

**Untersuchungen zur Produktion von Cyanobacterin, einem Toxin
aus dem Cyanobakterium *Scytonema hofmanni* Ag. (UTEX1581)
– anwendungsbezogene und ökologische Aspekte**

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0039-2

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doktor rerum naturalium
(Dr.rer.nat.)

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock



von

Stefan Kacan

im

September 2007

gefördert durch:
**Hans Böckler
Stiftung** 

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Cyanobakterien – kosmopolitische „lebende Fossilien“	1
1.2	Cyanotoxine	2
1.3	Die Gattung <i>Scytonema</i>	3
1.4	Cyanotoxine aus der Gattung <i>Scytonema</i>	4
1.4.1	Das Cyanotoxin Cyanobacterin, synthetisiert von <i>Scytonema hofmanni</i>	5
1.5	Zielstellung	8
2.	Materialien und Methoden	9
2.1.	Kultivierung	9
2.1.1.	Das Cyanobakterium <i>Scytonema hofmanni</i> (Agardh) (UTEX1581)	9
2.1.2.	Photoautotrophe Mikroorganismen	9
2.1.3.	Cyprislarven von <i>Balanus improvisus</i> (Darwin)	10
2.2	Extraktionen und Analysen	10
2.2.1	Charakterisierung der Biomasse von <i>S. hofmanni</i>	11
2.2.1.1	<i>in vivo</i> Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz	11
2.2.1.2	Trockenmasse und Abundanz	11
2.2.1.3	Exponentielles Wachstum	12
2.2.1.4	Kapazität	12
2.2.2	Pigmente und Cyanobacterin	13
2.2.2.1	Chlorophyll <i>a</i> und Carotenoide	13
2.2.2.2	Cyanobacterin	13
2.2.3	Charakterisierung der Filtrate von <i>S. hofmanni</i> -Kulturen	15
2.2.3.1	pH-Wert und anorganische Nährstoffe	15
2.2.3.2	Freie gelöste Aminosäuren	16
2.2.3.3	Cyanobacterin	17
2.2.3.4	Kapazität und Raten	17
2.2.4	Parameter für Toxizitätstests mit photoautotrophen Mikroorganismen	17
2.2.4.1	Abundanz und Wachstum	17
2.2.4.2	Maximale Quantenausbeute des Photosystems II (Dark-Yield)	18

2.2.4.1.1	Bestimmung von Φ_{\max} mittels DCMU am Spektralfluorometer.....	18
2.2.4.1.2	Bestimmung von Φ_{\max} mit dem Puls-Amplituden modulierten Chlorophyllfluorometer	18
2.2.5	Extraktion potenzieller Effektoren aus Wachstumsmedien photoautotropher Mikroorganismen.....	19
2.3	Experimentdesign	19
2.3.1	Optimierung der Wachstumsbedingungen und der erreichbaren CB-Konzentration in <i>S. hofmanni</i> -Kulturen	20
2.3.1.1	Variation der Photonenflussdichte und der CO ₂ -Verfügbarkeit.....	20
2.3.1.2	Variation der Wachstumstemperatur	21
2.3.1.3	Variation von Nährstoffen und Spurenelementen	21
2.3.2	Interaktion von <i>S. hofmanni</i> mit photoautotrophen Mikroorganismen	22
2.3.2.1	Biotest mit <i>Chlorella vulgaris</i> und <i>Microcystis firma</i>	22
2.3.2.2	Einfluss von Exsudaten, Cyanotoxinen und Arginin auf die CB-Konzentration	23
2.3.3	Die Toxikologie von Cyanobacterin.....	23
2.3.3.1	Toxizität.....	23
2.3.3.1.1	Photoautotrophe Mikroorganismen	23
2.3.3.1.2	Cyprislarven von <i>B. improvisus</i>	24
2.3.3.2	Persistenz von Cyanobacterin.....	24
2.4	Statistik	25
3.	Ergebnisse	26
3.1	Optimierung der Wachstumsbedingungen von <i>S. hofmanni</i> -Kulturen.....	26
3.1.1	Variation der Photonenflussdichte und der CO ₂ -Verfügbarkeit.....	26
3.1.1.1	Kultivierung ohne Belüftung.....	26
3.1.1.2	Kultivierung mit Belüftung	29
3.1.1.3	Kultivierung mit 5% (v/v) CO ₂	30
○	Zusammenfassung Einfluss von PFD und CO ₂ -Verfügbarkeit	32
3.1.2	Variation der Wachstumstemperatur	32
○	Zusammenfassung Temperatur.....	36
3.1.3	Variation von Nährstoffen und Spurenelementen	36
3.1.3.1	Phosphat und Nitrat	36
3.1.3.2	Spurenelemente	37

