteil der gesamten Gemeinschaft wird damit also stets nicht erfasst und taucht weder in Kulturenlisten noch in Datenbanken auf. Dennoch gilt, dass nur das isoliert werden kann, was an diesem Standort vorkommt. Das ist jedoch nur dann wirklich gültig, wenn Kontaminationen durch Laborkulturen vermieden werden.

In dieser Arbeit konnten mit kulturabhängigen Methoden fünf Gattungen und 13 taxonomische Einheiten (Art-ähnlich) genetisch identifiziert werden. Die Anzahl der gefundenen taxonomischen Einheiten durch die verschiedenen kulturunabhängigen genetischen Methoden lag bei 5-27, die Anzahl der *in situ*-Morphotypen lag bei ca. 23 gezählten Arten (Schoor et al., 2008). In der 16S Amplicon-Analyse wurden für die Darß-Zingster Boddenkette einmal sieben und einmal 11 cyanobakterielle OTUs (Art-ähnlich) nachgewiesen. Das entsprach der Anzahl der durch Isolate abgebildeten Vielfalt. Die genetischen Analysen der Isolate und *in situ* glichen sich damit hinsichtlich der abgebildeten Vielfalt. Unterschiede gab es allerdings in der Identität. Während in den Isolaten bis auf *Merismopedia punctata* CZS 2.3 ausschließlich Vertreter der Synechococcales vorkamen, waren bei der Klonierung und dem 16S Amplicon auch weitere Chroococcales gefunden worden (*Snowella*, *Limnococcus*).

Weiterhin traten Unterschiede zwischen den morphologischen Untersuchungen *in situ* und *in vitro*, sowie zwischen der Morphologie *in situ* und allen genetischen Analysen auf. Ein Kultivierungseinfluss konnte nur hinsichtlich der Chroococcales (Fehlen von *Snowella* und *Limnococcus* in den Isolaten) nachgewiesen werden. Dagegen wurden *in vitro* mehr Arten der Synechococcales nachgewiesen als in den Analysen *in situ*, sodass die

Gesamtviefalt gleich blieb. Die Kultivierung bevorzugte damit zwar die Gattung *Synechococcales*, die Anzahl der Arten war jedoch gleich.

### 4.1.3 Kulturunabhängige Methoden

Der Vorteil aller kulturunabhängigen Methoden ist, dass sie keiner Vorab-Selektion in der Organismenauswahl unterliegen. Diese Möglichkeit erweitert das Spektrum der zu untersuchenden Organismen um jene, die sich nicht kultivieren lassen und bildet im günstigsten Fall auch die *in situ*-Abundanzen der Gemeinschaft ab. Alle genetischen Methoden selektieren jedoch ebenfalls durch die Auswahl der Primer, das Funktionieren der PCR, den DNA-Gehalt in der Probe und in der weiteren Datenverarbeitung, durch Software-Einstellungen oder -filter.

Die Klonierung unterlag ebendiesen Einflüssen genetischer Methoden. Gerade in der Klonierung zeigten sich unterschiedliche Bindungsspezifitäten von DNAs. Die Gattung *Snowella* war, gemessen an ihrer Abundanz *in situ*, überrepräsentiert in den Klonen. Ursachen dafür können sowohl PCR-Einflüsse als auch erhöhte Genkopieanzahlen in den Zellen von *Snowella* gewesen sein. Primerbedingte Effekte sind aber ebenfalls nicht auszuschließen. Insgesamt ist die Klonierung eine recht teure und zeitaufwändige Methode, gemessen an der Anzahl Datensätze, die damit generiert werden. In dieser Arbeit lag der Vorteil der Klonierung gegenüber dem 16S Amplicon in der besseren Auflösung durch längere Sequenzen. Die phylogenetische Zuordnung der Klone zu Gattungen und die Trennung in verschiedene Arten waren recht sicher. Nur in der Gruppe der marinen  $\alpha$ -Picocyanobakterien konnte selbst die Gattung nicht sicher bestimmt werden.

Die T-RFLP-Ergebnisse bilden zwar nicht die Identität von OTUs ab, dafür ist diese Methode durch eine größere Summe an Fragmenten besser für die Diversitätsbestimmung geeignet. Die T-RFLP-Ergebnisse hängen von den eingangs genannten allgemeinen Faktoren genetischer Methoden und zusätzlich von der Wahl des Restriktionsenzym und der Vollständigkeit des Restriktionsverdau ab. Weiterhin hat T-RFLP eine prinzipbedingte Ungenauigkeit, die zu einer Unterschätzung der Vielfalt führen kann. Unterschiedliche Nukleotidsequenzen in Fragmenten gleicher Länge können

nämlich mit der T-RFLP nicht aufgelöst werden. Deswegen ist die Wahl des Restriktionsenzym für die gewählte Genregion und Organismengruppe von großer Bedeutung und wird in der Regel vorab *in silico* geprüft. Die Häufigkeit von Sequenzen in der Probe ist ein weiterer Faktor, der Einfluss auf das Ergebnis der T-RFLP nimmt. Die Bestimmungsgrenze der T-RFLP liegt bei 1 % Häufigkeit (Courtney et al., 2012), d.h. seltene Sequenzen werden nicht abgebildet.

Die Anzahl der T-RFLP-OTUs in dieser Arbeit lag in derselben Größenordnung wie die der 16S Amplicon-Analyse und teilweise sogar darüber. Das ist ein Indiz für eine geringe Unterschätzung der Diversität mit dem 16S Amplicon-Ansatz mit den Bakterienprimern. In der Literatur hingegen wurden sehr gute Übereinstimmungen von T-RFLP und 16S Amplicon nachgewiesen (De La Fuente et al., 2014; Piloni et al., 2012). Da in dieser Arbeit die Ergebnisse von T-RFLP und 16S Amplicon zwar nicht übereinstimmten, jedoch insgesamt in derselben Größenordnung liegen, kann den Ergebnissen vertraut werden.

Die Amplicon-Analysen haben sich in den letzten Jahren durch sinkende Kosten und den ihnen eigenen Informationen zu Diversität und Identität gegenüber Fingerprint-Methoden durchgesetzt. Jedoch haben auch die Amplicon-Analysen neben den o.g. allgemein genetischen Methodeneinflüssen, weitere Einschränkungen.

Es gibt auch bei dem 16S Amplicon einige Einschränkungen, was die Genauigkeit der Bestimmung und die Abdeckung der Gemeinschaft betrifft. So können durch den Vergleich mit Referenzdatenbanken automatisch nur die Taxa bestimmt werden, die mit den Referenzen übereinstimmen. Abweichungen davon werden als unklassifiziert oder unbekannt gekennzeichnet und müssten einzeln überprüft werden. Bei großen Datensätzen ist diese Vorgehensweise nicht möglich. Dadurch ist auch die Abdeckung der genetischen Vielfalt eingeschränkt. Viele nicht zu kultivierende Organismen werden in den Datenbanken nicht erfasst, denn die Referenzdatenbanken basieren auf hinterlegten Typus-Stämmen (Ramos et al., 2017).

Diesen Limitationen kann mit den aktuellen Methoden wenig entgegen gewirkt werden. Es wäre eine akribische Überprüfung der Daten und aller unklassifizierten Sequenzen nötig, um deren Einordnung zu klären. Eine rigorose Aufarbeitung insbesondere der Sequenzen, die keiner Referenzsequenz zugeordnet werden können, ist nötig, um auch die nicht kultivierbaren Organismen abzubilden. Die Auswertung solcher Ergebnisse ist jedoch schwierig, weil sich künstliche Artefakte und unbekannte Organismen nicht sicher trennen lassen. Dazu müssen verschiedene Algorithmen und Sequenzierplattformen mit unterschiedlichen Primern die gleichen „Unklassifizierbaren“ wiederfinden. Eine weitere Möglichkeit wären Einzelzellanalysen aus Umweltproben. Diese böten bei akribischer Untersuchung die Möglichkeit auch den Faktor der Kontamination mit anderen Organismen auszuschließen. Diese Methode ist allerdings sehr zeitaufwändig und hat dieselben Unsicherheiten durch die Primer-Spezifität. Vorteile lägen in einer geringeren Unsicherheit des DNA-Ursprungs und der Möglichkeit, verschiedene Primer-Sets ausprobieren zu können.

In dieser Arbeit lieferten die Amplicon-Analysen eine relativ geringe Anzahl an OTUs und Sequenzen insgesamt. Nach der Anwendung der Filter blieben maximal 600 Sequenzen von einem Standort übrig, die taxonomisch analysiert wurden. In der gleichen Größenordnung bewegten sich zwar auch die Sequenzzahlen einiger Stationen in Celepli et al. (2017), jedoch wurden an den meisten anderen Stationen mehr als 2.000 Cyanobakteriensequenzen analysiert. Die Ursachen für die geringe Sequenzanzahl in dieser Arbeit können vielfältig sein, beginnend damit, dass die Amplifizierung unvollständig verlief und deswegen viele zu kurze Fragmente durch die Software-Filter aussortiert und von den weiteren Analysen ausgeschlossen wurden. Auch können zu stringente Filter-Parameter in der Software zu viele Sequenzen entfernt haben. Dieser Fehler ließe sich mit künstlichen Gemeinschaften (DNA-Mix „Mock Community“) feststellen und durch angepasste PCR-Protokolle oder Primer beheben. Eine andere Möglichkeit stellt die Anwendung anderer Software-Pipelines oder anderer Referenzdatenbanken wie z.B. die der SILVA-Datenbank dar. Die Überprüfung mit anderer Software und/oder anderen Datenbanken ist mit den Rohdaten relativ einfach und wurde in dieser Arbeit

zunächst mit der Software *mothur* und verschiedenen Datenbanken (RDP, SILVA, GreenGenes) als Referenz durchgeführt (Anhang Abbildungen A2-A5). In diesen Analysen wurden keinerlei Cyanobakteriensequenzen zugeordnet und der Anteil unklassifizierbarer Sequenzen war hoch. Deswegen wurde ein zweiter Durchlauf mit der *qiime* Softwarepipeline und der GreenGenes-Datenbank gestartet, dessen Ergebnisse hier wegen des Vorhandenseins von Cyanobakterien und wegen weniger unklassifizierbarer Sequenzen verwendet wurde. Die verwendeten Primer sind spezifisch für Bakterien und scheinen die Cyanobakterien nicht exakt aufzulösen. Die Bakterienprimer wurden hier verwendet, weil die Zuordnung zu Gattungen für diese Arbeit genügte und es ermöglichte, das gesamte Bakterioplankton in einer späteren Arbeit zu charakterisieren. Für genauere Analysen der Cyanobakteriengemeinschaft wären daher bei späteren Analysen andere Primer zu wählen, die nicht die V1-2-Region, sondern eher die V4-Region umfassen (Caporaso et al., 2012).

## 4.2 Bestimmungsmethoden

### 4.2.1 Datenbanken und molekulare Bestimmung

Die Identität der Cyanobakterien der DZBK, den Jasmunder Bodden und der Schlei lässt sich mit einzelnen Methoden nicht klären, denn sie liefern widersprüchliche Ergebnisse. Die Morphologie *in situ* führt zu Gattungen der Ordnung Chroococcales. Die genetischen Bestimmungen, sowie die Morphologie der Isolate führen zu Gattungen der Ordnung Synechococcales. Die Unterschiede entstehen, weil der kulturrenabhängige Ansatz sich auf verschiedenen Ebenen auf die *in vitro*-Morphologie stützt. Zum einen bei der morphologischen Bestimmung der Isolate, zum anderen bei der genetischen Bestimmung. Die genetischen Datenbanken beruhen zwar auf den genetischen Daten, also Sequenzen, die dort hochgeladen wurden, jedoch sind die Namen, die den Sequenzen zugeordnet wurden, oftmals auf Grundlage der Morphologie vergeben worden. Das bedeutet, dass bei unkritischer Betrachtung der molekularen Ergebnisse anhand einer einfachen Datenbanksuche häufig andere Gattungen gefunden werden als über phylogenetische Analysen (s. Ergebnisteil Klonierung).

Datenbanken, die zur Bestimmung herangezogen werden, sollten auf vertrauenswürdige Sequenzen beschränkt sein. Vertrauenswürdige Sequenzen sind jene, die entweder von Typstämmen der Gattungen stammen, von sehr gut charakterisierten Isolaten oder anhand von Genom-Untersuchungen der Isolate verifiziert wurden. Nicht vertrauenswertig für Bestimmungen sind Sequenzen aus Umweltproben, von Isolaten unbekannter Kultursammlungen und welche, die nicht einer Publikation zugeordnet sind. Das Zusammenstellen von Referenzen für eigene Untersuchungen und Gruppen aus den vertrauenswürdigen Sequenzen ist essentiell für die Qualität der Bestimmung und kann Zuordnungsfehler vermeiden helfen (Ramos et al., 2017).

### 4.2.2 Artkonzept der Cyanobakterien

Das Konzept der Arten wurde entwickelt, um die Umwelt und ihre Bestandteile beschreiben zu können. Sie vereinfachen die komplexen ökologischen Zusammenhänge zwischen den Organismen und stellen eine handwerkliche Hilfe zu einer einheitlichen Unterscheidung und Benennung der Organismen dar. Arten sind die kleinste in sich geschlossene taxonomische Einheit, die sich durch eine gemeinsame Verbreitung, Entwicklung und genetische, sowie physiologische Eigenschaften von anderen Einheiten unterscheidet. Die Konzepte und Definition der Arten fallen je nach Organismengruppe sehr unterschiedlich aus und reichen von Reproduktionsgrenzen über Verbreitungsgrenzen bis hin zu prozentualen Anteilen veränderter DNA-Basen im Vergleich von Genen (z.B. Parker et al., 2015). Arten sind die wichtigste biologische Einheit bei ökologischen Untersuchungen, Diversitätsbeschreibungen, Risikobewertungen und in der Überwachung von Gewässern (Reynolds et al., 2002).

