Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil 1 – Kurzbericht

Vorhabenbezeichnung:	Diversity of aquatic plants and associated cyanobacteria influence the vulnerability of recreational and drinking water uses of inland waters to neurotoxins (DIVATOX)
Akronym:	DIVATOX
Zuwendungsempfänger:	Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB) im Forschungsverbund Berlin e.V. (PI: PD Dr. Sabine Hilt)
Förderkennzeichen:	16LW0384
Laufzeit des Vorhabens:	01.06.2023 – 31.08.2024
Datum der Einreichung:	23.04.2025
Autoren:	Sabine Hilt Sven Meißner Viola Liebich Susanne Marks
Betreut durch:	VDI/VDE Innovation + Technik GmbH Projektträger Jülich seit 01.02.2025

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung im Rahmen der Forschungsinitiative zum Erhalt der Artenvielfalt (FEdA) innerhalb der Fördermaßnahme BiodivGesundheit – Erforschung der Zusammenhänge zwischen Biodiversität und menschlicher Gesundheit unter dem Förderkennzeichen 03LW0384 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Aufgabenstellung

Die Aufgabe für die einjährige Konzeptionsphase (DIVATOX-1) war es, einen Verbundforschungsantrag für ein anschließendes dreijähriges Forschungsprojekt zu erstellen und ein Freilandscreening sowie Methodenoptimierungen durchzuführen. In DIVATOX wird der Einfluss der Biodiversität von Wasserpflanzen, ihres Mikrobioms und ihrer assoziierten Cyanobakterien sowie der Umweltbedingungen auf das Vorkommen, die Zusammensetzung und die Menge von Neurotoxinen in Binnengewässern und deren Gesundheitsrisiko für Hunde und Menschen untersucht. Dies wurde notwendig, nachdem in den letzten Jahren in mehreren deutschen und internationalen Gewässern Hunde verendet waren und Strände nach dem Nachweis von Vergiftungen gesperrt werden mussten. Die Nervengifte, die für den Tod der Hunde am Tegeler See verantwortlich waren, stammten von Wasserpflanzen-assoziierten Cyanobakterien, die bislang kaum erforscht sind. Unterwasserpflanzen bieten eine große Oberfläche für assoziierte Cyanobakterien, treten nach Renaturierungsmaßnahmen von Seen oft in reduzierter Diversität, aber hoher Abundanz auf und können als Träger das Anspülen toxischer Cyanobakterien an Strände befördern. Möglicherweise gibt es auch spezifische Interaktionen zwischen den Unterwasserpflanzen und den assoziierten Cyanobakterien, die deren Abundanz und Toxinproduktion beeinflussen.

Ziel von DIVATOX ist die Erforschung der Umweltbedingungen, die zum Auftreten toxischer, Wasserpflanzenassoziierter Cyanobakterien führen und darauf basierend die Entwicklung einer effektiven Überwachungsmethode und eines Modells, um das Auftreten von Wasserpflanzen-assoziierten Cyanobakterien und deren Neurotoxinen vorhersagen zu können. DIVATOX soll dazu beitragen, den Einfluss aquatischer Biodiversität auf die menschliche Gesundheit zu verstehen, interdisziplinäre Forschung zwischen den bisher nicht kooperierenden Bereichen aquatische Ökologie und Neurotoxikologie zu etablieren und neue wissenschaftliche Erkenntnisse unter Einbeziehung von Stakeholdern in die Praxis zu übersetzen.

Ablauf des Vorhabens

DIVATOX-1 wurde in enger Kooperation zwischen WissenschaftlerInnen des Leibniz-Instituts für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB), der TU und FU Berlin, des Leibniz-Instituts für Arbeitsforschung Dortmund (IfADo) sowie dem Umweltbundesamt (UBA), dem Berliner Senat, dem Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) und den Berliner Wasserbetrieben (BWB) realisiert. Für den intensiven Informationsaustausch sowie zur Diskussion erster Ergebnisse wurden zwei Stakeholder-Workshops am 09.10.2023 und 17.05.2024 veranstaltet.

Neben der kollaborativen Konzeption von DIVATOX-2 wurden in Zusammenarbeit zwischen dem IGB und dem UBA sowie dem Berliner Senat und den BWB ein Freiland-Screening und Methodenoptimierungen durchgeführt. Fünf Seen in Berlin und Brandenburg (Müggelsee, Kalksee, Flakensee, Dämeritzsee, Tegeler See) wurden an jeweils 3 Transekten in unterschiedlichen Tiefen auf Vorkommen von Wasserpflanzen-assoziierten Cyanobakterien untersucht. Anatoxine wurden in 2 Seen (Müggelsee, Tegeler See) nachgewiesen, jedoch nur im Tegeler See in höheren Konzentrationen. Daher wurde in diesem See über ein Jahr (05.2023 - 05.2024) Pflanzenmaterial gesammelt und Daten zu physikalisch-chemischen Parametern aus Wasserproben erhoben. An drei verschiedenen Stellen des Sees wurden jeweils 4 Replikate von *F. antipyretica* aus 1, 2, 3, 4 m Tiefe sowie Wasserproben entnommen. Am UBA wurden die Anatoxingehalte der Proben bestimmt. Die Diversität und Quantität von filamentösen, pflanzenassoziierten Cyanobakterien wurde mittels Lichtmikroskopie bestimmt und das Vorkommen von Anatoxin-Synthesegenen wurde per PCR in ausgewählten Proben vergleichend analysiert. Es wurden auch weitere *Microcoleus*-Stämme isoliert sowie Probennahmetechniken und die Kulturbedingungen für *Microcoleus* und *F. antipyretica* optimiert. Es wurde außerdem damit begonnen, interessierte BürgerInnen zu akquirieren, die Interesse an einer Beteiligung am Feldmonitoring in DIVATOX-2 am Tegeler See haben.

Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten toxischer benthischer Cyanobakterien im Tegeler See ein wiederkehrendes Phänomen ist. Die höchsten Toxinkonzentrationen wurden im Jahresverlauf im Mai und Oktober gefunden. Eine nichtparametrische Korrelationsanalyse aller gemessenen Umweltfaktoren sowie der Toxinkonzentrationen ergab eine negative Korrelation zwischen dem Phosphorgehalt im Seewasser und der Anatoxinkonzentration. Je niedriger die Phosphat-konzentrationen im Jahresverlauf waren, desto höher waren die gemessenen Anatoxin-konzentrationen. Die mikroskopischen Analysen bestätigten die Dominanz von *Microcoleus* einer für die Produktion von Anatoxinen bekannten Cyanobakterien-Gattung. Daneben traten weitere potenziell toxische Cyanobakterien-Gattungen wie *Geitlerinema*, *Phormidium* und *Oscillatoria* auf.