○	Zusammenfassung Nährstoffe und Spurenelemente	38
3.1.4	Korrelationen der Abundanz	38
3.1.4.1	Korrelation der Abundanz mit der Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz	38
3.1.4.2	Korrelation der Abundanz mit dem pH-Wert.....	39
3.2	Optimierung der erzielbaren CB-Konzentration in <i>S. hofmanni</i> -Kulturen.....	39
3.2.1	Variation der Photonenflussdichte und der CO ₂ -Verfügbarkeit.....	39
3.2.2.1	Kultivierung ohne Belüftung	39
3.2.2.2	Kultivierung mit Belüftung ohne CO ₂ -Anreicherung	40
3.2.2.3	Kultivierung mit 5% (v/v) CO ₂	40
○	Zusammenfassung PFD und CO ₂ -Verfügbarkeit	41
3.2.2	Variation der Wachstumstemperatur	41
○	Zusammenfassung Temperatur und Zeit	43
3.2.3	Variation von Nährstoffen und Spurenelementen	44
3.2.3.1	Phosphat und Nitrat	44
3.2.3.2	Spurenelemente	44
○	Zusammenfassung Einfluss der Nährstoffsituation auf die CB-Konzentration in <i>S. hofmanni</i>	45
3.2.4	Korrelationen der CB-Konzentration in <i>S. hofmanni</i>	46
3.2.4.1	Korrelation der CB-Konzentration mit dem pH-Wert.....	46
3.2.4.2	Korrelation der CB-Konzentration mit der Abundanz	46
3.2.4.3	Bestimmung der CB-Konzentration in der Biomasse mittels DMF-Extraktion.....	47
3.2.5	CB-Konzentration im Medium.....	47
○	Zusammenfassung Korrelation der CB-Konzentration in <i>S. hofmanni</i> -Kulturen ...	48
3.3	Interaktionen von <i>S. hofmanni</i> mit photoautotrophen Mikroorganismen.....	48
3.3.1	Biotest mit <i>Chlorella vulgaris</i> und <i>Microcystis firma</i>	48
3.3.2	Einfluss von Exsudaten auf die CB-Konzentration.....	49
3.3.2.1	Abundanz und CB-Konzentration der Biomasse.....	49
3.3.2.2	Freie gelöste Aminosäuren im Medium photoautotropher Mikroorganismen	50
3.3.3	Cyanotoxine und Arginin	51
3.3.3.1	Abundanz und CB-Konzentration der Biomasse.....	51
○	Zusammenfassung Interaktionen von <i>S. hofmanni</i> mit photoautotrophen Mikroorganismen.....	52