Die Cyanobakterien sind in dieser Arbeit dennoch in der Regel nur bis zur Gattungsebene bestimmt worden. Ein Grund dafür ist der Mangel an verfügbaren Merkmalen bei den Isolaten. Ein anderer Grund ist das Fehlen eines allgemein anerkannten Artkonzeptes bei den Cyanobakterien. Die Cyanobakterien sind als Prokaryoten nicht mit den klassischen Artkonzepten der Zoologie und Botanik zu erfassen. Cyanobakterien können sich nicht sexuell vermehren, sind aber dennoch zum Genaustausch mit ihrer Umgebung

befähigt. Es gibt innerhalb der Bakterien die Möglichkeit des lateralen Genaustauschs. Durch Phagen (z.B. Cyanophagen) können Gene eines Stammes in das Genom eines anderen gelangen (Rohwer und Thurber, 2009). Diese Form des genetischen Austauschs ist erdgeschichtlich alt. Anhand von Genomanalysen lassen sich verschiedenste Gen- und Proteinsequenzen vergleichen und analysieren. Die Genomdaten zeigen, dass viele Gene des Cyanobakteriengenoms ihren Ursprung z.B. in den heterotrophen  $\gamma$ -Proteobakterien haben (Dagan und Martin, 2007). Gene anderer Bakterien, die auch die Bildung von Sekundärmetaboliten wie Toxinen und Schleimen beeinflussen können quasi spontan in verschiedenen Gruppen der Cyanobakterien auftauchen. Der laterale Gentransfer ist ein Prozess, der im Vergleich zu sexuellem Genaustausch recht selten auftritt, bzw. selten Auswirkungen hat, die sich in einer Population bemerkbar machen. Über die evolutionär langen Zeiträume der Cyanobakterienentwicklung, haben sich dennoch viele Muster anderer Bakterien in den Cyanobakterien verstetigt. Genetische und morphologische Marker sind deshalb nicht immer phylogenetisch aussagekräftig. Konservierte genetische Regionen, die so essentiell zum Erhalt der Lebensfähigkeit sind, dass große Änderungen häufig ein Sterben des Organismus zur Folge hätten, sind dabei unverzichtbar zur Bestimmung der phylogenetischen Zuordnung. Die 16S rRNA ist ein solches Gen, das wenig variabel ist und die sichere Einordnung in die höheren taxonomischen Ebenen (Abteilung, Ordnung, Klasse, Familie, oft auch Gattung) erlaubt (Woese, 1987). Die phylogenetische Aussagekraft des 16S rRNA-Gens wurde in Vergleichen mit Phylogenien von genomischen Proteingenen bestätigt (Komárek et al., 2014; Shih et al., 2013).

Variable Bereiche der 16S rRNA sind dennoch vorhanden. In den nicht Struktur gebenden Bereichen wie Haarnadelstrukturen treten sie am häufigsten auf. Daher gibt es auch Helices, die einer größeren Variabilität unterliegen. Diese variablen Bereiche sind phylogenetisch aussagekräftig und ermöglichen die Bestimmung bis auf Gattungsebene. Die 16S rRNA ist wegen dieser Kombination von sehr konservativen und variablen Bereichen in der bakteriologischen Gemeinschaft der Goldene Standard zur Bestimmung (Stackebrandt et al., 2002). Auch für Eukaryoten der Größenklassen von Pico

(< 2 µm) bis Micro (< 500 µm) werden genetische Marker immer wichtiger für die Identifizierung (z.B. Fenchel und Finlay, 2006).

Im Fall der Cyanobakterien wurden bereits viele verschiedene Schwellenwerte für Nukleotidtausche pro 100 Nukleotide vorgeschlagen und in Dvořák et al. (2015) zusammengefasst. Am häufigsten werden drei Basenänderungen pro 100 Basenpaare als Definition für eine Artgrenze herangezogen. Diese 97 % Übereinstimmung ist der Standard in der mikrobiellen Taxonomie und bezieht sich auf die 16S rRNA. Dieser Wert wurde auch für die 16S Amplicon-Analysen in dieser Arbeit angenommen. Es ist, ausgehend von der Literatur, unsicher, welcher Schwellenwert für die Abgrenzung von Arten in den Cyanobakterien genutzt werden kann. Ein weiteres Problem ist die Auswahl der Genregion der 16S rRNA, wenn diese, wie bei Amplicon-Sequenzierung, nicht komplett sequenziert wird. Im Fall dieser Arbeit wurde eine variable Region (V1 und V2) der 16S rRNA zugrunde gelegt. Da fast sämtliche Variabilität des 16S Gens in den wenigen variablen Bereichen liegt, bedeuten drei Prozent Basenunterschiede in den V-Regionen deutlich weniger Unterschied, bezogen auf das gesamte Gen. Genauer bedeuten 3 % Variabilität in den V-Regionen etwa 0,7 % Variabilität bezogen auf das Gesamtgen. Bei einer Grenze von 97 % Identität im Gesamtgen müsste die Unterscheidungsgrenze in den V-Regionen bei etwa 13,5 % gezogen werden. Unklar bleibt dabei dennoch, ob die Mutationsrate in allen V-Regionen gleich schnell abläuft oder aber unterschiedlich. So können ggf. einzeln untersuchte Genregionen innerhalb einer Bakteriendomäne nicht ausreichend auflösen. Aussagen über unterschiedliche oder unterschiedlich lange Genbereiche erzeugen eine große Ungenauigkeit hinsichtlich der Artgrenzen. Auch die Abgrenzung von Gattungen anhand der Basenunterschiede allein ist deshalb ungenau (siehe auch Palinska und Surosz, 2014). Dvořák et al. (2015) kommen gar zu dem Schluss, dass die Bestimmung von Arten anhand des 16S rRNA-Gens wegen seiner vielen konservierten Regionen hingegen kaum möglich ist.

Im Gegensatz zu Arten lassen sich Gattungen aber oftmals anhand statistisch gut unterstützter Trennung in phylogenetischen Analysen erkennen. Gattungen sind deshalb sicherer anzusprechen und dienen auch in den polyphasischen Ansätzen der letzten Jahre als genetische Ausgangsbasis, während Arten

anhand ihrer Morphologie und Ökologie zu unterscheiden seien (Komárek, 2016). Andere Ansätze beziehen die ITS-Region und deren Sekundärstruktur zur Artabgrenzung innerhalb der Gattungen heran (Dvořák et al., 2015; Osorio-Santos et al., 2014; Perkerson et al., 2011). Hanage (2013) und Palinska und Surosz (2014) gehen hingegen davon aus, dass Arten bei den Cyanobakterien aufgrund ihrer bakteriellen Natur nicht vorhanden sind und stattdessen die Population die wichtigste ökologische Einheit ist. Die große Variabilität ihrer physiologischen und genetischen, sowie morphologischen Eigenschaften stützt diese Sichtweise. Eine Folge wäre die Notwendigkeit der Untersuchung von jeder einzelnen Population hinsichtlich Identität, ökologischer Potenz und Risiken. Die Anwendung genomischer Daten für systematische Analysen (z.B. Komárek et al., 2014; Shih et al., 2013) liefert den Grundstein für zukünftige Analysen von Cyanobakteriengemeinschaften. Die Metagenomik und die Metatranskriptomik bieten die Möglichkeit, in Zukunft Organismengemeinschaften z.B. auf ihre Toxingene, aber auch auf die Transkripte der Gene hin zu untersuchen. Die Gemeinschaften könnten so durch die molekularen Methoden sogar hinsichtlich ihrer Risiko- und anderer Potenziale (z.B. Salzstresstoleranz) exakter bewertet werden. Die Grundlagen für ein solches System (z.B. umfassende Datenbanken) sind aber noch zu entwickeln.

### 4.3 Morphologie und Genetik – Welten zusammenführen

Die Cyanobakterien werden in der DZBK seit Jahrzehnten mikroskopisch bestimmt und die typischen Vertreter haben sich über die Jahre nur in ihren Abundanzen verändert. Die in der DZBK vorkommenden Gattungen *Aphanothece*, *Aphanocapsa*, *Coelosphaerium*, *Chroococcus*, *Snowella*, *Planktolyngbya*, *Dolichospermum* (ehemals *Anabaena*), *Microcystis* und *Aphanizomenon* wurden bereits seit den 1970er Jahren, aber auch in jüngeren Arbeiten nachgewiesen (Kell, 1973; Nasev et al., 1978; Pankow, 1976; Pankow and Martens, 1973; Schumann et al., 2005). Es wurden in der Vergangenheit circa 40 Cyanobakterienarten an den einzelnen Stationen und insgesamt 61 Cyanobakterienarten in der DZBK bestimmt (Pankow, 1976). Erst in den 1990er Jahren haben Klinkenberg und Schumann (1995) auch die nicht-koloniebildenden Picocyanobakterien erfasst, Schoor et al. (2008) konnten im Mittel noch 23 Arten pro Station nachweisen.

In den Jasmunder Bodden und der Schlei wurden ebenfalls die Gattungen beschrieben, zusätzlich aber auch u.a. die Gattung *Anabaenopsis* (jetzt wahrscheinlich *Cronbergia*) (Feibicke, 1994), die sich auch in der DZBK findet. In der Arbeit von Feibicke (1994) war allerdings *Microcystis aeruginosa* das dominante Cyanobakterium (bis zu 90 % der Biomasse), während der Anteil der Picocyanobakterien bei etwa 1-15 % der Biomasse lag. In der DZBK, aber auch in der Schlei, nahm die Abundanz der Picocyanobakterien mit steigender Trophie zu (Albrecht et al., 2017; Feibicke, 1994). In der Schlei nahm ihr Anteil an der Gesamtbiomasse des Picophytoplanktons entlang der Gradienten zur Ostsee hin zu (Feibicke, 1994), während sie in der DZBK an allen Stationen in etwa den gleichen Anteil an der Abundanz und Biomasse hatten (Albrecht et al., 2017). Die Phytoplanktongemeinschaften der Schlei und der DZBK ähnelten sich also im Artenspektrum, hatten aber unterschiedliche Zusammensetzungen hinsichtlich ihrer abundantesten Vertreter nach morphologischen Gesichtspunkten und wurden deshalb für vergleichende Analysen mit dem 16S Amplicon herangezogen.

Nach den morphologischen Zählungen waren in der DZBK chroococcale Picocyanobakterien des *Aphanothece*-Komplexes ganzjährig die abundanteste Gruppe (ca. 50 %), stellten jedoch nur ca. 15 % des Biovolumens (Albrecht et al., 2017). Die fädigen Cyanobakterien, insbesondere *Planktolyngbya contorta*, stellten ca. 45 % des Biovolumens in der DZBK. Die cyanobakteriellen Kolonien, Filamente und Einzelzellen (*Synechococcus*-ähnlich) dominierten morphologisch die Abundanz mit über 90 % aller gezählten Zellen seit Jahren (Schoor et al., 2008; Schumann et al., 2005). Geiß et al., 2004 konnten in einem ersten genetischen Ansatz mit der Klonierung von cyanobakterienspezifischen Markergenen hauptsächlich Sequenzen der Gattung *Synechococcus* nachweisen. Es waren jedoch wenige Klone, die Datenbanken waren unvollständig und die Gattung *Synechococcus* umfasste mehrere phylogenetische Linien, die heute als unterschiedliche Gattungen beschrieben sind (Komárek, 2016). Dadurch blieb damals die genetische Identität ungenau.

Im Gegensatz zu anderen Lagunen der südlichen Ostsee (Nawrocka und Kobos, 2011; Paldavičiene et al., 2009; Pilkaityte, 2007) waren die klassischen

Blütenbildner der angrenzenden Ostsee (*Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* z.B. Wasmund, 1997) nur in geringen Abundanzen in der DZBK zu finden. Selbst die Herbstblüten mit einem erhöhten Anteil an Cyanobakterienfilamenten wurden hauptsächlich von heterozytenlosen Vertretern gebildet (Morphotypen: *Limnothrix*, *Pseudanabaena*, *Leptolyngbya*). In der Schlei dominierte hauptsächlich *Microcystis aeruginosa* das Phytoplankton, jedoch hatten auch die Picocyanobakterien einen Anteil von bis zu 15 % an der Biomasse (Feibicke, 1994). Von den Jasmunder Bodden wurden ebenfalls viele Picocyanobakterien der Chroococcales berichtet (Schiewer, 1997), weshalb diese beiden Systeme auch in den genetischen Analysen berücksichtigt wurden.

Die genetischen Analysen dieser Arbeit zeigten die jedoch Dominanz der Ordnung Synechococcales in allen untersuchten Gewässern, *in vitro* und *in situ*. Eine Fehlbestimmung anhand der Morphologie ist sehr wahrscheinlich. Vor diesem Hintergrund verschoben sich die Zählraten nun massiv zugunsten der Ordnung Synechococcales (Tabelle 16, Abbildung 26). Die Ordnung Synechococcales bestimmte fast die gesamte Abundanz des Phytoplanktons und noch ca. 70 % des Biovolumens des Zingster Stroms. In der Schlei und den Jasmunder Bodden zeigten die Amplicon-Ergebnisse ebenfalls viele Sequenzen der Vertreter der Ordnung Synechococcales. Auch dort ergab sich eine Verschiebung von den Chroococcales hin zu den Synechococcales im Vergleich zu den morphologischen Daten (Schiewer, 1997; Feibicke, 1994).

**Tabelle 16 Anteil Abundanzen der Ordnungen Chroococcales und Synechococcales am cyanobakteriellen Phytoplankton der DZBK nach Morphologie und Genetik. Zählraten von R. Schumann in Albrecht et al., 2017**

		DB19	DB16	DB10	ZS	DB06	DB02	DB01
Morph.	% Synechococcales	46 %	46 %	58 %	47 %	68 %	44 %	58 %
	% Chroococcales	51 %	51 %	40 %	51 %	30 %	32 %	26 %
Genet.	% Synechococcales	89 %	91 %	93 %	94 %	87 %	92 %	95 %
	% Chroococcales	9 %	8 %	4 %	4 %	9 %	7 %	4 %

Zingster Strom Phytoplankton 2013

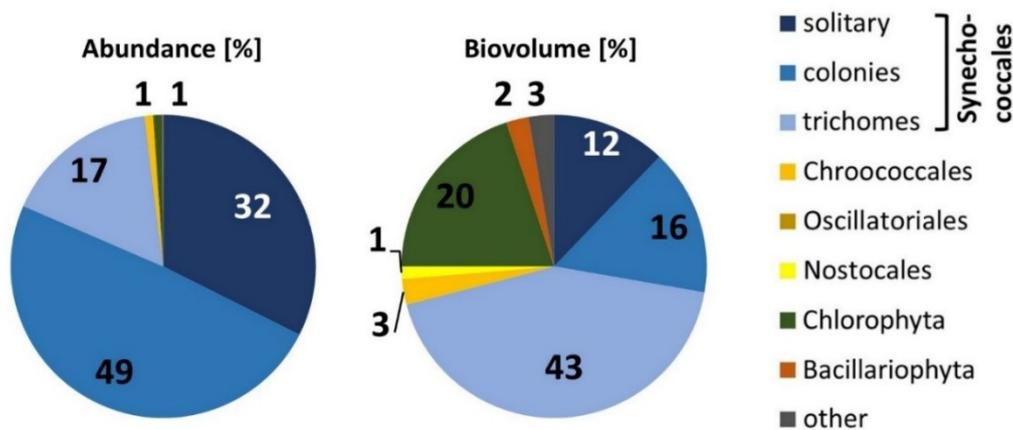


Abbildung 26 Abundanz des Phytoplanktons im Zingster Strom 2013 mit korrigierten Zuordnungen zu den Zählkategorien (aus Albrecht et al., 2017)

Weltweit kommen Picocyanobakterien häufig in flachen, z.T. brackigen Gewässern mit geringer Sichttiefe vor (Tabelle 17). Morphologisch wurden dabei meistens Koloniebildner der Ordnung Chroococcales beschrieben. Interessanterweise wurden genetisch fast ausschließlich andere Gattungen nachgewiesen als mit den morphologischen Analysen (Tabelle 18). Das stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, zeugt aber von den Problemen in der Artansprache für das Monitoring. In den genannten Beispielen sind die Picocyanobakterien alle nur mit dem jeweiligen morphologischen oder genetischen Ansatz bestimmt worden. Weil sich beide Ansätze nicht ohne weiteres verknüpfen lassen, bleibt die Frage nach der wirklichen Identität der dominierenden Cyanobakterien. Dieses Problem kann nur über Ansätze gelöst werden, die beides, Morphologie und Genetik, miteinander verbinden. Eine FisH-Sonde, wie sie in dieser Arbeit entwickelt wurde, könnte diese grundlegende Frage klären. Die Untersuchungen mit FisH-Sonden erlauben über fixierte Rückstellproben sogar Rückschlüsse auf vergangene Zustände.