Die Beprobung vordefinierter Transekte erwies sich als geeignetes Verfahren, um die zeitliche Variabilität Wasserpflanzen-assoziierter Cyanobakterien und ihrer Toxingehalte im Jahresverlauf standardisiert zu erfassen. Extrem hohe Toxinkonzentrationen wurden jedoch vor allem in makroskopisch sichtbaren Biofilmen außerhalb der definierten Transekte mit Hilfe von Videotechnik gefunden. Gezielt entnommene Proben wiesen regelmäßig zehnmal höhere Toxinkonzentrationen auf als an anderen untersuchten Stellen (Toxizitäts-Hotspot). Eine videogestützte Auswahl und Beprobung erwies sich daher als besser geeignet, um das Gefährdungspotential durch toxische benthische Cyanobakterien zu erfassen.

In Laborversuchen konnten die Kulturbedingungen für ausgewählte Stämme der am häufigsten an Wasserpflanzen-assoziierten Cyanobakterien-Gattung *Microcoleus* und das Wassermoos *F.ontinalis antipyretica* optimiert werden, sodass in Phase 2 von DIVATOX die geplanten Co-Kultivierungsversuche durchgeführt werden können. Es konnte zudem der Einfluss des Umweltparameters CO_2 auf das Toxinspektrum sowie auf das Wachstum der *Microcoleus*-Stämme nachgewiesen werden. Es wurden neben den bereits am UBA in Kultur befindlichen weiter *Microcoleus*-Stämme aus dem Tegeler See isoliert und in Kultur genommen. Die Genome einiger dieser Stämme sollen in DIVATOX-2 sequenziert und zusammen mit den bereits charakterisierten Stämmen des UBA für Experimente zum Verständnis der biotischen und abiotischen Umweltfaktoren genutzt werden. Die in DIVATOX-1 gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für gezielte Untersuchungen und Experimente in DIVATOX-2.

DIVATOX wurde auf der FEdA-Impulstagung im Mai 2023 und innerhalb eines „Projekt-Lunchs“ am 12.06.2024 per Onlinevortrag sowie auf der FEdA-Statuskonferenz in Frankfurt am Main am 13.-14.05.2024 in Form eines Posters vorgestellt. Außerdem wurden Ergebnisse aus DIVATOX auf einer Tagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie 16.-19.09.2024 als Vortrag und zwei internationalen Konferenzen präsentiert: 1) Netherlands Annual Ecology Meeting (Lunteren, Niederlande, 13.-14.02.2024, Poster); 2) International Conference on Urban Water Interfaces (Berlin, 22.-24.04.2024, Vortrag). Ausgewählte Ergebnisse wurden in Vorträgen in eingeladenen Seminaren an der Universität Lund (17.10.2023), Amsterdam (22.02.2024) und Kunming, China (04.07.2024) vorgestellt.

Durch die am IGB durchgeführten Projektworkshops mit allen Projektpartnern, institutionalen Stakeholdern (Umweltbundesamt, Berliner Senat, Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Berliner Wasserbetriebe, Landeslabor Berlin-Brandenburg) und einem zusätzlichen externen Projektpartner (Timo Niedermeyer, FU Berlin) wurde der Aufbau eines nachhaltigen Stakeholder-netzwerkes mit langfristigem Engagement aller Beteiligten realisiert. Das Netzwerk sichert zeitnahe und angemessene Reaktionen auf zukünftige Ereignisse und Anfragen bezüglich pflanzenassoziierter Cyanobakterientoxinen. Es wurden bereits Monitoringdaten für den Tegeler See vom Senat Berlin zur Verfügung gestellt und Analysen im Landeslabor Berlin vereinbart.

Der Förderantrag für die 2. Phase von DIVATOX wurde am 01.12.2023 eingereicht und die vom Gutachtergremium geforderten Anpassungen und Spezifizierungen der geplanten Arbeiten in einer überarbeiteten Version des Antrags am 22.03.2024 nachgereicht. Die erste Phase von DIVATOX wurde somit erfolgreich abgeschlossen und DIVATOX-2 konnte am 1. September 2024 starten.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil II – Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

Vorhabenbezeichnung:	Diversity of aquatic plants and associated cyanobacteria influence the vulnerability of recreational and drinking water uses of inland waters to neurotoxins (DIVATOX)
Akronym:	DIVATOX
Zuwendungsempfänger:	Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB) im Forschungsverbund Berlin e.V. (PI: PD Dr. Sabine Hilt)
Förderkennzeichen:	16LW0384
Laufzeit des Vorhabens:	01.06.2023 – 31.08.2024
Datum der Einreichung:	23.04.2025
Autoren:	Sabine Hilt Sven Meißner Viola Liebich Susanne Marks
Betreut durch:	VDI/VDE Innovation + Technik GmbH Projektträger Jülich seit 01.02.2025

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung im Rahmen der Forschungsinitiative zum Erhalt der Artenvielfalt (FEdA) innerhalb der Fördermaßnahme BiodivGesundheit – Erforschung der Zusammenhänge zwischen Biodiversität und menschlicher Gesundheit unter dem Förderkennzeichen 03LW0384 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

FEdA
BMBF-Forschungsinitiative zum Erhalt der Artenvielfalt

GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium für Bildung und Forschung

Einleitung

Schon seit Jahrzehnten stellen toxische Blüten von planktischen Cyanobakterien ein ernstes globales Problem in Süßgewässern dar. Cyanobakterientoxine schaden Menschen, Tieren, Ökosystemen, der Trinkwasserversorgung und Freizeitaktivitäten. Infolgedessen haben sich beträchtliche Forschungsanstrengungen auf die Ursachen und Folgen von planktischen Cyanobakterien-Blüten konzentriert, und es wurde eine Vielzahl von Managementmaßnahmen entwickelt. In jüngerer Zeit sind ähnliche Bedenken hinsichtlich toxischer Cyanobakterien aufgekommen, die an Oberflächen wachsen und eher benthisch als planktisch sind, insbesondere in Klarwasserseen und Flüssen. Diese produzieren starke Toxine, von denen einige mit Tiervergiftungen in Verbindung gebracht werden. Neben anderen Oberflächen wie Steinen und Sediment werden auch submerse aquatische Makrophyten besiedelt. Diese Wasserpflanzen-assoziierten toxischen Cyanobakterien sind von besonderem wissenschaftlichem und sozioökonomischem Interesse, da submerse Pflanzen eine große Oberfläche für assoziierte Cyanobakterien bieten, in Süßwasserhabitaten natürlich häufig vorkommen und nach erfolgreichen Managementmaßnahmen zur Verringerung des Nährstoffeintrags häufig wieder in Gewässern auftauchen. Wurzellose oder abgetrennte Wasserpflanzen können als Träger fungieren und giftige Cyanobakterien in Strandzonen transportieren, wo sie mit Menschen und Tieren in Kontakt kommen, was das Potenzial für Vergiftungsfälle erhöht. Pflanzenmaterial, das bei der mechanischen Entfernung von Makrophytenmassen abgetrennt wird, könnte ähnliche Auswirkungen haben. Außerdem können durch herbivore Tiere Wasserpflanzen-assoziierte Cyanotoxine ins Nahrungsnetz gelangen