3.4	Toxikologie von Cyanobacterin	52
3.4.1	Toxizität.....	52
3.4.1.1	Photoautotrophe Mikroorganismen	52
3.4.1.2	Cyprislarven von <i>Balanus improvisus</i>	54
3.4.2	Persistenz im Flusswasser	54
○	Zusammenfassung Toxizität von Cyanobacterin	55
4.	Diskussion	56
4.1	Kultivierung von <i>S. hofmanni</i>	56
4.1.1	Optimale Kultivierung für eine maximale Cyanobacterin-Ausbeute.....	56
4.1.2	Überwachung der Biomasse und der Cyanobacterinkonzentration während der Kultivierung von <i>Scytonem hofmanni</i>	61
4.1.2.1	Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz als Biomasseparameter.....	61
4.1.2.2	Methodenvergleich der Cyanobacterinextraktion mit TBE und DMF.....	62
4.2	Anwendung von Cyanobacterin als natürliches Herbizid	63
4.3	Ökologie von <i>S. hofmanni</i>	64
4.4	Allelopathische Interaktionen von <i>S. hofmanni</i>	67
4.5	Hinweise auf Biosynthese von Cyanobacterin	70
5.	Zusammenfassung	73
6.	Ausblick	75
7.	Literatur	76
	Anhang	I
I	Abkürzungsverzeichnis.....	I
I.1	Variation des BG11 - Mediums.....	III
I.2	Variation der Spurenelemente nach STANIER et al. (1971)	III
I.3	Einbuchstaben-Codierung der Aminosäuren.....	III
I.4	Toxikologie.....	IV
II	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	V
III	Medien	X
III.1	Zusammensetzung des BG11-Mediums (RIPPKA et al., 1979).....	X

III.2	Stammlösungen der Spurenelemente nach STANIER et al. (1971).....	X
III.3	f/2 +Si Medium nach GUILLARD et al. (1975).....	XI
IV	Reagenzien.....	XII
IV.1	Reagenzien zur Phosphatbestimmung	XII
IV.2	Reagenzien zur Ammoniumbestimmung	XII
V	Futterkulturen für die Adulti und Nauplien von <i>B. improvisus</i>	XII
V.1	Kultivierung von <i>Sceletonema costatum</i>	XII
V.2	Kultivierung von <i>Artemia spec.</i>	XII

Danksagung

Erklärung

Lebenslauf

Publikationen und Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen

1. Einleitung

1.1 Cyanobakterien – kosmopolitische „lebende Fossilien“

Prokaryonten sind die ältesten nachgewiesenen Organismen der Erde. Es ist anzunehmen, dass alle rezenten metabolischen Systeme bereits bei den Prokaryonten des frühen Präkambriums vor 3,5 bis 2,5 Milliarden Jahren entwickelt waren, um den Energiebedarf aus der Reduktion organischer Substanzen zu decken (GOLUBIC, 1977). Photosynthetische Bakterien begannen das Sonnenlicht als Energiequelle und Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Mit der Entwicklung des zweiten Photosystems konnte der Wasserstoff des Wassers zur Reduktion des Kohlenstoffes verwendet werden. Damit hatten die Cyanobakterien einen entscheidenden Einfluss auf die Sauerstoffanreicherung der damals noch anaeroben Atmosphäre. Darüber hinaus sind einige Cyanobakterien in der Lage, atmosphärischen Stickstoff zu fixieren. Die Stickstofffixierung findet unter Sauerstoffausschluss in den Heterocysten statt. Ein Organismus, der nur Kohlendioxid, Sonnenlicht und Wasser zum Leben benötigt und Stickstoff aus verschiedenen Quellen nutzt, kann sich praktisch überall auf der Erde entwickeln. So besiedeln Cyanobakterien sowohl terrestrische als auch limnische und marine aquatische Habitate. Als photolithoautotrophe Bakterien sind Cyanobakterien in der Lage, verschiedene ökologische Nischen auch unter extremen Umweltbedingungen als Lebensräume zu nutzen. So besiedeln sie z.B. heiße Quellen, Wüstengebiete und antarktische Seen (PAPKE et al., 2003; GARCIA-PICHEL et al., 2001; NADEAU & CASTENHOLZ, 2000). Die anpassungs- und widerstandsfähigen Cyanobakterien können vorübergehende Austrocknung, Temperaturschwankungen, Sauerstoffmangel, erhöhte Strahlenbelastungen oder wechselndes Nährstoffangebot tolerieren. In der Natur kommen Cyanobakterien nicht isoliert vor. Sie sind Bestandteil planktischer oder benthischer Lebensgemeinschaften. Ein Beispiel der benthischen Assoziationen sind cyanobakterielle Matten entweder in organosedimentären Strukturen oder als so genannte „Floating mats“ (MARGULIS et al., 1980; MCCORMICK et al., 1997). Einige Cyanobakterien leben in Symbiose mit Eukaryoten, wie Pilzen, Algen, Pflanzen und Tieren (SERGEEVA et al., 2002). Das bedeutet, dass sich diese Kosmopoliten im Lauf der Evolution in hohem Maße an abiotische und biotische Umweltbedingungen anpassen mussten. So können individuelle Zellen als Teil von Gemeinschaften sogar ihre Morphologie, Physiologie und Biochemie verändern (TANDEAU DE MARSAC & HOUMARD, 1993; COSTERTON et al., 1995).