**Tabelle 17 Beschriebene Vorkommen von Picocyanobakterien in Gewässern weltweit** (verändert nach Albrecht et al., 2017)

Gewässer	Eigenschaften	Gattungen	Bestimmungsliteratur	Methode	Referenz
<b>Çaygören Reservoir</b>		<i>Aphanocapsa, Aphanothece</i>	Komárek & Anagnostidis, 2005; Namen mit AlgaeBase (Guiry und Guiry, 2016) aktualisiert	Lichtmikroskopie	Çelik und Ongu Sevindik, 2015
<b>Vistula Lagoon (POL)</b>	Flach, brackisch, eutroph	<i>Aphanocapsa, Aphanothece, Cyanodictyon, Merismopedia, Snowella, Woronichinia</i>	Funktionelle Gruppen	Lichtmikroskopie, Lugol	Nawrocka and Kobos, 2011
<b>Curonian Lagoon (LIT)</b>	Flach, brackisch	some colonies	Nicht angegeben	Lichtmikroskopie, Lugol	Pilkaityte, 2007
<b>Venice Lagoon (ITA)</b>	Flach, fast marin	<i>Coelosphaerium kutzingianum, C. minitissimum Aphanothece, Synechococcus</i>	Nicht angegeben	Epifluoreszenz-mikroskopie	Sorokin et al., 2004
<b>Laguna de Tres Palos (MEX)</b>	oligohalin, hypereutroph, flach	<i>Aphanocapsa delicatissima, Merismopedia punctata, Chroococcus dispersus var. minor, Raphidiopsis curvata, Pseudoanabaena limnetica</i>	Caljon, 1983); Moreno-Ruíz, 2000; Moreno, 2003; Moreno-Ruíz, 2005	Lichtmikroskopie, Lugol	Espino et al., 2008
<b>Patos Lagoon (BRA)</b>	Flach, brackisch	<i>Aphanocapsa nubilum, Planktolyngbya limnetica, Cyanodictyon imperfectum</i>	Nicht angegeben	Lichtmikroskopie	Torgan et al., 2006
<b>Lake Santa Olalla (SPA)</b>	Flach, hypertroph	<i>Aphanothece, Chroococcus, Nostocales filaments</i>	Anagnostidis & Komárek, 1985; Waterbury, 1991	Epifluoreszenz-mikroskopie, Formaldehyde	López-Archilla et al., 2004
<b>Laguna Chascomús (ARG)</b>	Süßwasser, flach	<i>Aphanocapsa, Raphidiopsis, Planktolyngbya</i>	Nicht angegeben	Lichtmikroskopie, Lugol	Iachetti und Llames, 2015

**Tabelle 18 Beschriebene Vorkommen von *Cyanobium* in ausgewählten Gewässern** (verändert nach Albrecht et al., 2017)

Gewässer	Referenz	Methode
<b>Ostsee</b>	Celepili et al., 2017; Ernst et al., 2003; Haverkamp et al., 2009	Isolate, 16S rRNA, Metagenome
<b>Bodensee (GER), Lake Maggiore (ITA), Lake Biwa (JAP)</b>	Ernst et al., 2003	Isolate, 16S rRNA
<b>Reservoirs Nová Říše, Římov, Vír (CZE)</b>	Jezberová und Komárková, 2007b	Isolate, 16S rRNA
<b>Lake Balaton (HU), Lake Zurich (SWI), Lake Constance (GER)</b>	Postius und Ernst, 1999	Isolate, 16S rRNA
<b>Albufera Lagoon (SPA)</b>	Ghai et al., 2012	Metagenome
<b>Chesapeake Bay (USA)</b>	Qiu et al., 2012	Isolate, 16S rRNA
<b>Coorong Lagoon (AUS)</b>	Schapira et al., 2010	Flow-Cytometrie

Die morphologische Bestimmung von Gemeinschaften zum Monitoring ist immer noch der Standard in der Gesetzgebung (EU-WRRL). Die Grenzen dieser Bestimmung sind seit Jahrzehnten, nahezu Jahrhunderten offensichtlich. Die Zuordnung der Cyanobakterien zu den Bakterien (Echlin und Morris, 1965), den Algen (Geitler, 1932) oder den Pilzen (Myxophyceae (Cohn, 1853)) seit ihrer Entdeckung ist ein Beispiel dafür. In neuerer Zeit wurden von Komárek und Anagnostidis (1989), klassischen Taxonomen und Autoren der Cyanoprokaryota 1-3 (Komárek, 2013; Komárek und Anagnostidis, 1999, 2005), Bedenken zur korrekten Bestimmung von ca. 50 % aller Cyanobakterienisolate geäußert.

Die Prokaryoten, insbesondere die heterotrophen Bakterien, zeigen so viele konvergente phänotypische Anpassungen, dass eine Bestimmung anhand der Morphologie nicht möglich ist. Deshalb stehen die physiologischen und genetischen Merkmale im Vordergrund der bakteriologischen Systematik und Taxonomie (Doolittle und Zhaxybayeva, 2009). Bakteriologen verzichten häufig sogar auf die Bestimmung von Arten, sondern ordnen ihre Ergebnisse

vorhandenen Stämmen zu, die als Referenzen festgelegt sind. Die Cyanobakterien müssten vor diesem Hintergrund diesbezüglich wie die anderen Bakterien betrachtet werden, selbst wenn sich einige Gruppen durch spezielle Merkmale recht sicher morphologisch bestimmen lassen (Oren, 2011; Oren und Garrity, 2014). Differenzierte Zellen und stabile morphometrische Merkmale (z.B. Polarität) lassen dennoch bei einigen Gattungen die sichere morphologische Bestimmung zu (Komárek, 2016).

In der Wissenschaft wird mittlerweile flächendeckend die genetische Bestimmung über die morphologische Bestimmung gesetzt und die morphologische Bestimmung mit genetischen Daten verifiziert. Die Nukleotidsequenzen gelten durch ihre Stabilität bei variierenden Umweltfaktoren als verlässlicher, genauer und präziser als die Morphologie. Die Morphologie hingegen ist variabel und manche Merkmale treten nur in bestimmten Stadien oder unter bestimmten Umweltbedingungen auf (Huber et al., 2017; Jezberová and Komárková, 2007a, 2007b). Welche Merkmale in welcher Reihenfolge und Priorität zu bewerten sind, entscheidet der Bearbeiter anhand allgemeiner Bestimmungsschlüssel. Es gibt jedoch z.B. nur wenige Bestimmungsschlüssel für Brackgewässer wie z.B. die Ostsee-Algenflora von Pankow (1990). Das Standardbestimmungswerk für die Cyanobakterien, die Cyanoprokaryota 1-3 in der Süßwasserflora Mitteleuropas, konzentriert sich auf die Süßwasserorganismen, weitere Habitate werden erwähnt, aber nicht genauer betrachtet. Die Genauigkeit der Bestimmung ist wegen der geringeren Abdeckung ebenfalls geringer.

Die genetischen Daten bieten eine höhere Genauigkeit und Objektivität. Die Nukleotidsequenzen lassen sich mit mathematischen Mitteln leicht als gleich oder verschieden einstufen und der Grad der Verschiedenheit in greifbaren Zahlen ausdrücken. Dennoch unterliegen auch sie einer gewissen Subjektivität durch die Auswahl des Gens, der Länge der Sequenz, der Referenzsequenzen, der Primer, durch die Anpassung des Alignments (z.B. Anwendung von Masken) und der Wertung der Basenaustausche (evolutionäres Modell). Dennoch sind die genetischen Marker auch für in der Taxonomie Unerfahrene einfacher zu bewerten und einzusortieren als morphologische Merkmale. Der

Hauptgrund dafür ist, dass die genetischen Marker für alle Organismen gleich sind, während die morphologische Formenvielfalt viel größer und variabler ist.

Mit einfachen Mitteln lässt sich die Vergleichbarkeit von genetischen Daten miteinander herstellen. Die Nukleotidalignments lassen sich auf ausgewählte Genbereiche einkürzen, womit ein Informationsverlust auftritt, aber homologe Regionen verglichen werden können. Auch lassen sich durch die Auswahl von geeigneten Referenzen die eigenen Ergebnisse überprüfen (Ramos et al., 2017). In sich ist der Vergleich genetischer Daten miteinander also präzise. In der morphologischen Bestimmung kann solch ein Effekt nur durch Mikrophotographien erreicht werden, die den Bestimmungen zugeordnet sind. In der Regel werden solche Kataloge entweder nicht erstellt oder nicht veröffentlicht. Die Sequenzdaten hingegen werden meist in einer Gendatenbank (z.B. Genbank des National Center of Biotechnology Information (NCBI); <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) weltweit frei zur Verfügung gestellt. Die Verknüpfung der Sequenzdaten mit den Katalogen würde die Bestimmung von Isolaten objektiver und transparenter machen. Metaanalysen der Kataloge und Sequenzen können außerdem morphologische Variabilität in Isolaten aufzeigen.

Die Objektivität, die sehr gute Vergleichbarkeit, die Möglichkeit zur mathematischen Auswertung und Standardisierung, sowie die Universalität der Merkmale haben die genetischen Analysen zum Goldenen Standard phylogenetischer Untersuchungen werden lassen. Die Ergebnisse der genetischen Analysen sind deshalb diejenigen, denen vertraut wird. Die Identität der meisten Isolate aus der DZBK ist also *Cyanobium* sp. aus der Ordnung Synechococcales. Aufgrund der verschiedenen Ansätze zur Bestimmung *in situ* lassen sich die dominierenden Cyanobakterien ebenfalls als *Cyanobium* sp. einordnen. Die Bestimmung von Spezies der Gattung *Aphanothece* (Ordnung Chroococcales) in der DZBK anhand der Morphologie ist damit als Fehlbestimmung abgelehnt.

Viele von den gefundenen Genotypen auch der Schlei, den Jasmunder Bodden und den Gewässern aus der Tabelle 10 gehören zur Gattung *Cyanobium*. Viele der beschriebenen Morphotypen wie *Cyanodictyon*, *Cyanonephron*,

*Aphanocapsa*, *Aphanothece* und weitere können nach den Ergebnissen dieser und anderer Arbeiten ebenfalls der Gattung *Cyanobium* zugeordnet werden. Damit ist die Gattung *Cyanobium* nicht nur weltweit verbreitet, sondern auch sehr bedeutend in globalen Maßstäben. Nicht alle Monitoringergebnisse sind publiziert und weltweit verfügbar, die Zahl der Gewässer mit Picocyanobakteriendominanz oder –blüten wird entsprechend noch höher sein. Die Eutrophierung kann dazu führen, dass zusätzlich noch weitere Wasserkörper in Zukunft von diesen Picocyanobakterien dominiert werden.

### 4.4 Fehlbestimmung auf Ebene der Ordnung – Ein akademisches Problem?

Die Unterschiede in der Bestimmung der dominierenden Cyanobakterien der DZBK reichen über Ordnungen hinweg (vgl. Ergebnisse). Die Zusammensetzung der Phytoplanktongemeinschaft, insbesondere die Identität der abundantesten Organismen, wird als Marker für die ökologische Charakterisierung und zur Bewertung der Gewässergüte verwendet (Reynolds et al., 2002). Die Indikatorarten haben eine große Bedeutung, denn es werden ihnen bestimmte Eigenschaften in ökologischer Hinsicht zugeschrieben, wie Verfügbarkeit für höhere trophische Ebenen oder als Anzeiger für verfügbare Nährstoffe. Indikatorarten vereinfachen die Einordnung von Gewässern in Trophie- und Güteklassen. Das Vorkommen von Cyanobakterien wird in der Regel als negativ für die Gewässergüte eingestuft, weil sie massive Blüten und Toxine bilden können. Die Effekte für das Ökosystem sind dann besonders trübe Wassersäulen, eine Abnahme der Diversität, Absterben von Makrophyten, Schlickbildung und Sauerstoffzehrung bei Ende der Blüten. Es gibt jedoch auch Cyanobakterien, die nur in besonders klaren und reinen Gewässern zu finden sind, also eine ganz andere Indikation mit sich bringen (z.B. *Nostoc pruniforme* Mollenhauer et al., 1999).

Die Zuordnung von Organismen innerhalb der Cyanobakterien spielt demnach eine ganz wesentliche Rolle. Gene für die Stickstofffixierungsenzyme finden sich in verschiedenen phylogenetischen Linien wieder. Es gibt monophyletische Gruppen mit diesem Merkmal, diese sind aber selbst innerhalb der Ordnungen verstreut (Latysheva et al., 2012). Jedoch kommen bestimmte genetische

Eigenschaften in manchen Ordnungen häufiger oder weniger häufig vor. Die Cyanobakterien der Pico-Größenklasse ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ) verteilen sich auf die beiden Ordnungen Chroococcales und Synechococcales. Auf die Chroococcales entfallen dabei Vertreter mit mehreren verschiedenen Toxingenen wie die für Microcystine (Jasser und Callieri, 2017). Auch die Gene für die Nitrogenase sind vermehrt bei den Chroococcales zu finden, z.B. *Cyanothece* (Latysheva et al., 2012). Die Synechococcales hingegen besitzen weit weniger Vertreter mit diesen Eigenschaften, denn die Picocyanobakterien der Synechococcales umfassen die  $\alpha$ -Picocyanobakterien. Die  $\alpha$ -Picocyanobakterien haben reduzierte Genome, die keinerlei Nitrogenase-Gene und auch die meisten Toxingene nicht beinhalten (Latysheva et al., 2012; Scanlan et al., 2009).