Toxische Stämme der benthischen Cyanobakterien-Gattung *Microcoleus* waren weltweit vielfach für Vergiftungsfälle mit Hunden verantwortlich. Die meisten Biofilme und isolierten Stämme enthielten unterschiedliche Anteile der Toxine Anatoxin-a (ATX), Homoanatoxin-a (HATX) und ihrer Dihydrovarianten (dhATX, dhHATX). Diese Variabilität im Gehalt an ATX, einem neurotoxischen Alkaloid, scheint von der Stammzusammensetzung, den Umweltfaktoren und der Zusammensetzung des assoziierten Mikrobioms abzuhängen. Obwohl ATX in Süßgewässern weltweit verbreitet ist, ist es noch nicht ausreichend erforscht.

Im Tegeler See im Nordwesten Berlins wurde das Cyanobakterium *Microcoleus sp.* (früher als *Tychonema sp.* beschrieben) wiederholt in Verbindung mit dem Wassermoos *Fontinalis antipyretica* gefunden, als es zwischen 2017-22 aus angeschwemmtem Pflanzenmaterial entnommen wurde. Mehrere Hunde starben in den Jahren 2017 und 2021 nach der Aufnahme von kontaminierten Wassermoos. Die höchsten Anatoxingehalte in Makrophytenproben wurden im Frühjahr bei Wassertemperaturen unter 20 °C festgestellt. Die Umweltbedingungen, die das regionale Vorkommen, die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft und die räum-zeitliche Dynamik von pflanzenassoziierten Cyanobakterien und ihren Toxinen beeinflussen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Dies ist erstaunlich, da dieses Wissen dringend benötigt wird, um Vorhersagen, Frühwarnsysteme und Managementmaßnahmen gegen künftige tödliche Vergiftungsereignisse bei Tieren zu initiieren.

Probennahmestandorte

Die Proben für DIVATOX wurden zunächst in fünf verschiedenen Seen in der Region Berlin genommen: Müggelsee, Flakensee, Kalksee, Dameritzsee und Tegeler See. Aufgrund des Vorkommens von Anatoxin wurde eine einjährige Probenahmekampagne ausschließlich am Tegeler See durchgeführt (Abbildung 1), während die Probenahme an den anderen Seen nur einmal im Mai 2024 erfolgte. Der Tegeler See wird zur Trinkwassererzeugung genutzt und wird deshalb langfristig überwacht. Er ist bekannt für den extremen Sanierungserfolg, der dort durch eine signifikante Verringerung der externen Phosphorbelastung (TP) erzielt wurde.

Abbildung 1: Probennahmestellen am Tegeler See

Durchführung

Probennahme

Die Proben wurden an den Transekten T1 und T3 über ein gesamtes Jahr hinweg mindestens einmal im Monat genommen, beginnend im Mai 2023 und endend im Mai 2024. Transekt T2 und T4 wurden zu Explorationszwecken nicht durchgängig beprobt. Weitere Probennahmestellen kamen nach Sichtungen von Cyanobakterienbiofilmen hinzu (E1, E2). Das Standardprobenahmeverfahren umfasste die Entnahme von vier unabhängigen, unselektiven Makrophytenproben aus 1 m, 2 m, 3 m und 4 m Tiefe mit einem an einer ausziehbaren Stange befestigten Rechen nach Entnahme der entsprechenden Wasserproben. Unterwasser-Videos wurden in einer Tiefe von bis zu 4 Metern mit einer GoPro Hero12 Kamera (GoPro Inc., USA) gemacht, die an einem Teleskopstab mit Live-Wi-Fi-Signalübertragung über ein Koaxialkabel montiert war. Die Videoübertragung ermöglichte die gezielte Entnahme mehrerer zusätzlicher Proben auf der Grundlage der visuellen Identifizierung von Makrophyten und Biofilmen. Die Probenahme von sichtbaren Cyanobakterien-Biofilmen umfasste das Sammeln von *F. antipyretica* aus flachen Teilen des Sees sowie das Sammeln von abgelösten und aufschwimmenden Biofilmen.

Probenbearbeitung

Die Makrophytenproben wurden in voretikettierten sterilen 50-mL Röhrchen gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung im Labor in einer Kühlbox gelagert. Zur Sammlung der Biofilme von den Pflanzenproben wurde gefiltertes Seewasser (Glasfaserfiltern) bis zur 40 mL-Marke in die 50 mL Röhrchen gegeben. Die Biofilme wurden von den Makrophyten durch kräftiges Schütteln der Röhrchen für 20 Sekunden entfernt. Die Makrophyten wurden aus den Röhrchen entnommen und deren Frisch- und Trockengewicht bestimmt. Die Volumina der verbleibenden Biofilmsuspensionen in den Röhrchen wurden notiert.

Das zu untersuchende suspendierte Biofilmmaterial wurde nach dem Schütteln aus den Röhrchen entnommen. Für die anschließende DNA-Extraktion wurde Material auf Filtern gesammelt. Für die toxikologische Analyse wurde 1 mL der Suspension in 2 mL Röhrchen überführt, Ameisensäure zugesetzt (0,1 % Endkonzentration) und bei -20 °C gelagert. Für die mikroskopische Untersuchung wurde jeweils 1 mL Suspension mit Formaldehyd fixiert.

Die Wasserproben wurden direkt nach der Entnahme zur Bestimmung folgender Parameter vorbereitet: gesamter gelöster Phosphor (TDP), Gesamtphosphor (TP), gesamter organischer Kohlenstoff und Gesamtstickstoff (TOC/TN), anorganischer Kohlenstoff (DIC), IC (Cl^-, NO_3^--N, SO_4^{2-}, FSA (löslicher reaktiver Phosphor), NH_4^+, NO_2^-, NO_3^--N), und ICP (Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, Zn).