1.2 Cyanotoxine

Eine Möglichkeit in der Auseinandersetzung mit der abiotischen und biotischen Umwelt ist die Synthese von Sekundärmetaboliten. Für das Wachstum und die Vermehrung sind sie primär nicht notwendig. In den letzten Jahrzehnten wurden viele Substanzen isoliert, charakterisiert und vor allem für medizinische Zwecke genutzt. Häufig ist die ursprüngliche Funktion dieser Substanzen unbekannt. Meistens steht sie jedoch in direktem Zusammenhang mit den Lebensbedingungen im natürlichen Habitat. Viele bioaktive Substanzen haben ihren Ursprung in mikrobiellen Gemeinschaften. Hier können sie für die Balance und die Sukzession verantwortlich sein (SMITH & DOAN, 1999). Die Bildung ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, wie Wachstumsbedingungen, Wachstumsphase, Induktion oder Inhibition bestimmter Enzyme (GREVE, 2005). Sie gehören zu unterschiedlichen Substanzklassen, wie z. B. Peptiden, Alkaloiden, Laktonen, Terpenen, Lipiden. Viele Sekundärmetabolite von Cyanobakterien weisen eine erhebliche Toxizität auf. Eine Vielzahl dieser Cyanotoxine wurde mit stickstofffixierenden Cyanobakterien assoziiert (KAEBERNICK & NEILAN, 2001).

Im Folgenden werden einige Cyanotoxine exemplarisch vorgestellt. Von ihnen sind wohl die Microcystine am besten untersucht, weil die produzierenden Arten wie *Microcystis aeruginosa* besonders häufig vorkommen. Außerdem können die Microcystine bereits in geringen Konzentrationen auch auf Mensch und Tier extrem toxisch wirken. Bisher wurden mehr als 60 Strukturvarianten dieser Peptide beschrieben. Alle Microcystine bestehen aus einer Vielzahl teilweise ungewöhnlicher Aminosäuren, wie z.B. ADDA (3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeka-4,6-diensäure). Die toxische Wirkung wird durch irreversible Hemmung der Proteinphosphatasen 1 und 2A hervorgerufen. Dadurch kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Phosphatasen und Kinasen und einer Hyperphosphorylierung von Proteinen im Cytosol bzw. des Cytoskeletts (BÖRNER, 2001). Neben *Microcystis*-Arten wurden Microcystine auch in *Anabaena*-, *Nostoc*- und *Planktothrix*-Arten identifiziert (SHIRAI et al., 1991, LAWTON et al., 1994, BARTRAM & CHORUS, 1999). Nodularine werden von *Nodularia spumigena* gebildet. Sie haben eine den Microcystinen vergleichbare Bioaktivität. Im Gegensatz zu diesen bestehen Nodularine nur aus fünf Aminosäuren (z.B. BEATTIE et al., 2000). Bereits Anfang der neunziger Jahre wurden cyanobakterielle Peptide mit antifungalen Eigenschaften beschrieben. Unter ihnen die Laxaphycine, welche aus dem Extrakt von *Anabaena laxa* isoliert wurden (FRANKMOELLE et al., 1992).

Außer Peptiden werden von Cyanobakterien auch Alkaloide produziert. Cylindrospermopsin wurde aus *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans* und *Aphanizomenon ovalisporum*

rum isoliert. Cyindrospermopsin ist ein Alkaloid mit einer zyklischen Guanidingruppe und ruft Schädigungen an Leber, Niere, Thymus und Herz hervor (MOORE et al., 1993).