Das Auftreten diazotropher Cyanobakterien kann große Auswirkungen auf die Stoffkreisläufe haben. So haben Larsson et al. (2001) die autochthonen Stickstoffeinträge in die Ostsee mit derselben Höhe angegeben, die durch die Zuflüsse in die Ostsee gelangen. Die Picocyanobakterien der Chroococcales können ebenfalls molekularen Stickstoff fixieren und damit eine wichtige Quelle für pflanzenverfügbare Stickstoffverbindungen sein (Singh, 1973). In der Literatur werden vorrangig die heterozytischen Cyanobakterien als Stickstoffquelle betrachtet. In den letzten Jahren ist aber auch die Bedeutung der nicht-heterozytischen Cyanobakterien für die Stickstofffixierung herausgestellt worden (Zehr, 2011). Insgesamt sind Stickstofffixierungsraten selten direkt gemessen worden, sondern oftmals die Fähigkeit zur Fixierung von Stickstoff anhand indirekter Marker (z.B. N-Ethylen-Reduktion (Bergman et al., 2006)). Die Übertragung der Laborversuche auf Gemeinschaften in der Umwelt ist dabei aber nur schwerlich möglich. Die Interaktionen verschiedener Organismengruppen, sowie die abiotischen Umweltbedingungen entsprechen *in situ* nicht den stabilen und meist optimalen Laborbedingungen. Dennoch wurden Versuche unternommen, die Stickstofffixierungsraten *in situ* zu messen (Foster et al., 2013; Krupke et al., 2013; Stal und Walsby, 1998, 2000; Taylor et al., 2010).

Stal und Walsby (1998) berechneten aus ihren Daten die Stickstofffixierungsrate in Abhängigkeit von der Chlorophyll a-Menge. Die Stickstofffixierung ist ein Prozess, der viel Energie benötigt (16 ATP und 8

Elektronen; Stal und Walsby, 2000). Die Energie stammt aus der Photosynthese und die Autoren folgerten daraus, dass die maximale Stickstofffixierungsrate an die Chlorophyllkonzentrationen gekoppelt sein muss. Natürliche Gemeinschaften bestehen stets aus einer Mischung verschiedener Organismen, wodurch sich die Chlorophyllabhängigkeit immer nur auf die Cyanobakterien beziehen kann. Die Gesamtchlorophyllwerte müssen also um andere phototrophe Phytoplankter rechnerisch bereinigt werden. Dazu sind eine Reihe verschiedenster Daten nötig. Die Gesamtchlorophyllwerte im Wasser, allgemein Zählraten und Biovolumina einzelner Organismengruppen und genauere Daten zu den Vertretern der Cyanobakterien im Speziellen, um heterozytische und sicher nicht-stickstofffixierende Cyanobakterien ausschließen zu können. Des Weiteren sind Daten zum Chlorophyllgehalt pro Zelle bzw. zur Biovolumeneinheit nötig, um relative Chlorophyllanteile für die Großgruppen (Grünalgen, Kieselalgen und Cyanobakterien) festlegen zu können. Die Zeitdauer, in der Stickstoff fixiert werden kann, sollte mehr oder weniger bekannt sein, denn die Cyanobakterien haben unterschiedliche Strategien zur Stickstofffixierungsaktivität (Berman-Frank et al., 2003). Die Tabelle 19 fasst die Daten und Berechnungen zusammen.

**Tabelle 19 Berechnung der Stickstofffixierung in der DZBK nach Ergebnissen morphologischer (mor.) und genetischer Bestimmung (gen.)**

Einflussgröße	Wert	Quelle
<b>Dunkelzeit</b>	12 h	Annahme
<b>Volumen DZBK</b>	397,1·10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup>	Selig et al., 2006
<b>Chlorophyll a-Gehalt<sub>ges</sub></b>	46 µg l <sup>-1</sup>	Albrecht et al., 2017 Anhang
<b>N-Fixierung<sub>min</sub></b>	1,48 µmol N <sub>2</sub> mg Chl a <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Stal und Walsby, 1998
<b>N-Fixierung<sub>max</sub></b>	6,48 µmol N <sub>2</sub> mg Chl a <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
<b>Anteil Chroococcales<sub>mor.</sub></b>	2,38 µg Chl a l <sup>-1</sup>	Berechnet nach Daten von Albrecht et al., 2017; Gustavs et al., 2009; Selig et al., 2006; Stal und Walsby, 1998, sowie Umrechnungen (s. Anhang)
<b>Anteil Chroococcales<sub>gen.</sub></b>	0,56 µg Chl a l <sup>-1</sup>	
<b>Pot. N<sub>2</sub>-Fix.<sub>min-max</sub> (mor.)</b>	171 – 751 t p.a.	
<b>Pot. N<sub>2</sub>-Fix.<sub>min-max</sub> (gen.)</b>	40 – 175 t p.a.	
<b>Rel. N<sub>2</sub>-Eintrag<sub>min-max</sub> (mor.)</b>	6 – 24 %	
<b>Rel. N<sub>2</sub>-Eintrag<sub>min-max</sub> (gen.)</b>	1 – 6 %	

In Summe ergeben sich autochthone potentielle Stickstoffeinträge pro Jahr von zwischen 229 und 1000 t von Picocyanobakterien. Das sind zwischen 7 und 33 % der allochthonen Einträge von ca. 3000 t p.a. (Selig et al., 2006). Die Zahlen des autochthonen Eintrags sind mit vielen Fehlern und Annahmen behaftet und stellen deshalb nur eine sehr grobe Abschätzung des Potenzials dar. Einer der wichtigsten Faktoren für die Bereitstellung der Energie, das Unterwasserlichtklima, ist in diese Berechnung nicht einbezogen worden. Die Organismen können bei Lichtlimitation, wie in der DZBK, weniger Energie für die Stickstofffixierung bereitstellen als in klareren Gewässern. Dennoch zeigen die Zahlen, dass der Beitrag, den Picocyanobakterien der Chroococcales zum Stickstoffkreislauf leisten könnten, erheblich ist. Die Bedeutung der autochthonen Stickstoffquellen für Managementstrategien wächst in dem Maße, wie die allochthonen Quellen reduziert werden. Die Identifizierung der Picocyanobakterien hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu den  $\alpha$ -Picocyanobakterien (Synechococcales) oder Chroococcales ist deshalb von großer Bedeutung. Nach den morphologischen Zählraten *in situ* waren ca. 52 % der Zellen und ca. 21 % des Biovolumens der Ordnung Chroococcales zuzuordnen. Nach der neuen Zählmethode reduzieren sich die Anteile der Chroococcales für die Abundanz auf 3,7 % und für das Biovolumen auf 4,8 %. Die potenziellen Stickstoffeinträge durch die nicht-heterozytischen Cyanobakterien liegen je nach Zählweise um das 6-fache auseinander, sodass der Einfluss von hoch (bis zu 24 % des Gesamteintrages) bis hin zu sehr gering (1 % des Gesamteintrages) schwankt. Die Identität der Picocyanobakterien für das Monitoring und Management des Phytoplanktons ist in der DZBK, aber auch darüber hinaus, bedeutend und wird durch die gängigen Monitoringprotokolle fehleingeschätzt (Caroppo, 2015).

Die Unterscheidung zwischen den Vertretern der beiden Ordnungen Chroococcales und Synechococcales ist nach morphologischen Merkmalen oftmals nicht zu treffen, deshalb werden polyphasische Ansätze benötigt (Dvořák et al., 2015). Bei gleichbleibender Phytoplanktongemeinschaft über lange Zeit ist die exakte molekulare Bestimmung einmalig zur Bestandsaufnahme nötig, danach kann mit Fingerprint-Methoden die Diversität überwacht und bei Veränderungen nochmals eine exakte Bestimmung

vorgenommen werden. Mit dieser Herangehensweise kann der Aufwand des Monitorings minimiert werden, wenn die Bestimmung der Organismen auf Artebene nicht möglich oder nötig und vielmehr die Diversität von Bedeutung ist. In allen Fällen, in denen die Quantifizierung ökologisch funktioneller Gruppen im Vordergrund steht, ist die Mikroskopie nicht durch molekulare Methoden zu ersetzen.

### 4.5 Massenvorkommen von *Cyanobium*

Insgesamt ist die Diversität des Phytoplanktons in der DZBK gering, denn es konnten nur maximal 23 verschiedene Genotypen mit dem Fingerprint T-RFLP und 27 Genotypen mit der 16S Amplicon Analysen nachgewiesen werden. Von den 7 und 11 Cyanobakterien-Genotypen der DZBK mit der 16S Amplicon-Analyse dominieren lediglich 3-4. Die Summe aller Genotypen, die mittels verschiedener genetischer Methoden nachgewiesen wurden, beläuft sich auf maximal 27 für einen Standort. Gemessen an den Zahlen, die durch morphologische Artenlisten bekannt sind (23 pro Station, Schoor et al., 2008), ist die genetische Diversität sehr gering. Für ein Ökosystem bedeutet eine große Diversität, dass das System aus verschiedenen Komponenten aufgebaut ist, die sich gegenseitig funktionell zum Teil ersetzen können. Wenn ein System wie hier nur aus wenigen Komponenten besteht, die den Großteil des Phytoplanktons ausmachen, wirken sich Störungen potenziell stärker negativ aus. Trotz der geringen Diversität ist das System DZBK in den letzten Jahren stabil geblieben, die Sukzession des Phytoplanktons war stets ähnlich und es gab nur punktuelle Veränderungen, in denen z.B. die Herbstblüte der fädigen Cyanobakterien weniger stark ausfiel.

Ein schlechtes Unterwasserlichtklima ist ein treibender Faktor für die Dominanz von Cyanobakterien, die durch ihre Phycobiliproteine die Grünlücke des Chlorophylls für die Photosynthese nutzen können. Durch die hohe Trübung im Wasser verhindern sie das Wachstum von höheren Unterwasserpflanzen, die auf das System stabilisierend wirken (Schiewer, 1997). Ebenfalls wird die Dominanz der Cyanobakterien durch geringen Fraßdruck des Mesozooplanktons begünstigt. Es ist jedoch auch beschrieben, dass das Zooplankton andere Nahrungsquellen wie Bakterien oder Grünalgen bevorzugt

(Caron et al. 1991). Boon et al. (1994) kamen auf drei hauptsächliche Eigenschaften der Cyanobakterien, die zu einem geringen Fraßdruck durch Zooplankton führen. (1) Die Größe und Form. Filamente und Kolonien können durch ihre Gesamtgröße die Größe der Fraßöffnung übersteigen und sie versperren. Auch Einzelzellen können gegebenenfalls nicht aufgenommen werden, wenn sie von einer Gallerte umgeben sind und damit ihren Durchmesser um ein Vielfaches erhöhen. (2) Die Cyanotoxine sind eine weitere Eigenschaft, die die Cyanobakterien zu einer unattraktiven Nahrungsquelle machen. Die Toxine sind evolutionär älter als die ersten Eukaryoten und potenziellen Grazer, dennoch können die gebildeten Substanzen auf andere Organismen als Gift wirken (Merel et al., 2013). (3) Ein weiterer Faktor, der öfter diskutiert wird, ist die vermeintlich schlechte Qualität der Cyanobakterien als Nahrung. Boon et al. (1994) begründen das mit der Fettsäurezusammensetzung der Cyanobakterien, die für die Zooplankter von bestimmten Fetten zu wenig besitzen, um ein kräftiges Wachstum zu fördern.

Arten der Gattung *Cyanobium* sind in der Lage Schleimhüllen um einzelne Zellen, aber auch gallertige Kolonien zu bilden, die sie vor Fraß schützen können. Außerdem werden sie, entsprechend ihrer cyanobakteriellen Natur, wahrscheinlich keine optimale Nahrung für das Zooplankton hinsichtlich der Fettsäuren darstellen. Die Dominanz von *Cyanobium* in den hier untersuchten, aber auch vielen weiteren Lagunen und Seen spricht für die erfolgreiche Vermeidung von Fraß und gute Nutzung vorhandener Nährstoffressourcen.

Die Gattung *Cyanobium* gehört zu den Picocyanobakterien, die für den Menschen wegen fehlender Toxingene wahrscheinlich keine Gefahr darstellen. Allgemein wahrgenommene negative Auswirkungen hoher Abundanzen von *Cyanobium* betreffen die sehr geringe Sichttiefe und die Schlickbildung. Die geringe Sichttiefe ist insbesondere touristisch abschreckend, denn das Wasser wirkt unrein und belastet. Auch die EU-WRRL bewertet wegen der hohen Trübung und Chlorophyll-a-Werte die Wasserqualität als schlecht. Die Massenentwicklung und das Absterben und Absinken der Biomasse von *Cyanobium* in den Bodden der DZBK, wirkt aber positiv auf die Wasserqualität der nahen Ostsee. Die Bodden wirken als somit Nährstofffilter für die Ostsee (Selig et al., 2006). Die in die DZBK eingetragenen Nährstoffe aus ihrem

Einzugsgebiet werden in Form von Biomasse aufgenommen und verbleiben größtenteils als Detritus im System der Boddenkette. Die Nährstoffbelastung des Wassers, das in die Ostsee gelangt wird dadurch deutlich verringert. Die Ostsee profitiert davon durch weniger starke küstennahe Algenblüten im Sommer und damit bessere Badewasserqualität.

Die Meeresstrategierichtlinie und Wasserrahmenrichtlinie der EU sehen eine Verbesserung der Wasserqualität in den küstennahen Gewässern bis 2021 vor. Der gute ökologische Zustand soll bis dahin erreicht sein. Deswegen und wegen des erwarteten touristischen Nutzens der DZBK, wurden verschiedene Maßnahmen vorgeschlagen (Schlungbaum et al., 1994). Der erste Schritt, die Bottom-Up-Regulierung über reduzierte Nährstoffeinträge, ist ergriffen worden. Die eingetragenen Nährstofffrachten haben sich mit Bezug auf Phosphor halbiert (Schiewer, 1997). Die Situation im Phytoplankton der DZBK hat sich damit jedoch nicht nachhaltig geändert. Dies kann mehrere Ursachen haben: zum einen diffuse Quellen, die schlecht zu untersuchen und zu messen sind, zum anderen wegen interner Quellen. Interne Quellen sind z.B. Remineralisierungsprozesse aus dem Sediment, die die dort gebundenen Nährstoffe herauslösen und wieder in den Kreislauf einbringen (Berthold, 2016). Die Regulierung ist über den großen Speicher im System schwierig.