Abundanzbestimmung benthischer Cyanobakterien mit dem Mikroskop

Die formaldehydfixierten Proben wurden mit einem inversen Mikroskop analysiert. Ein Tropfen der Probe wurde auf einen Glasobjektträger gegeben, und es wurde eine semiquantitative Analyse der in der Probe vorhandenen Cyanobakterien durchgeführt. Die Häufigkeit der fadenförmigen Cyanobakterien jeder Probe wurde in fünf Gruppen eingeteilt: 0 = nicht vorhanden bis 5 = sehr häufig vorhanden. Zur relativen Quantifizierung wurde die dritte Potenz der jeweiligen Zahlen verwendet, um diskrete numerische Werte zu erhalten. Die Zellzahlen innerhalb der Filamente wurden nicht bestimmt. Zu den Cyanobakterien-Gattungen, die in den gesammelten Proben am häufigsten vorkamen, gehörten *Microcoleus* sp., *Geitlerinema* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp..

Toxinbestimmung

Die Konzentrationen der in den Proben gemessenen Toxine ATX, DHTX und HTX wurden mittels LC-MS/MS am Umweltbundesamt bestimmt. Hierfür wurde jeweils 1 mL Suspension analysiert, die durch Schütteln des Pflanzenmaterials in gefiltertem Seewasser gewonnen wurde und der Toxingehalt in der Einheit µg/L bestimmt. Der Gesamttoxingehalt jeder Probe wurde aus den Suspensionsvolumina berechnet, die nach dem Entfernen des Pflanzenmaterials in den Röhrchen verblieben waren. Die Trockengewichte des Pflanzenmaterials jeder Probe wurden bestimmt und die Toxinkonzentrationen letztlich in µg/g Pflanzentrockengewicht ausgedrückt.

PCR-Nachweis von Anatoxin-Synthesegenen

DNA wurde mit dem DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, USA) extrahiert und das Vorkommen des für die Synthese von Anatoxin bekannten *Oscillatoria* anaC-Gens (anaC-osc) mit spezifischen Primern per PCR analysiert. Die Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese separiert und dokumentiert.

Ergebnisse

Anatoxin-Konzentrationen in Makrophytenproben an Transekten im Jahresverlauf

Anatoxine wurden über den gesamten Probennahmezeitraum im Tegeler See nachgewiesen. Dies bedeutet, dass Anatoxin-produzierende Cyanobakterien ein persistierendes Phänomen im Tegeler See sind. Die Anatoxinkonzentrationen, in nach Standardprotokoll entnommenen Makrophytenproben der Transekte T1 und T3, zeigten ein charakteristisches saisonales Muster (Abbildung 2). Sowohl die Gesamtzahl der Anatoxin-positiven Proben als auch die gemessenen Konzentrationen waren im späten Frühjahr (Mai) und im Herbst (Oktober) am höchsten. Die einzelnen Anatoxinvarianten (ATX, dhATX, HATX) zeigten hierbei ein ähnliches saisonales Muster, wobei dhATX meist in geringeren- und ATX in höheren Konzentrationen vorlagen.

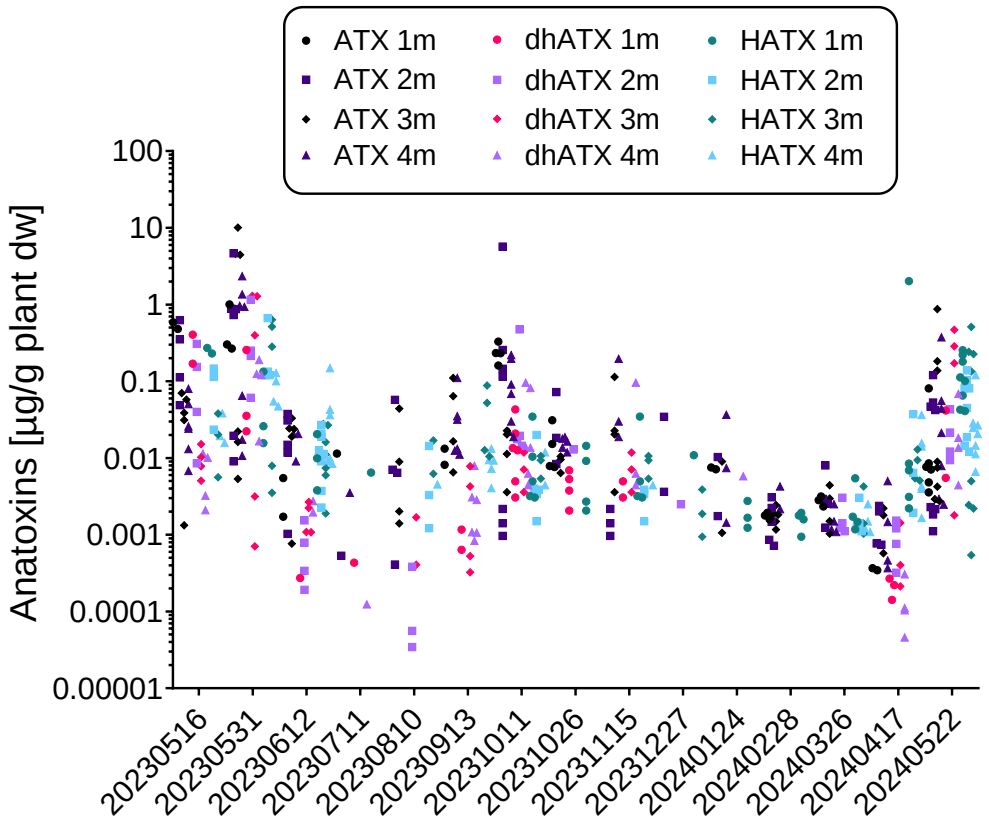

Abbildung 2: Anatoxikonzentrationen in Wasserpflanzen-assoziierten Cyanobakterien-Biofilmen aus dem Tegeler See (Berlin) an zwei Transekten (T1 und T3) in verschiedenen Wassertiefen im Jahresverlauf

Korrelationsanalyse

Zur Ermittlung der Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Anatoxinen mit der mittels Mikroskopie bestimmten Häufigkeit verschiedener benthischer Cyanobakterienarten und den ermittelten abiotischen Umweltfaktoren wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die nichtparametrische Rangkorrelationsanalyse nach Spearman auf alle Variablenpaarungen des gesamten Datensatz der Transekte T1 und T3 angewendet (Abb. 2). Als Toxinkonzentrationen wurden die Mittelwerte der jeweils vier Replikate pro Datum und Wassertiefe verwendet.