Das Wasser der DZBK ist durch die geringe Tiefe schon bei schwachem Wind gut durchmischt und wird auch dann nicht anoxisch, wenn die Atmungsprozesse überwiegen. Toxischer Schwefelwasserstoff wird deshalb nur dann in der Wassersäule produziert, wenn die Oberfläche über mehrere Wochen mit Eis und Schnee bedeckt ist. Im Gegensatz zu tieferen Seen, die bei so großer Biomasse in der Wassersäule wie in der DZBK schnell zur Anoxie neigen, droht diese Gefahr in der DZBK nicht, außer in den Schilfgürteln in Ufernähe, die durch geringe Wasserbewegung zur Anoxie neigen (Berthold, 2016).

Die Biomasse kann wahrscheinlich langfristig durch Reduzierung der eingetragenen Nährstoffe reguliert werden. Die Cyanobakterien besitzen allerdings Mechanismen Nährstoffmangel teilweise auszugleichen. Etwa kann die DNA-Menge reduziert werden, um gebundene Stickstoff- und

Phosphorverbindungen für andere Prozesse freizusetzen. Dabei kann die Gesamtmenge an DNA im Organismus um bis zu zwei Drittel reduziert werden (Zerulla et al., 2014). Cyanobakterien schaffen es so bei Phosphat-Konzentrationen zu wachsen, die unterhalb der Bestimmungsgrenzen des Monitorings liegen (Berthold et al., 2017). Des Weiteren können Cyanobakterien Polyphosphate als P-Speicher anlegen, wenn welches verfügbar ist (Friebele et al., 1978). Bis die Cyanobakterienbiomasse in der Wassersäule zurückgeht, kann es deshalb Jahrzehnte dauern und die Trübung des Wassers noch lange erhalten bleiben. Das Monitoring ist dabei wichtiger Bestandteil zur Dokumentation von Veränderungen in der Biomassezusammensetzung. Sollten sich im Verlauf der Zeit Änderungen des Phytoplanktons hin zu toxischen Arten ergeben, können entsprechende Warnungen weitergegeben werden.

Die hohe Biomasse an Cyanobakterien ist insgesamt also eher ein ästhetisches und ökonomisches Problem für den Menschen als eine Bedrohung für das Ökosystem selbst. Das gilt insbesondere, weil *Cyanobium* höchstwahrscheinlich keine Toxine bildet, die Tieren und Menschen schaden könnten (Scanlan et al., 2009).

### 4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass das Phytoplankton der Darß-Zingster Boddenkette genetisch wenig divers ist und eher einer dauerhaften Blütensituation entspricht, die von nur wenigen Arten dominiert wird. Die abundanteste Gattung konnte über Isolate und *in situ*-Methoden genetisch als *Cyanobium* sp. identifiziert werden, die zu den  $\alpha$ -Picocyanobakterien gehören. Die genetische Identität der abundantesten Gattung legte ein geringes Potenzial der dominierenden Cyanobakterien zur Toxinproduktion und Stickstofffixierung nahe. Die Ergebnisse dieser Arbeit und Literaturdaten deuten auf eine Dominanz von *Cyanobium* in brackigen und eutrophen Gewässern weltweit hin. Des Weiteren konnten verschiedene genetische Methoden mit den Monitoringzählraten und der Morphologie *in vitro* indirekt verknüpft werden. Die Diskrepanz zwischen beiden Ansätzen wurde ausführlich dokumentiert und legt eine Fehlbestimmung anhand der Morphologie auf Ordnungsebene nahe.

Die direkte Verknüpfung der *in situ*-Morphologie mit der Genetik steht noch aus. Jedoch ist mit der FisH-Sonde, die zumindest an dem Isolat teilweise funktioniert hat, ein erster Schritt in diese Richtung geschafft. Die Bedingungen für die Methode müssen noch weiter getestet und verbessert werden, um die Sonde in die Anwendung an Umweltproben zu bringen.

Die Analyse der Cyanobakteriengemeinschaft mittels 16S Amplicon-Sequenzierung sollte mit anderen Primern wiederholt werden, um unsichere Zuordnungen zu Gattungen zu vermeiden. Die Abdeckung der Primer und Wiederfindungsraten müssen mit standortspezifischen künstlichen Gemeinschaften (DNA-Gemische; Mock-Gemeinschaften) bestimmt werden. Außerdem sollten weitere Parameter wie der Schwellenwert für die Abgrenzung von OTUs überprüft werden.

Die T-RFLP kann zukünftig das Monitoring unterstützen und besonders auffällige Verschiebungen in der Diversität anzeigen. Auffälligkeiten könnten dann gezielt untersucht und auf Risikopotenziale hin überprüft werden. Da aber Toxine wegen ihrer Vielfalt schlecht quantifiziert werden können, liegt die Zukunft in den Meta-omischen Methoden (Metagenomik, Metatranskriptomik). Neben der derzeit noch recht hohen Kosten, müssten anwenderfreundliche Standard-Software-Programme entwickelt werden, um die Daten und Methoden dem Monitoring zugänglich zu machen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abdo, Z., Schüette, U. M. E., Bent, S. J., Williams, C. J., Forney, L. J., and Joyce, P. (2006). Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environ. Microbiol.* 8, 929–938. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00959.x.
- Akaike, H. (1981). Likelihood of a model and information criteria. *J. Econom.* 16, 3–14. doi:10.1016/0304-4076(81)90071-3.
- Albrecht, M. (2013). Diversität von Cyanobakterien der Darß-Zingster Boddenkette.
- Albrecht, M., Pröschild, T., and Schumann, R. (2017). Identification of Cyanobacteria in a Eutrophic Coastal Lagoon on the Southern Baltic Coast. *Front. Microbiol.* 8, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2017.00923.
- Baudler, H. (2004). Der Salzgehalt und N-Nährstoffhaushalt in der Darß Zingster Boddenkette. *Rostocker Meeresbiologische Beiträge* 13, 241–246.
- Bergman, B., Gallon, J. ., Rai, A. ., and Stal, L. . (2006). N<sub>2</sub> Fixation by non-heterocystous cyanobacteria1. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 139–185. doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00296.x.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., and Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 154, 157–164. doi:10.1016/S0923-2508(03)00029-9.
- Berthold, M. (2016). The influence of phosphorus on the eutrophication process in the Darß-Zingst Bodden chain.
- Berthold, M., Karsten, U., von Weber, M., Bachor, A., and Schumann, R. (2017). Phytoplankton can bypass nutrient reductions in eutrophic coastal water bodies. *Ambio* in press. doi:DOI: 10.1007/s13280-017-0980-0.
- Boon, P. I., Bunn, S. E., Green, J. D., and Shiel, R. J. (1994). Consumption of cyanobacteria by freshwater zooplankton: Implications for the success of “top-down” control of cyanobacterial blooms in australia. *Mar. Freshw. Res.* 45, 875–887. doi:10.1071/MF9940875.
- Callieri, C. (2007). Picophytoplankton in freshwater ecosystems : the importance of small-sized phototrophs. *Freshw. Rev.* 1, 1–28. doi:10.1608/FRJ-1.1.1.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat. Publ. Gr.* 7, 335–336. doi:10.1038/nmeth0510-335.

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624. doi:10.1038/ismej.2012.8.
- Caron, D. A., Ee Lin Lim, Miceli, G., Waterbury, J. B., and Valois, F. W. (1991). Grazing and utilization of chroococcoid cyanobacteria and heterotrophic bacteria by protozoa in laboratory cultures and a coastal plankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76, 205–217. doi:10.3354/meps076205.
- Caroppo, C. (2015). Ecology and biodiversity of picoplanktonic cyanobacteria in coastal and brackish environments. *Biodivers. Conserv.*, 949–971. doi:10.1007/s10531-015-0891-y.
- Catherine, A., Maloufi, S., Congresti, R., Viaggiu, E., and Pilkaitytė, R. (2017). “SOP1 Cyanobacterial Samples: Preservation, Enumeration, and Biovolume Measurements,” in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, eds. J. Meriluoto, L. Spoof, and G. a. Codd (John Wiley & Sons Ltd.), 315–330.
- Celepli, N., Sundh, J., Ekman, M., Dupont, C. L., and Yooseph, S. (2017). Title : Meta-omic analyses of Baltic Sea cyanobacteria : diversity , community structure and salt acclimation. 19, 1–30. doi:10.1111/1462-2920.
- Çelik, K., and Ongu Sevindik, T. (2015). The phytoplankton functional group concept provides a reliable basis forecological status estimation in the Çaygören Reservoir (Turkey). *Turk. J. Botany* 39, 588–598. doi:10.3906/bot-1402-69.
- Chisholm, S. W., Frankel, S. L., Goericke, R., Olson, R. J., Palenik, B., Waterbury, J. B., et al. (1992). Prochlorococcus marinus nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll a and b. *Arch. Microbiol.* 157, 297–300. doi:10.1007/BF00245165.
- Codd, G. a., Meriluoto, J., and Metcalf, J. S. (2017). “Introduction: Cyanobacteria, Cyanotoxins, Thier Human Impact, and Risk Management,” in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, eds. J. Meriluoto, L. Spoof, and G. a. Codd (John Wiley & Sons Ltd.), 3–8.
- Cohn, F. (1853). *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der mikroskopischen Algen und Pilze*. Nova Acta Acad. Caes. Leop. Carol. Nat. Cur.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., et al. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42, 633–642. doi:10.1093/nar/gkt1244.
- Courtney, K. C., Bainard, L. D., Sikes, B. A., Koch, A. M., Maherali, H., Klironomos, J. N., et al. (2012). Determining a minimum detection threshold in terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Microbiol. Methods* 88, 14–18. doi:10.1016/j.mimet.2011.09.016.

- Dagan, T., and Martin, W. (2007). Ancestral genome sizes specify the minimum rate of lateral gene transfer during prokaryote evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 870–875. doi:10.1073/pnas.0606318104.
- De La Fuente, G., Belanche, A., Girwood, S. E., Pinloche, E., Wilkinson, T., and Newbold, C. J. (2014). Pros and cons of ion-torrent next generation sequencing versus terminal restriction fragment length polymorphism T-RFLP for studying the rumen bacterial community. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0101435.
- Doolittle, W. F., and Zhaxybayeva, O. (2009). On the origin of prokaryotic species. *Genome Res.* 19, 744–756. doi:10.1101/gr.086645.108.
- Dvořák, P., Poulíčková, A., Hašler, P., Belli, M., Casamatta, D. a., and Papini, A. (2015). Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodivers. Conserv.*, 739–757. doi:10.1007/s10531-015-0888-6.
- Echlin, P., and Morris, I. (1965). The Relationship Between Blue-Green Algae and Bacteria. *Biol. Rev.* 40, 143–184. doi:10.1111/j.1469-185X.1965.tb00800.x.
- Ernst, A., Becker, S., Wollenzien, U. I. A., and Postius, C. (2003). Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology* 149, 217–228. doi:10.1099/mic.0.25475-0.
- Espino, L., De, G., Durand, A., Ruiz, M., Luis, J., Pulido, H., et al. (2008). Análisis químico-biológico para determinar el estatu trófico de la Laguna de Tres Palos , Guerrero , Méxic Chemical-biological analysis to determine the trophi status of Tres Palos Lagoon , Guerrero , Mexic.
- Feibicke, M. (1994). Strukturelle und funktionelle Studien zum Phytoplankton und Zooplankton in einer hypertrophen Brackwasserförde (Innere Schlei, Westliche Ostsee).
- Fenchel, T., and Finlay, B. J. (2006). The diversity of microbes: resurgence of the phenotype. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1965–1973. doi:10.1098/rstb.2006.1924.
- Foster, R. a., Szejnrenszus, S., and Kuypers, M. M. M. (2013). Measuring carbon and N<sub>2</sub> fixation in field populations of colonial and free-living unicellular cyanobacteria using nanometer-scale secondary ion mass spectrometry1. *J. Phycol.* 49, 502–516. doi:10.1111/jpy.12057.
- Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., et al. (1980). The Phylogeny of Prokaryotes. *Science (80- )*. 209, 457–463.
- Friebele, E. S., Correll, D. L., and Faust, M. A. (1978). Relationship between phytoplankton cell size and the rate of orthophosphate uptake: in situ observations of an estuarine population. *Mar. Biol.* 45, 39–52. doi:10.1007/BF00388976.

- Geiß, U., Selig, U., Schumann, R., Steinbruch, R., Bastrop, R., Hagemann, M., et al. (2004). Investigations on cyanobacterial diversity in a shallow estuary (Southern Baltic Sea) including genes relevant to salinity resistance and iron starvation acclimation. *Environ. Microbiol.* 6, 377–387. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00569.x.
- Geitler, L. (1932). *Dr. L. Rabenhorsts Kryptogamenflora 14. Teil Die Algen - Cyanophyceae*. 2. Auflage. , ed. R. Kolkwitz Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft mbH Leipzig.
- Ghai, R., Hernandez, C. M., Picazo, A., Mizuno, C. M., Ininbergs, K., Diez, B., et al. (2012). Metagenomes of Mediterranean coastal lagoons. *Sci Rep* 2, 490. doi:10.1038/srep00490.
- Guiry, M. D., and Guiry, G. M. (2016). AlgaeBase. World-wide Electronic Publication, National University of Ireland. <http://www.algaebase.org>.
- Gustavs, L., Schumann, R., Eggert, A., and Karsten, U. (2009). In vivo growth fluorometry: accuracy and limits of microalgal growth rate measurements in ecophysiological investigations. *Aquat. Microb. Ecol.* 55, 95–104. doi:10.3354/ame01291.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98. doi:citeulike-article-id:691774.
- Hanage, W. P. (2013). Fuzzy species revisited. *BMC Biol.* 11, 41. doi:10.1186/1741-7007-11-41.
- Haverkamp, T. H. a, Schouten, D., Doeleman, M., Wollenzien, U., Huisman, J., and Stal, L. J. (2009). Colorful microdiversity of Synechococcus strains (picocyanobacteria) isolated from the Baltic Sea. *ISME J.* 3, 397–408. doi:10.1038/ismej.2008.118.
- HELCOM (1988). Guidelines for the Baltic monitoring programme for the third stage. Part D. *Balt. Sea Environ. Proc.*, 161.
- Hess, W. R., Rocap, G., Ting, C. S., and Chisholm, S. W. (2001). The photosynthetic apparatus of *Prochlorococcus*: Insights through comparative genomics. *Photosynth. Res.* 70, 53–71.
- Huber, P., Diovisalvi, N., Ferraro, M., Metz, S., Lagomarsino, L., Llames, M. E., et al. (2017). Phenotypic plasticity in freshwater picocyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 19, 1120–1133. doi:10.1111/1462-2920.13638.
- Huelsenbeck, J. P., and Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755. doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- Iachetti, C. M., and Llames, M. E. (2015). Light limitation helps stabilize the phytoplankton assemblage steady-state in a temperate and highly turbid, hypertrophic shallow lake (Laguna Chascomús, Argentina). *Hydrobiologia*, 33–46. doi:10.1007/s10750-014-2045-8.