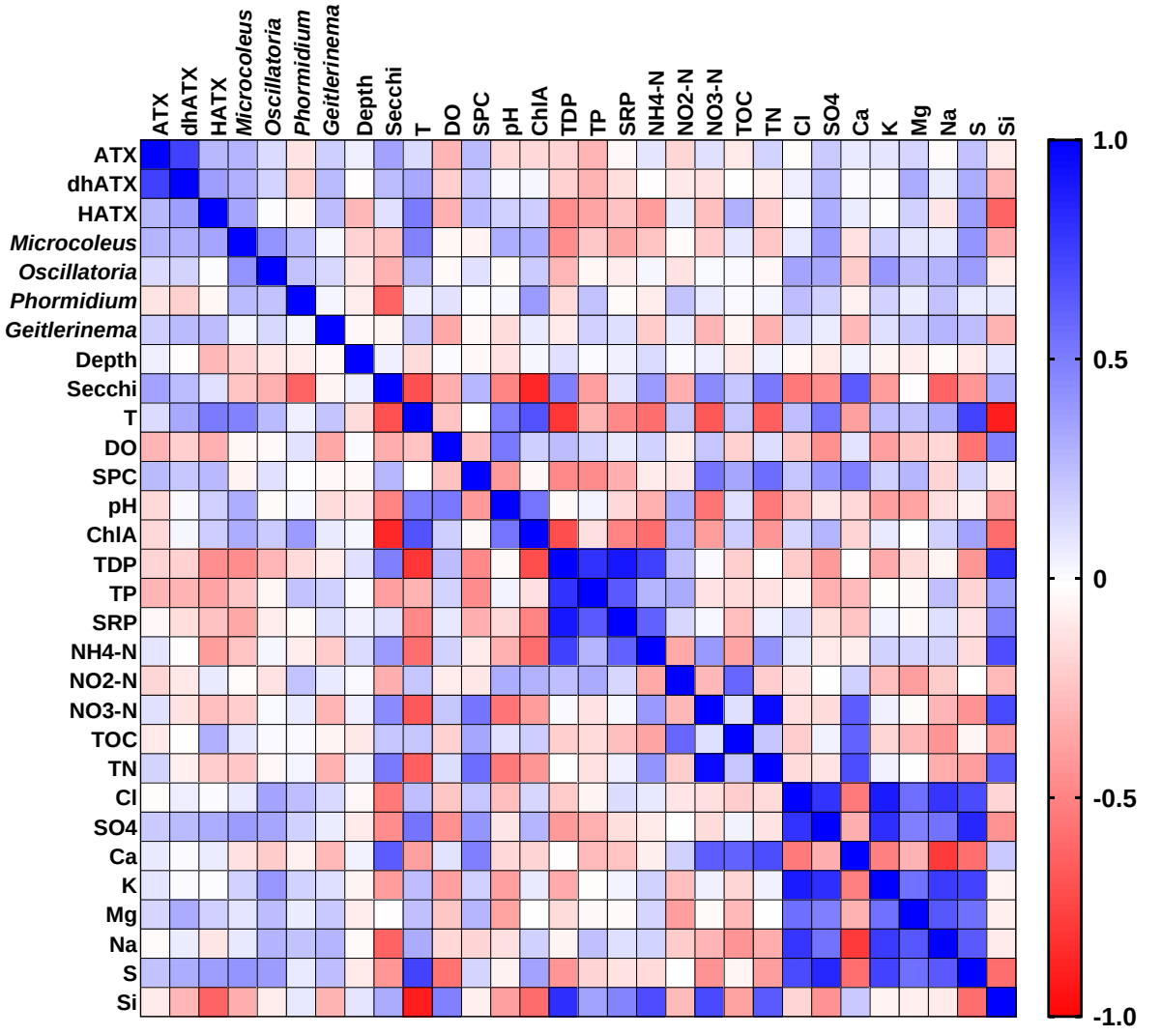

Abbildung 3: Spearman Rangkorrelationsmatrix für die gemessenen Parameter der Transekte T1 und T3 im Tegeler See

Statistisch signifikante Korrelationen wurden zwischen allen Anatoxinvarianten ATX, dhATX und HATX und der mikroskopisch bestimmten Abundanz der Cyanobakterien-Gattungen *Microcoleus sp.* und *Geitlerinema sp.* gefunden (Tabelle 1). Da jedoch *Geitlerinema sp.* nicht als Anatoxinproduzent bekannt ist (Cadel-Six et al. 2007), wurde *Microcoleus sp.* als verantwortlich für die Anatoxinproduktion identifiziert. Weiterhin wurden für alle Toxinvarianten signifikant negative Korrelationen mit dem Gesamtphosphorgehalt (TP) in den Wasserproben nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass sich der Hauptteil des Gesamtphosphors, insbesondere des biologisch gebundenen, zu Zeiten besonders hoher Toxinkonzentrationen in Wasserpflanzen-assoziierten Cyanobakterien

nicht in der Wassersäule, d.h. im Lebensraum des Phytoplanktons lokalisiert ist. Über die Phosphormengen innerhalb der Wasserpflanzen-assoziierten Cyanobakterien können zu diesem Zeitpunkt keine Aussagen getroffen werden. Unsere Ergebnisse stützen hinsichtlich der Ergebnisse zu den Phosphorkonzentrationen die Studien von Wood et al. (2017) und McAllister et al. (2018), die fanden, dass erhöhte Stickstoff-Konzentrationen in Kombination mit niedrigen Phosphorkonzentrationen (> 0,1 mg gelöster anorganischer Stickstoff (DIN)/L, < 0,010 mg gelöster reaktiver Phosphor (DRP)/L) in der Wassersäule die Vermehrung von *Microcoleus autumnalis* förderte, wenn diese an feines Sediment gebundenen Phosphor aufnehmen konnte.

Tabelle 1: Spearman r Korrelationskoeffizienten mit *p*-Wert-Indikatoren für Signifikanz, zweiseitig: ( ) *p* = nicht signifikant, * *p* < 0,05; ** *p* < 0,01; *** *p* < 0,001; **** *p* < 0,0001

	ATX	dhATX	HATX
ATX	1		
dhATX	**0,749****	1	
HATX	**0,278****	**0,379****	1
Microcoleus sp.	**0,290****	**0,309*****	**0,350*****
Oscillatoria sp.	0,141	0,170	0,009
Phormidium sp.	-0,109	-0,188	-0,035
Geitlerinema sp.	**0,192***	**0,296****	**0,261****
Wassertiefe	0,064	-0,008	**-0,282****
Sichttiefe	**0,360*****	**0,267***	0,116
Wassertemperatur (T)	0,140	**0,341*****	**0,515******
Sauerstoff-Konzentration (DO)	**-0,293****	**-0,190***	**-0,309*****
Leitfähigkeit (SPC)	**0,268****	**0,217***	**0,271****
pH-Wert (pH)	-0,157	0,021	0,181
Chlorophyll a (Chla)	-0,151	0,033	**0,196***
Gesamt gelöster Phosphor (TDP)	-0,172	-0,184	**-0,446******
Gesamt-Phosphor (TP)	**-0,293****	**-0,295****	**-0,375*****
Gelöster reaktiver Phosphor (SRP)	-0,035	-0,133	**-0,241***
Ammonium-Stickstoff (NH_4-N)	0,102	-0,011	**-0,384*****
Nitrit-Stickstoff (NO_2-N)	-0,162	-0,093	0,079
Nitrat-Stickstoff (NO_3-N)	0,115	-0,113	**-0,255***
Gesamt organischer Kohlenstoff (TOC)	-0,087	0,002	**0,309****
Gesamt-Stickstoff (TN)	0,170	-0,067	-0,199
Chlorid (Cl)	-0,014	0,064	0,015
Sulfat (SO4)	**0,206***	**0,269****	**0,319****
Calcium (Ca)	0,079	0,018	0,073
Kalium (K)	0,101	0,013	0,012
Magnesium (Mg)	0,161	0,327**	0,180
Natrium (Na)	-0,019	0,074	-0,100
Schwefel (S)	**0,236***	**0,318****	**0,380*****
Silicium (Si)	-0,086	**-0,281****	**0,609******

Makroskopische Vorkommen cyanobakterieller Biofilme im Tegeler See

Durch den Einsatz einer Videokamera mit Live-Datenübertragung konnten makroskopische Vorkommen Wasserpflanzen-assoziierter Biofilme im Tegeler See identifiziert und dokumentiert werden (Abbildung 4). Die im Herbst 2023 dominierenden Biofilme unterschieden sich bereits makroskopisch deutlich von denen, die im Sommer 2024 dokumentiert wurden. Im Herbst 2023 dominierte *Microcoleus* mit seiner typischen bräunlich-violetten Farbe die cyanobakterielle Gemeinschaft und es wurden sowohl das Wassermoos *F. antipyretica* (Abbildung 4A) als auch andere Substrate wie untergegangene Baumstämme besiedelt (Abbildung 4 A, B). Hier wurden auch die höchsten Anatoxinkonzentrationen des gesamten Probennahmezeitraums gemessen. Im Sommer 2024 dominierte an der gleichen Stelle (E2) *Oscillatoria*, allerdings wurden auch hier *Microcoleus* und relative hohe Anatoxinkonzentrationen nachgewiesen (Abbildung 4 C, D). Die an den Wasserpflanzen anhaftenden Cyanobakterienmatten waren voller Gasblasen. Diese bewirkten ein Auftreiben der Biofilme mitsamt den Wasserpflanzen bis an die Wasseroberfläche. Bei den Gasblasen handelte es sich vermutlich um Sauerstoff, der durch die Photosynthese der Cyanobakterien und Wasserpflanzen entstanden war.

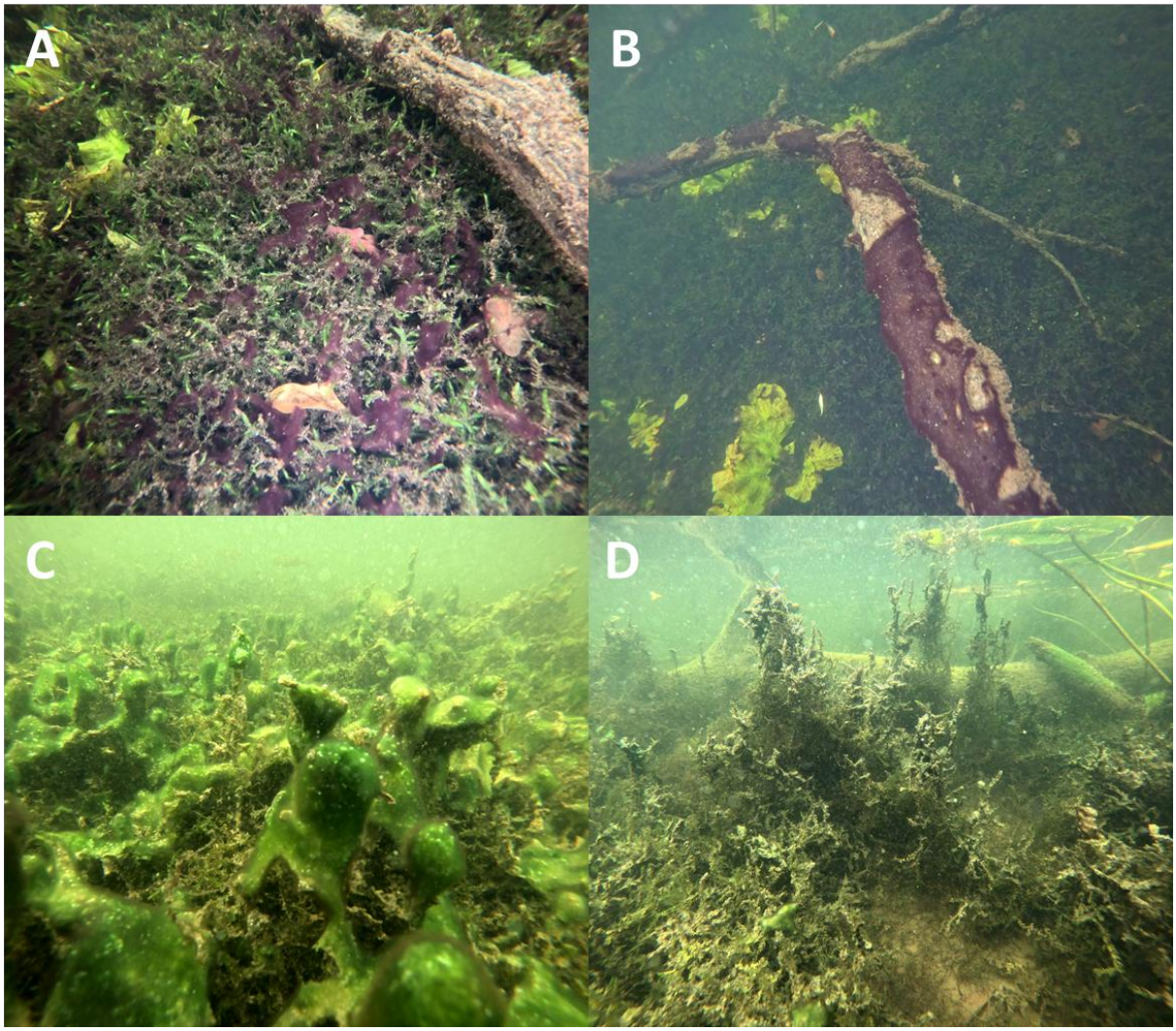

Abbildung 4: *Microcoleus*-Matten auf dem Wassermoos *Fontinalis antipyretica* (A) und auf einem versunkenen Baumstamm (B) am 15.11.2023; C & D: massive sommerliche Cyanobakterienblüte von benthischen *Oscillatoria sp.* und *Microcoleus sp.* am 30.08.2024 20240830, eingeschlossene Gasblasen führten zu auftreiben von Wasserpflanzen (*F. antipyretica*); Aufnahmen jeweils von Transekt E2