- Jasser, I., and Callieri, C. (2017). "3. Picocyanobacteria: The Smallest Cell-Size Cyanobacteria," in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, eds. J. Meriluoto, L. Spoof, and G. a. Codd (John Wiley & Sons Ltd.), 11–17.
- Jezberová, J., and Komárková, J. (2007a). Morphological transformation in a freshwater Cyanobium sp. induced by grazers. *Environ. Microbiol.* 9, 1858–1862. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01311.x.
- Jezberová, J., and Komárková, J. (2007b). Morphometry and growth of three Synechococcus-like picoplanktic cyanobacteria at different culture conditions. *Hydrobiologia* 578, 17–27. doi:10.1007/s10750-006-0429-0.
- Kell, V. (1973). Kurzzeitige Veränderungen des Phytoplanktonvolumens Ende Mai/ Anfang Juni 1972 in den Darßer Boddengewässern (südliche Ostsee). *Wissenschaftliche Zeitschrift der Univ. Rostock* 22, 1105–1110.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–11. doi:10.1093/nar/gks808.
- Klinkenberg, G., and Schumann, R. (1995). Abundance changes of autotrophic and heterotrophic picoplankton in the Zingster Strom, a shallow, tideless estuary south of the Darß-Zingst Peninsula (Southern Baltic Sea). *Arch. für Hydrobiol.* 134, 359–377.
- Komárek, J. (2016). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *Eur. J. Phycol.* 51, 346–353. doi:10.1080/09670262.2016.1163738.
- Komárek, J. (2013). *Cyanoprokaryota 3. Teil Heterocystous Genera*. In Büdel, B., G. Gärtner, L. Krienitz & M. Schagerl (eds), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. , eds. B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz, and M. Schagerl Spektrum Akademischer Verlag.
- Komárek, J., and Anagnostidis, K. (1989). Modern Approach to the classification system of Cyanophytes, 4–Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 56, 247–345.
- Komárek, J., and Anagnostidis, K. (1999). *Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales*. In Ettl, H., G. Gärtner, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. , eds. H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig, and D. Mollenhauer Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm.
- Komárek, J., and Anagnostidis, K. (2005). *Cyanoprokaryota 2. Teil Oscillatoriales*. In Büdel, B., G. Gärtner, L. Krienitz & M. Schagerl (eds), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. , eds. B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz, and M. Schagerl Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm.
- Komárek, J., Kastovsky, J., Mares, J., and Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86, 295–335.

- Komárek, J., Zapomélova, E., and Hindák, F. (2010). *Cronbergia* gen. nov., a new cyanobacterial genus (Cyanophyta) with a special strategy of heterocyte formation. *Cryptogam. Algal.* 31, 321–341.
- Komárková-Legnerová, J., and Cronberg, G. (1994). komarkovalegnerova1994.pdf. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* 72, 13–51.
- Kononen, K., Kuparinen, J., Mäkelä, K., Laanemets, J., Pavelson, J., and Nömmann, S. (1996). Initiation of cyanobacterial blooms in a frontal region at the entrance to the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr.* 41, 98–112. doi:10.4319/lo.1996.41.1.0098.
- Krupke, A., Musat, N., LaRoche, J., Mohr, W., Fuchs, B. M., Amann, R. I., et al. (2013). In situ identification and N<sub>2</sub> and C fixation rates of uncultivated cyanobacteria populations. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 259–271. doi:10.1016/j.syapm.2013.02.002.
- Kuosa, H. (1991). Picoplanktonic algae in the northern Baltic Sea: seasonal dynamics and flagellate grazing. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 73, 269–276. doi:10.3354/meps073269.
- Larsson, U., Hajdu, S., Walve, J., and Elmgren, R. (2001). Baltic Sea nitrogen fixation estimated from the summer increase in upper mixed layer total nitrogen. *Limnol. Oceanogr.* 46, 811–820. doi:10.4319/lo.2001.46.4.0811.
- Latysheva, N., Junker, V. L., Palmer, W. J., Codd, G. A., and Barker, D. (2012). The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Bioinformatics* 28, 603–606. doi:10.1093/bioinformatics/bts008.
- López-Archilla, A. I., Moreira, D., López-García, P., and Guerrero, C. (2004). Phytoplankton diversity and cyanobacterial dominance in a hypereutrophic shallow lake with biologically produced alkaline pH. *Extremophiles* 8, 109–115. doi:10.1007/s00792-003-0369-9.
- Marin, B., Nowack, E. C. M., and Melkonian, M. (2005). A plastid in the making: Evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* 156, 425–432. doi:10.1016/j.protis.2005.09.001.
- McNeill, J., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D. L., et al. (2012). International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourn Code). *Int. Assoc. Plant Taxon.*
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., and Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Int.* 59, 303–327. doi:10.1016/j.envint.2013.06.013.
- Metcalf, J. S., and Codd, G. a. (2012). “Cyanotoxins,” in *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, ed. B. A. (ed) Whitton (Springer Netherlands), 651–675.
- Mollenhauer, D., Bengtsson, R., and Lindstrøm, E. A. (1999). Macroscopic cyanobacteria of the genus nostoc: A neglected and endangered constituent of european inland aquatic biodiversity. *Eur. J. Phycol.* 34, 349–360. doi:10.1080/09670269910001736412.

- Moter, A., and Göbel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41, 85–112. doi:10.1016/S0167-7012(00)00152-4.
- Nasev, D., Nasev, S., and Guiard, V. (1978). Einige Aspekte der qualitativen Untersuchungen am Phytoplankton in den Boddengewässern des Darß und des Zingst (südliche Ostsee). *Wissenschaftliche Zeitschrift der Univ. Rostock* 27, 345–348.
- Nawrocka, L., and Kobos, J. (2011). The trophic state of the Vistula Lagoon: An assessment based on selected biotic and abiotic parameters according to the Water Framework Directive. *Oceanologia* 53, 881–894. doi:10.5697/oc.53-3.881.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., and Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3327–3332.
- Oren, A. (2011). Naming Cyanophyta/Cyanobacteria - A bacteriologist's view. *Fottea* 11, 9–16.
- Oren, A., and Garrity, G. M. (2014). Proposal to change General Consideration 5 and Principle 2 of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 309–310. doi:10.1099/ijs.0.059568-0.
- Osorio-Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Miscoe, L. H., Kováčik, L., Martin, M. P., et al. (2014). Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *Eur. J. Phycol.* 49, 450–470. doi:10.1080/09670262.2014.976843.
- Paldavičiene, A., Mazur-Marzec, H., and Razinkovas, A. (2009). Toxic cyanobacteria blooms in the Lithuanian part of the Curonian Lagoon. *Oceanologia* 51, 203–216. doi:10.5697/oc.51-2.203.
- Palinska, K. a., Liesack, W., Rhiel, E., and Krumbein, W. E. (1996). Phenotype variability of identical genotypes: The need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on Merismopedia-like isolates. *Arch. Microbiol.* 166, 224–233. doi:10.1007/s002030050378.
- Palinska, K. a., and Surosz, W. (2014). Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. *Hydrobiologia* 740, 1–11. doi:10.1007/s10750-014-1971-9.
- Pankow, H. (1976). Taxonomische Bemerkungen zu einigen Algen aus den Boddengewässern des Darß und des Zingst (südliche Ostsee) II. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Wilhelm-Pieck-Universität Rostock* 25, 255–262.
- Pankow, H. (1990). *Ostsee Algenflora*. Jena: G. Fischer.
- Pankow, H., and Martens, B. (1973). Die Beziehungen der Kleinalgenflora der Darßer Boddenkette (südliche Ostsee) zur Qualität dieser Gewässer. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Univ. Rostock* 22, 1148–1153.

- Parker, C. T., Tindall, B. J., and Garrity, G. M. (2015). International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 159. doi:10.1099/ijsem.0.000778.
- Perkerson, R. B., Johansen, J. R., Kováčik, L., Brand, J., Kaštovský, J., and Casamatta, D. a. (2011). A unique pseudanabaenalean (cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *J. Phycol.* 47, 1397–1412. doi:10.1111/j.1529-8817.2011.01077.x.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Amann, R. (2002). Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3094–3101. doi:10.1128/AEM.68.6.3094.
- Pilkaityte, R. (2007). Spring-summer transition in the curonian lagoon (se baltic sea) phytoplankton community. *Transitional Waters Bull.* 1, 39–47. doi:10.1285/i1825229Xv1n1p39.
- Pilloni, G., Granitsiotis, M. S., Engel, M., and Lueders, T. (2012). Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: Reproducibility, quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0040467.
- Pinevich, A. V. (2015). Proposal to consistently apply the international Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP) to names of the oxygenic photosynthetic bacteria (cyanobacteria), including those validly published under the international Code of Botanical Nomenclature (ICBN)/I. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1070–1074. doi:10.1099/ijms.0.000034.
- Postius, C., and Ernst, A. (1999). Mechanisms of dominance: Coexistence of picocyanobacterial genotypes in a freshwater ecosystem. *Arch. Microbiol.* 172, 69–75. doi:10.1007/s002030050742.
- Qiu, X., Wang, H., Liu, D., Gong, L., Wu, X., and Xiang, X. (2012). to Salinity: A Potential Biomarker for Ancient Salinity in Evaporative Environments. *Geomicrobiol. J.* 29, 477–483. doi:10.1080/01490451.2011.581331.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. doi:10.1093/nar/gks1219.
- Ramos, V., Morais, J., and Vasconcelos, V. M. (2017). A curated database of cyanobacterial strains relevant for modern taxonomy and phylogenetic studies. *Sci. Data* 4, 170054. doi:10.1038/sdata.2017.54.
- Raven, J. A. (1998). The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: The picophytoplankton. *Funct. Ecol.* 12, 503–513. doi:10.1046/j.1365-2435.1998.00233.x.
- Řeháková, K., Johansen, J. R., Bowen, M. B., Martin, M. P., and Sheil, C. A. (2014). Variation in secondary structure of the 16s rRNA molecule in cyanobacteria with implications for phylogenetic analysis. *Fottea* 14, 161–178. doi:10.5507/fot.2014.013.

- Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., and Melo, S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankt. ...* 24, 417–428. doi:10.1093/plankt/24.5.417.
- Robertson, B. R., Tezuka, N., and Watanabe, M. M. (2001). Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 861–871. doi:10.1099/00207713-51-3-861.
- Rohwer, F., and Thurber, R. V. (2009). Viruses manipulate the marine environment. *Nature* 459, 207–212. doi:10.1038/nature08060.
- Sassenhagen, I. (2010). Isolierung, Kultivierung und Taxonomie filamentöser Cyanobakterien der Darß-Zingster Boddenkette.
- Scanlan, D. J., Ostrowski, M., Mazard, S., Dufresne, a, Garczarek, L., Hess, W. R., et al. (2009). Ecological genomics of marine picocyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 249–299. doi:10.1128/MMBR.00035-08.
- Schapira, M., Buscot, M.-J., Pollet, T., Leterme, S. C., and Seuront, L. (2010). Distribution of picophytoplankton communities from brackish to hypersaline waters in a South Australian coastal lagoon. *Saline Systems* 6, 2. doi:10.1186/1746-1448-6-2.
- Schiewer, U. (1997). 30 years' eutrophication in shallow brackish waters - Lessons to be learned. *Hydrobiologia* 363, 73–79. doi:10.1023/A:1003194226294.
- Schindler, D. W. (1978). Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters. *Limnol. Oceanogr.* 23, 478–486. doi:10.4319/lo.1978.23.3.0478.
- Schlie, C. (2009). Morphologische und Molekulare Taxonomie des chroococcalen Cyanobakterioplanktons der Darß Zingster Boddenkette.
- Schlunbaum, G., Schiewer, U., and Arndt, E. A. (1994). Sanierung und Bewirtschaftung der Darß-Zingster Boddengewässer als Teil der Küstengewässer Mecklenburg-Vorpommerns. *Rostocker Meeresbiologische Beiträge* 2.
- Schoor, A., Selig, U., Geiß-Brunschweiler, U., Schaible, R., Schumann, R., Schubert, B., et al. (2008). Phytoplankton diversity and photosynthetic acclimation along a longitudinal transect through a shallow estuary in summer. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 364, 31–46. doi:10.3354/meps07452.
- Schumann, R., Baudler, H., Glass, Ä., Dümcke, K., and Karsten, U. (2006). Long-term observations on salinity dynamics in a tideless shallow coastal lagoon of the Southern Baltic Sea coast and their biological relevance. *J. Mar. Syst.* 60, 330–344. doi:10.1016/j.jmarsys.2006.02.007.