Im Vergleich zu den monatlich entnommenen Makrophytenproben der Transekte T1 und T3 wurde in gezielt beprobten Makrophyten mit sichtbarem Cyanobakterienbewuchs an Transekt E2 weitaus höhere Anatoxinkonzentrationen ermittelt. Die hier nachgewiesenen Toxinmengen lagen im Konzentrationsbereich des Materials, das für die Todesfälle von Hunden am Tegeler See verantwortlich war (Fastner et al. 2018).

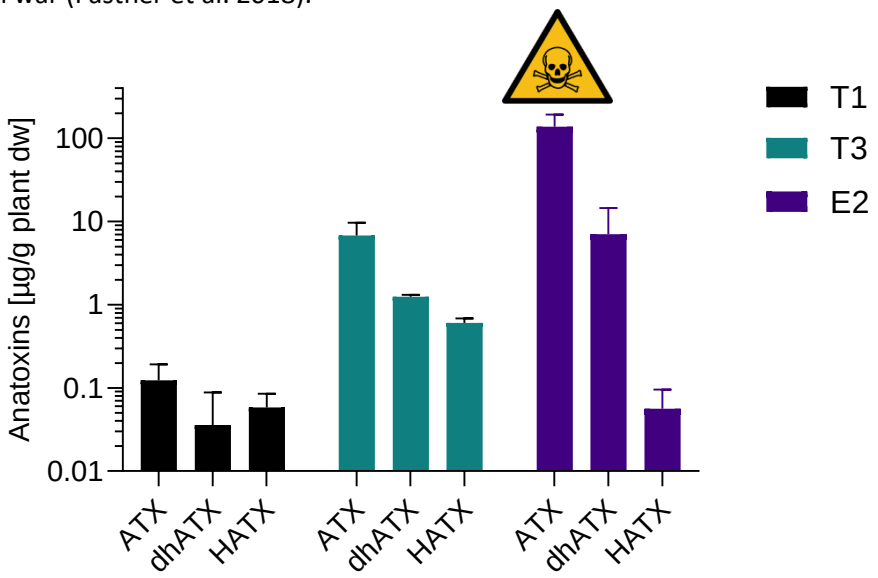

Abbildung 5: An den Transekten T1, T3 und E2 des Tegeler Sees nachgewiesene maximale Anatoxinkonzentrationen

PCR-Analyse ausgewählter Proben

Die Proben zur Analyse des Vorkommens des anaC-osc-Gens wurden auf der Grundlage der vorherigen mikroskopischen Untersuchung ausgewählt, die das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Cyanobakterien bestätigte, wobei der Schwerpunkt auf *Microcoleus* lag. An 32 ausgewählten Proben wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Ein positiver Nachweis des anaC-osc Gens war in 23 Fällen mit dem Vorhandensein von *Microcoleus* in unterschiedlichen Abundanzen verbunden, während nur 4 falsch positive (Nachweis des anaC-osc Gens ohne mikroskopischen Nachweis von *Microcoleus*) und 4 falsch negative (kein anaC-osc Gen trotz Nachweis von *Microcoleus* in der Probe) Ergebnisse auftraten (Abbildung 6).

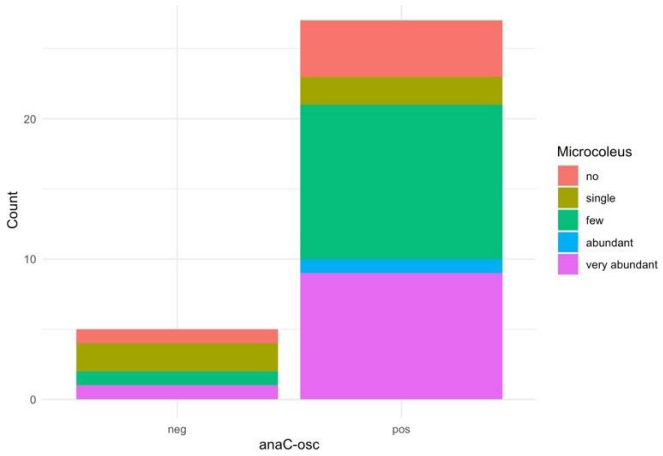

Abbildung 6: Beziehung zwischen dem Vorhandensein des anaC-osc-Gens und der Häufigkeit von *Microcoleus* in den untersuchten Proben. Der Status des anaC-osc-Gens wird auf der unteren Achse mit zwei Kategorien dargestellt: positiv (pos) und negativ (neg). Die Häufigkeit von Microcoleus wird auf der oberen, rechten Seite des Diagramms mit fünf Kategorien dargestellt: kein Vorkommen (no), einzelnes Vorkommen (single), wenige (few), häufig (abundant) und sehr häufig (very abundant).

Referenzen

Cadel-Six S, Peyraud-Thomas C, Brient L, de Marsac NT, Rippka R, Méjean A. 2007. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. Appl Environ Microbiol. 73: 7605-7614.

Fastner J, Beulker C, Geiser B, Hoffmann A, Kröger R, Teske K, Hoppe J, Mundhenk L, Neurath H, Sagebiel D, Chorus I. 2018. Fatal neurotoxicosis in dogs associated with tychoplanktic, anatoxin-a producing *Tychonema* sp. in mesotrophic Lake Tegel, Berlin. Toxins 10: 60.

McAllister TG, Wood SA, Atalah J, Hawes I. 2018. Spatiotemporal dynamics of *Phormidium* cover and anatoxin concentrations in eight New Zealand rivers with contrasting nutrient and flow regimes. Science of The Total Environment 612: 71-80.

Wood SA, Atalah J, Wagenhoff A, Brown L, Doehring K, Young RG, Hawes I. 2017. Effect of river flow, temperature, and water chemistry on proliferations of the benthic anatoxin-producing cyanobacterium *Phormidium*. Freshwater Science 36: 63-76.

Teilnahme an Konferenzen und eingeladene Vorträge

Meissner S, Stankovic N, Fastner J, Hilt S (2024) Associations of benthic cyanobacteria with aquatic plants – the influence of biodiversity on exposure to neurotoxins (poster). Netherlands Annual Ecology Meeting (NAEM 2024) Lunteren, Niederlande 13.-14.02.2024

Meissner S, Diversity of Aquatic Plants and Associated Toxic Cyanobacteria (oral presentation). 2nd International Conference on Urban Water Interfaces Berlin 22.-24.4.2024

Meissner S, Stankovic N, Fastner J, Hilt S (2024) Associations of benthic cyanobacteria with aquatic plants – the influence of biodiversity on the exposure to neurotoxins (poster). FEdA-Statuskonferenz Frankfurt am Main 13.-14.05.2024

Meissner S (2024) Benthic cyanobacteria colonize aquatic plants – impact of diversity on neurotoxin exposure (oral presentation). 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL 2024) TU Dresden 16.-19.09.2024

Hilt S. (2024) New challenges in lakes recovering from nutrient loading. Kunming University (China) 04.07.2024

Hilt, S. (2024) Complex global change effects on freshwater primary producers. Institute of Biodiversity and Ecosystem Dynamics (IBED), University of Amsterdam (The Netherlands), 22.02.2024.

Hilt, S. (2023) Global change effects on lakes and their primary producers. Lund University (Sweden) 17.10.2023

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

DIVATOX wurde im Rahmen der Fördermaßnahme „BiodivGesundheit – Erforschung der Zusammenhänge zwischen Biodiversität und menschlicher Gesundheit“ gefördert und diente in erster Linie zur Konzeptionierung eines anschließenden dreijährigen kollaborativen Forschungsprojekts mit WissenschftlerInnen des Leibniz-Instituts für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB), der TU und FU Berlin, des Leibniz-Instituts für Arbeitsforschung Dortmund (IfADo) des Umweltbundesamts (UBA), unter Mitwirkung des Berliner Senats, des Berliner Landesamts für Gesundheit und Soziales und den Berliner Wasserbetrieben als Stakeholder. DIVATOX-2 konnte am 1. September 2024 starten.
Da die Stelle des Wissenschaftlers erst zum 01.08.2023 besetzt wurde, konnte die Phase 1 kostenneutral bis zum 31.08.2024 verlängert werden. Damit war ein nahtloser Übergang zwischen den beiden Förderphasen gewährleistet und die Arbeiten an DIVATOX-2 konnten ohne Verzögerung aufgenommen werden. Darüber hinaus blieb das Vorhaben innerhalb des im Förderantrag für die 1. Phase von DIVATOX beschriebenen Arbeits-, Zeit- und Kostenplans.
Die wichtigste Kostenposition waren während der Projektlaufzeit die Personalkosten sowie Ausgaben für Sachmittel. Für die Erreichung der Projektziele fiel bei den Mitarbeitern von DIVATOX ein erheblicher Arbeitsaufwand in Höhe von insgesamt 11,50 Personenmonaten an. Die Personalkosten beliefen sich auf 83.403,56 EUR. Im Rahmen des Projektes wurden für das Freiland-Screening und das Monitoring Sachmittel benötigt, wie Reaktionsgefäße, Filterspritzen und Chemikalien. Für den Aufbau der Kooperationsbeziehungen zwischen dem IGB und dem UBA sowie dem Berliner Senat, dem Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales und den Berliner Wasserbetrieben wurden Workshops durchgeführt, für die Cateringkosten anfielen. Insgesamt fielen in der Kostenposition 0843 Ausgaben in Höhe von 13.989,37 EUR an.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Aufgrund von Vergiftungsfällen bei Hunden und wirtschaftliche Schäden durch Strandsperrungen in Folge angespülten Wasserpflanzenmaterials, das mit cyanobakteriellen Neurotoxinen kontaminiert war, sind die erfolgten Projektarbeiten notwendig. Im Hinblick auf das imminente Gefahrenpotenzial erscheinen die innerhalb der einjährigen Konzeptionsphase von DIVATOX erzielten Fortschritte, insbesondere die Etablierung eines nachhaltigen Forschungs- und Stakeholdernetzwerks als angemessen. Die Finanzierung des Projekts war und ist für die Realisierung der dringend benötigten Grundlagendaten und die Einbindung von Entscheidungsträgern notwendig.

Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse und konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Auf Grundlage der Ergebnisse aus DIVATOX werden Handlungsempfehlungen in Zusammenarbeit mit institutionalen Stakeholdern (Umweltbundesamt, Berliner Senat, Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Berliner Wasserbetriebe, Landeslabor Berlin-Brandenburg) zum Nutzen der Gesellschaft abgeleitet. Der wissenschaftliche Anschluss and die abgeschlossene Projektphase wird mit der 2. Phase von DIVATOX realisiert. Der Einsatz einer Unterwasserdrohne wird die Möglichkeiten zur Erfassung und Charakterisierung der Biodiversität und das Vorkommen potenziell toxischer benthischer Cyanobakterien um ein Vielfaches vergrößern. Der in der Entwicklung befindliche Workflow zur metagenomischen Analyse Pflanzen-assoziierter Biofilme wird auf weitere Studien angewendet werden können und für folgende Untersuchungen als Methodenstandard etabliert. Aufgrund ihrer hohen Relevanz ist davon auszugehen, dass pflanzenassoziierte Cyanobakterien als neues Forschungsgebiet in der Limnologie etabliert werden. Die Nutzung weiterer innovativer Techniken zur Fernerkundung sowie die Anwendung von Feldtests zur Detektion toxischer Cyanobakterien-Stämme vor Ort werden in DIVATOX-2 adaptiert und geprüft. In Phase 2 von DIVATOX wird die Öffentlichkeitsarbeit durch Einbindung von Citizen Science und forcierter Wissenschaftskommunikation über soziale Netzwerke durch unsere Spezialistin auf diesem Gebiet

(Viola Liebich) auf ein neues Niveau gehoben. Diese Kanäle dienen sowohl der Überwachung von Seen durch engagierte BürgerInnen im Hinblick auf aktuelle Geschehnisse vor Ort als auch der Kommunikation von Erkenntnissen an die Öffentlichkeit.

Bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die Untersuchung von Wasserpflanzen-assoziierten Cyanobakterien, die Ursache von Vergiftungen sind, ist ein neuer Forschungszweig, weshalb sich bislang keine bekannten Erkenntnisse seitens anderer Stellen auf diesem Gebiet ergaben.

Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF

Meissner S, Stankovic N, Fastner J, Monaghan M, Hilt S (2025) Toxic cyanobacteria on aquatic plants – One-year monitoring of a temperate mesotrophic lake, in Bearbeitung