- Schumann, R., Görs, M., Hansen, A., Warkentin, M. und Schlie, Carolin (2009). Das Phytoplankton in hoch eutrophen Gewässern des Typs B1 und B2a der Mecklenburg-Vorpommerschen Küste: Erfassung von Artenspektrum und Abundanz im Trophiegradienten der Darß-Zingster Boddenkette und ähnlicher innerer Küstengewässer der südlichen Ostsee. Bericht für das Landesamt für Umwelt Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern.
- Schumann, R., Hammer, A., Görs, S., and Schubert, H. (2005). Winter and spring phytoplankton composition and production in a shallow eutrophic Baltic lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 62, 169–181. doi:10.1016/j.ecss.2004.08.015.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the Dimension of a Model. *Ann. Stat.* 6, 461–464. doi:10.1214/aos/1176344136.
- Selig, U., Baudler, H., Krech, M., and Nausch, G. (2006). Nutrient accumulation and nutrient retention in coastal waters - 30 years investigation in the Darss-Zingst Bodden chain. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 34, 9–19. doi:10.1002/aheh.200500616.
- Shih, P. M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E., et al. (2013). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 1053–1058. doi:10.1073/pnas.1217107110.
- Singh, P. K. (1973). Nitrogen Fixation by the Unicellular Blue-Green Alga *Aphanothece*. 62, 59–62.
- Siokou-Frangou, I., Christaki, U., Mazzocchi, M. G., Montresor, M., Ribera D'Alcala, M., Vaque, D., et al. (2010). Plankton in the open mediterranean Sea: A review. *Biogeosciences* 7, 1543–1586. doi:10.5194/bg-7-1543-2010.
- Smith, V. H. (1986). Light and Nutrient Effects on the Relative Biomass of Blue-Green Algae in Lake Phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 148–153. doi:10.1139/f86-016.
- Sorokin, P. Y., Sorokin, Y. I., Boscolo, R., and Giovanardi, O. (2004). Bloom of picocyanobacteria in the Venice lagoon during summer-autumn 2001: Ecological sequences. *Hydrobiologia* 523, 71–85. doi:10.1023/B:HYDR.0000033096.14267.43.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. a D., Ka, P., Maiden, M. C. J., et al. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 1043–1047. doi:10.1099/ijs.0.02360-0.02360.
- Stal, L. J., and Walsby, A. E. (1998). The daily integral of nitrogen fixation by planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. *New Phytol.* 139, 665–671. doi:10.1046/j.1469-8137.1998.00228.x.
- Stal, L., and Walsby, A. (2000). Photosynthesis and nitrogen fixation in a cyanobacterial bloom in the Baltic Sea. *Eur. J. Phycol.* 35, 97–108. doi:10.1080/09670260010001735681.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Taylor, P., Stal, L., and Walsby, A. (2010). Photosynthesis and nitrogen fixation in a cyanobacterial bloom in the Baltic Sea. *Photosynthesis and nitrogen fixation in a cyanobacterial bloom in the Baltic Sea.* 37–41. doi:10.1080/09670260010001735681.
- The Greengenes Database Available at:  
<http://greengenes.secondgenome.com/>.
- Torgan, L., Pillar, V., and Niencheski, L. (2006). Phytoplankton associations of a coastal lagoon in south of Brazil. *J. Coast. Res.* 2004, 1149–1151.
- Urbach, E., Robertson, D. L., and Chisholm, S. W. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* 355, 267–270. doi:10.1038/355267a0.
- Wasmund, N. (1997). Occurrence of Cyanobacterial Blooms in the Baltic Sea in relation to environmental conditions. *Int. Rev. der gesamten Hydrobiol. und Hydrogr.* 82, 169–184. doi:10.1002/iroh.19970820205.
- Wasmund, N., and Schiewer, U. (1994). Überblick zur Ökologie und Produktionsbiologie des Phytoplanktons der Darß-Zingster Boddenkette (südliche Ostsee). *Rostocker Meeresbiologische ... 2*, 41–60. Available at: [http://www.biologie.uni-rostock.de/oekologie/literature/RMB/Heft\\_02/RMB-02-Wasmund-Schiewer-041.pdf](http://www.biologie.uni-rostock.de/oekologie/literature/RMB/Heft_02/RMB-02-Wasmund-Schiewer-041.pdf).
- Water Framework Directive (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.
- Whitton, B. A. (1969). The taxonomy of blue-green algae. *Br. Phycol. J.* 4, 121–123. doi:10.1080/00071616900650111.
- Whitton, B. A. (ed) (2012). *Ecology of Cyanobacteria. II Their Diversity in Space and Time.* 1st ed. , ed. B. A. Whitton Dordrecht: Springer Netherlands doi:10.1007/978-94-007-3855-3.
- Willame, R., Boutte, C., Grubisic, S., Wilmotte, A., Komárek, J., and Hoffmann, L. (2006). Morphological and Molecular Characterization of Planktonic Cyanobacteria From Belgium and Luxembourg. *J. Phycol.* 42, 1312–1332. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00284.x.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G., and Wachter, R. (1993). Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium chlorogloeopsis HTF (“mastigocladus laminosus HTF”) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Lett.* 317, 96–100. doi:10.1016/0014-5793(93)81499-P.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271. doi:10.1139/m88-093.

- Yilmaz, L. S., Parnerkar, S., and Noguera, D. R. (2011). MathFISH, a web tool that uses thermodynamics-based mathematical models for in silico evaluation of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1118–1122. doi:10.1128/AEM.01733-10.
- Zehr, J. P. (2011). Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends Microbiol.* 19, 162–173. doi:10.1016/j.tim.2010.12.004.
- Zerulla, K., Chimileski, S., Nather, D., Gophna, U., Papke, R. T., and Soppa, J. (2014). DNA as a phosphate storage polymer and the alternative advantages of polyploidy for growth or survival. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0094819.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415. doi:10.1093/nar/gkg595.

i. Anhänge

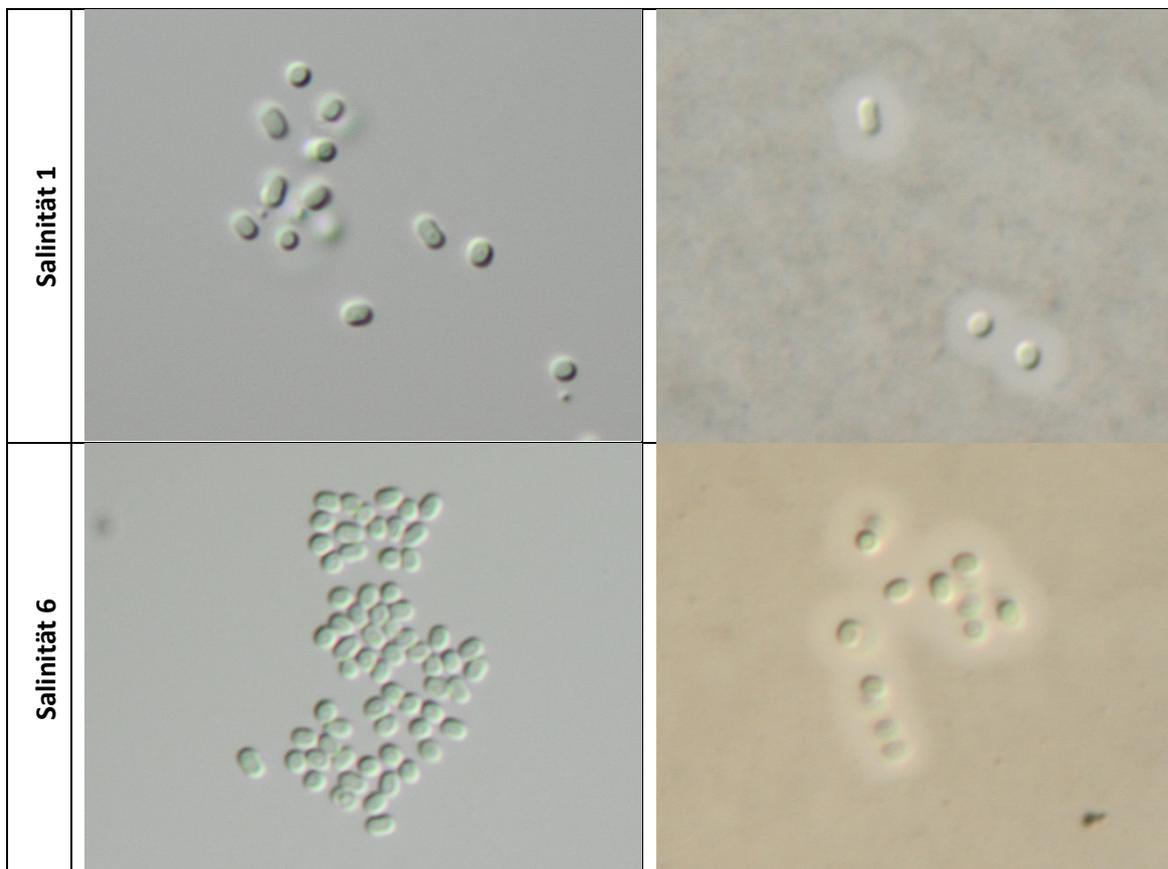
A. Wachstum und Morphologie bei unterschiedlichen Salinitäten

Die Kulturen wurden fünf Tage unter den Experimentbedingungen vorinkubiert und dann für 10 Tage im Experiment beobachtet. Die Kulturen wurden nach 10 Tagen auf ihr Wachstum hin (nur qualitativ) überprüft und Mikrophotographien der Kulturen am Ende des Experiments angefertigt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

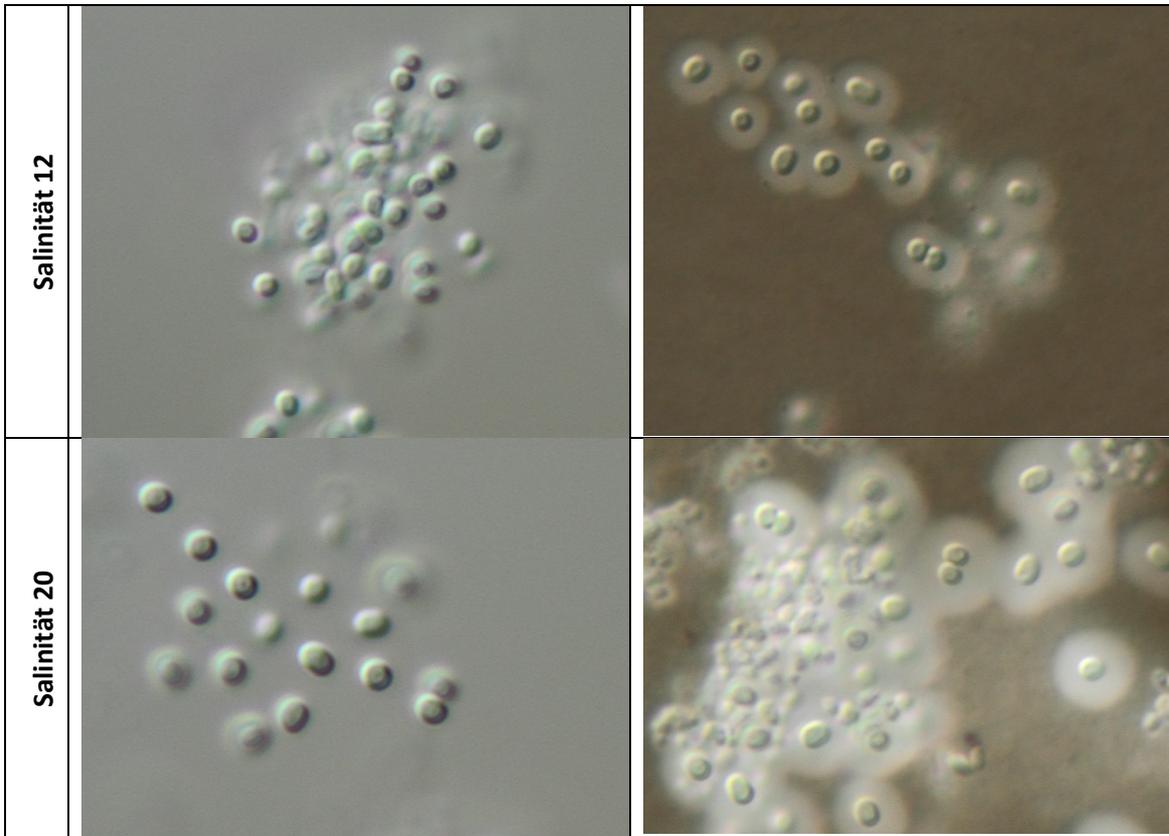
Tabelle A1 Wachstums bei verschiedenen Salinitäten (x = Wachstum vorhanden)

Stamm	Salinität					
	1	3	6	12	20	33
CZS	X	X	X	X	X	
CZS 22C	X	X	X	X	X	
CZS 45I	X	X	X	X		
SAG 3.81	X	X	X			

Tabelle A2 Morphologie bei verschiedenen Salinitäten: Beispiel CZS 48M; rechts: mit Tinte gefärbt



Fortsetzung Tabelle A2 Morphologie bei verschiedenen Salinitäten: Beispiel CZS 48M; rechts: mit Tinte gefärbt



## B. Berechnung Chlorophyllanteile für Stickstofffixierungsraten

Tabelle A3 Referenzwerte Berechnung Chlorophyllanteile (Chlorophyllgehalt aus Gustavs et al., 2009)

Organismus	Chl a Biovol <sup>-1</sup>	Chl a Biovol <sup>-1</sup> normiert
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	1,182 fg Chl a (µm <sup>3</sup> Biovol) <sup>-1</sup>	1
<i>Desmodesmus</i> <i>subspicatus</i> DZBK33	14,172 fg Chl a (µm <sup>3</sup> Biovol) <sup>-1</sup>	11,99
<i>Nitzschia</i> cf. <i>aurariae</i> KD03	19,405 fg Chl a (µm <sup>3</sup> Biovol) <sup>-1</sup>	16,42

Tabelle A4 Anteile an Chlorophyll aufgeschlüsselt nach Gruppen

Gruppe	Anteil Abundanz	Anteil Biovolumen	Anteil Chl a	Absolutwerte Chl a DZBK
Cyanobakterien	98,5 %	76,00 %	19,07 %	8,8 µg l <sup>-1</sup>
Chroococcales <sub>alt</sub>	51,8 %	20,52 %	5,15 %	2,38 µg l <sup>-1</sup>
Chroococcales <sub>neu</sub>	3,7 %	4,81 %	0,92 %	0,56 µg l <sup>-1</sup>
Chlorophyta	1,3 %	9,24 %	27,8 %	12,8 µg l <sup>-1</sup>
Bacillariophyta	0,14 %	12,9 %	53,14 %	24,4 µg l <sup>-1</sup>

### C. mathFisH-Analyse

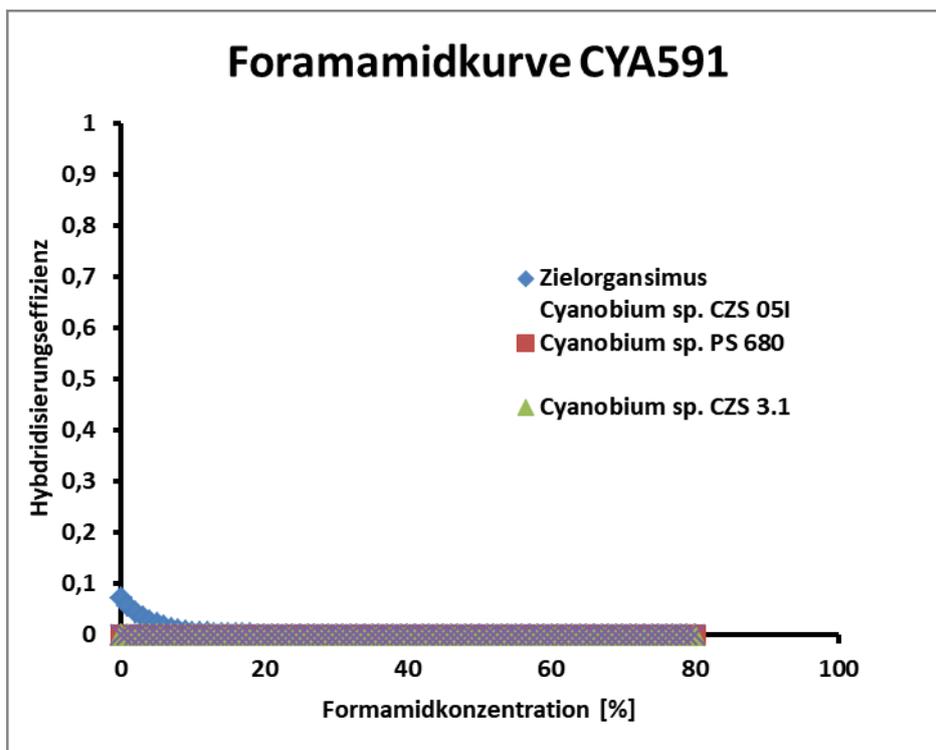


Abbildung A1 Formamidkonzentrationskurve und Hybridisierungseffizienz für die Sonde CYA591 ohne Helfer bei 46 °C

D. 16S Amplicon-Analysen

Tabelle A6 Probenbezeichnung der Amplicon-Proben 2016

	April	Oktober
Schlei	w128	w134
Kl. Jasmunder	w129	w135
Gr. Jasmunder	w130	w136
Zingster Strom	w131	w137

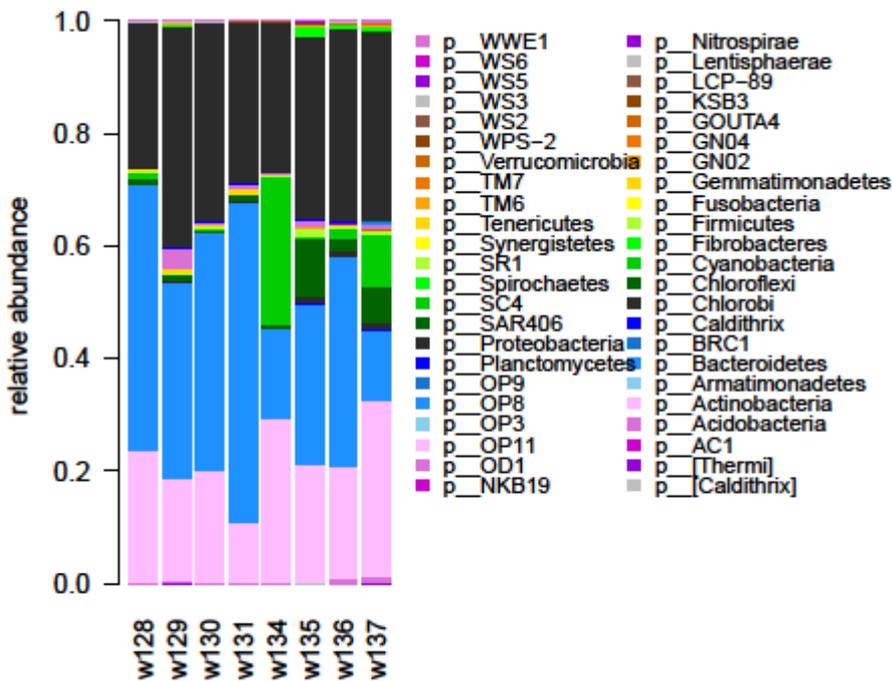


Abbildung A2 Analyse mit der Software mothur; ohne unklassifizierte Sequenzen;  
Referenzdatenbank: GreenGenes

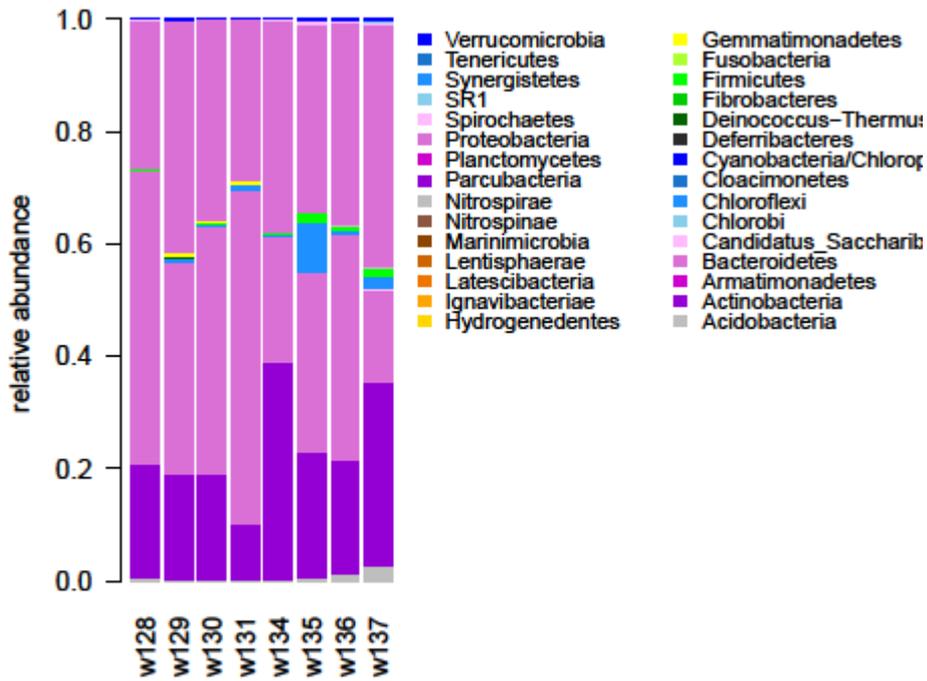


Abbildung A3 Analyse mit der Software mothur; ohne unklassifizierte Sequenzen; Referenzdatenbank: RDP

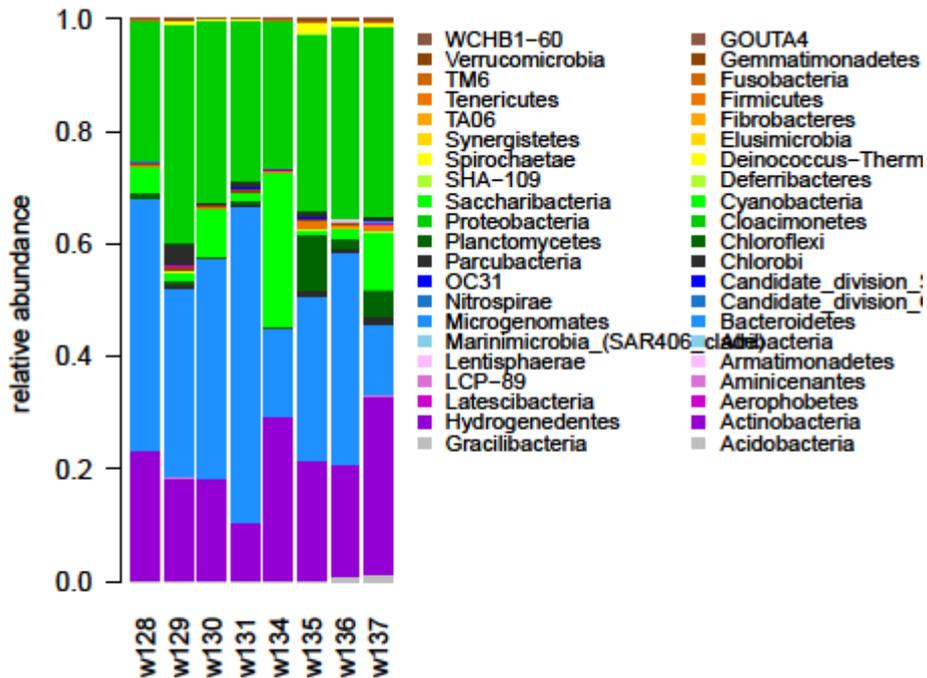


Abbildung A4 Analyse mit der Software mothur; ohne unklassifizierte Sequenzen; Referenzdatenbank: SILVA

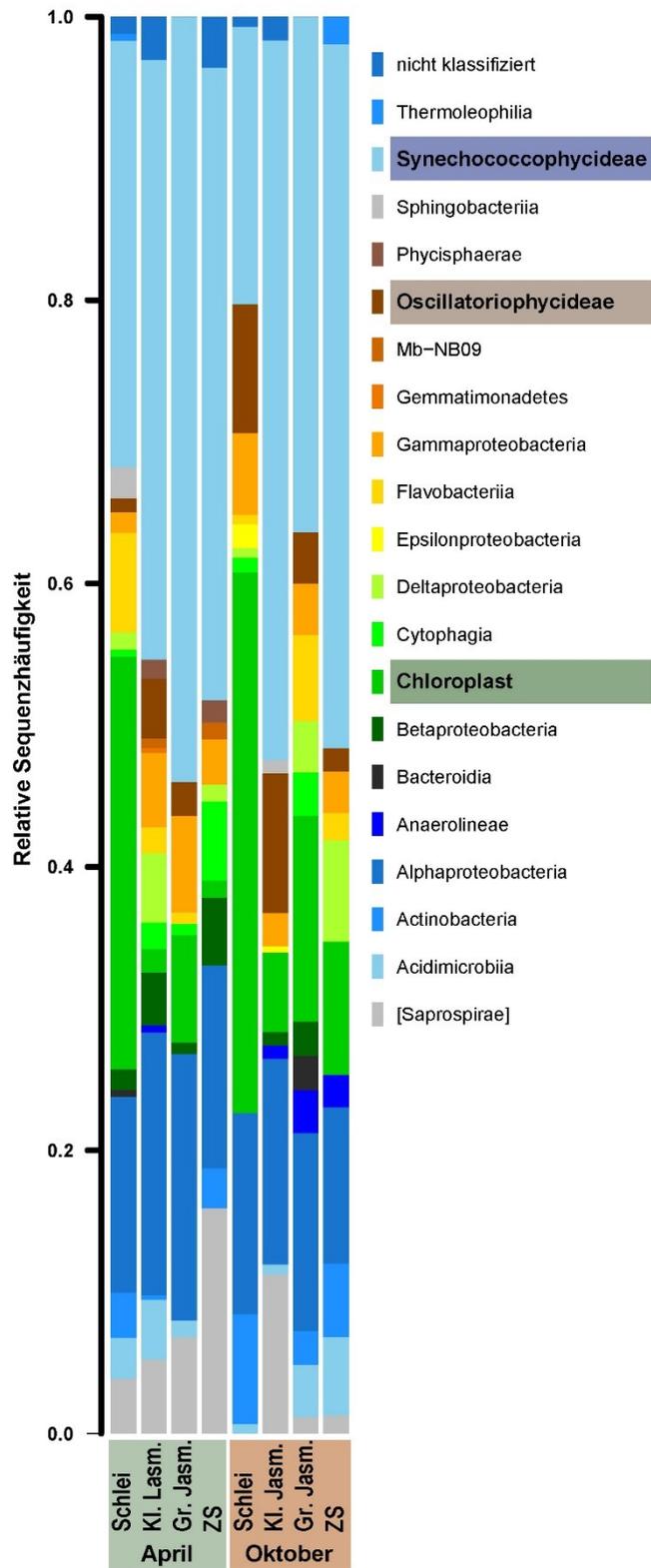


Abbildung A5 Analyse mit der Software qiime; Referenzdatenbank: GreenGenes

## ii. Danksagung

Hier möchte ich allen denen danken, die diese Arbeit begleitet und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Ich bedanke mich besonders bei Dr. Rhena Schumann für die ansteckende Begeisterung für die kleinsten Cyanobakterien, die Bereitstellung des Themas, die Zählung der Proben, die konstruktiv-kritischen Anmerkungen und Diskussionen, die vielen Gutachten (7 waren's!) für das Stipendium und für das persönliche Engagement in den Jahren der Promotion und davor. Die Zingstzeiten waren immer anstrengend, aber mindestens genauso spaßig – Danke auch dafür!

Des Weiteren möchte ich Prof. Ulf Karsten und der AG Angewandte Ökologie und Phykologie für den Arbeitsplatz und die Unterstützung mit Mitteln für Material und Dienstreisen danken. Besonderer Dank geht auch an Prof. Karsten für seine vielen Gutachten für das Stipendium und seine persönliche Unterstützung in den letzten Jahren. Dank gilt auch Thomas Pröschold, der mich die molekulare Taxonomie und Freude am Verschieben und Falten von zig tausenden DNA-Basen gelehrt hat. Weiterhin danke ich Juliane, Rita und Volker für ihre exzellente technische Unterstützung, offene Ohren, sowie immer gute Ideen für praktische Probleme. Danke an die gesamte AG, dass ich mich eigentlich immer darauf freuen konnte, in der Uni anzukommen.

Danke auch an Karin Glaser, Silvia Gschwendtner und Christin Bennke für die methodische Einweisung und Hilfe mit der T-RFLP, der Amplicon und der FisH-Sonde.

Danke an Nadine, Büro- und Leidensgenossin, für die tollen Jahre. Danke für Deine Hilfe, Deine Empathie, Deinen Humor und viele gute (zu) lange Kaffeepausen.

Danke an meine Bogen-Clique und insbesondere Tom fürs Dasein, Ablenken, Aushalten und Spaß haben.

Danke auch an meine Familie, die mich das ganze Studium in vielen Dingen unterstützt hat und immer für mich da war. Danke für Euer ernstes Interesse an der Arbeit, das mir stets half neben dem wissenschaftlichen auch den praktischen Nutzen zu suchen und zu sehen.

Zuletzt möchte ich Andreas danken. Du warst die letzten drei Jahre mein Anker, sicherer Hafen und der Grund, warum ich nicht völlig verrückt geworden oder ausgebrannt bin. Danke für Dein Augenmaß, Dein Verständnis und Deine Beharrlichkeit, die mir in allen Lebenslagen geholfen haben.

### iii. Publikation

Teile dieser Arbeit wurden 2017 in dem Fachartikel

***Identification of Cyanobacteria in a Eutrophic Coastal Lagoon on the Southern Baltic Coast***

in der Zeitschrift *Frontiers in Microbiology* (Ausgabe 8, Seiten 1–16) unter der [doi:10.3389/fmicb.2017.00923](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00923) veröffentlicht. Neben Martin Albrecht waren Thomas Pröschold und Rhena Schumann weitere Autoren. Die Anteile der Autoren verteilen sich wie folgt:

**Martin Albrecht** verfasste das Manuskript bis auf den Teil „2.2 Cell Counts“ und bearbeitete die Isolate, DNA-Sequenzen und Phylogenien. Er erstellte die Abbildungen 3, 6, 7 und 8 und editierte die Abbildungen 2 und 4.

**Rhena Schumann** entwarf das Konzept für das Manuskript und bearbeitete die Zellzählungen. Sie erstellte die Abbildungen 2, 4 und 5 und schrieb den Methodenteil „2.2 Cell Counts“. Weiterhin erstellte sie die Karte aus Abb. 1, war maßgeblich am Diskussionsteil „Applied Morphological Aspects“ beteiligt und editierte das Manuskript.

**Thomas Pröschold** konzipierte Aspekte der morphologischen und genetischen Taxonomie und lieferte die Grundlage für das Alignment. Auch Thomas Pröschold editierte das Manuskript.

#### iv. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Datum

Unterschrift