Viele Alkaloide wirken als Neurotoxine, die in die Umgebung abgegeben werden. Das erste, ausführlich charakterisierte Cyanotoxin, Anatoxin-A, wird von *Anabaena flos-aquae* gebildet. Anatoxin-A zeigt agonistische Wirkung an Cholin-Rezeptoren der Postsynapse (CARMICHAEL et al., 1979). Die Acetylcholinesterase ist nicht in der Lage, das Toxin abzubauen. Dies führt dazu, dass sich unmittelbar Vergiftungserscheinungen bis zum Tod zeigen (DRAISCI et al., 2001). Die Aphantoxine (Tetrahydropurinalkaloide) z. B. aus *Aphanizomenon flos-aquae* gehören bislang zu den giftigsten bekannten Cyanotoxinen. Sie wirken über eine Unterbrechung der Erregungsleitung, indem sie Natriumionenkanäle blockieren. Der Tod tritt durch Lähmung der Atemmuskulatur ein. Die letale Dosis liegt bei $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ Körpergewicht (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986). Außerdem wirken viele dieser Toxine herbizid, indem sie den Elektronentransport des Photosystems II hemmen. Die Pyrrolidinone Fischerellin A und B aus *Fischerella musciola* sind ebenfalls wirksame Herbizide (GROSS et al., 1991, PAPKE et al., 1997).

Als erstes Toxin der *Scytonemataceae* wurde Cyanobacterin von MASON et al. (1982) aus *S. hofmanni* charakterisiert. Cyanobacterin ist ebenfalls ein starkes Herbizid (vgl. 1.4.1). In dieser Arbeit ist sowohl das Cyanotoxin Cyanobacterin als auch das produzierende Cyanobakterium *Scytonema hofmanni* Ag. (UTEX B 1581) Gegenstand der Untersuchungen.

1.3 Die Gattung *Scytonema*

Die Gattung *Scytonema* gehört zur Familie der *Scytonemataceae* und in die Ordnung der *Nostocales* (KOMAREK & ANAGNOSTIDIS, 1989). Die Trichome von *Scytonema* sind isopolar und mit einer Bündelscheide umgeben. Die Zellen sind diskoid und die Endzelle ist abgerundet. Durch falsche Verzweigungen werden moosartig verzweigte Kolonien gebildet. *Scytonema*-Arten besitzen Heterocysten und können Luftstickstoff fixieren (Abb. 1).

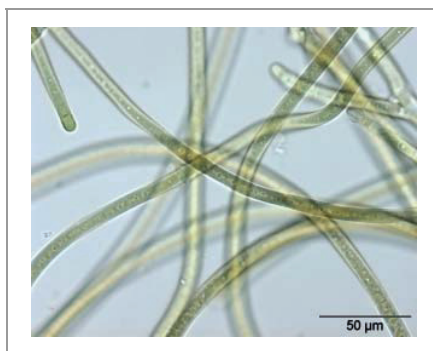


Abb. 1: *Scytonema hofmanni* (UTEX 1581); 40fache Vergrößerung, Mikroskop IX70, Olympus Ltd., Durchlicht

Scytonema-Arten wurden sowohl im terrestrischen als auch im aquatischen Milieu beschrieben. Auf feuchten Felsen, Holz und Boden formen sie raue, filzige Matten. In oligotrophen Seen sind sie ein wesentlicher Bestandteil des Periphytons (BOLD & WYNNE, 1985; HAWES & SMITH, 1994). In den Reisfeldern Indiens trägt die Art *Scytonema hofmanni* wesentlich zur Stickstoffakkumulation im Boden bei (GUPTA, 1966). In den Everglades ist *S. hofmanni* ein wesentlicher Bestandteil der „Floating mats“ und des Bewuchses auf den Stängeln von *Eleocharis*, *Cladium* und *Nymphaea*. Während der Regenzeit dominiert diese Art zusammen mit *Chroococcus turgidus* das Epiphyton (vgl. MASON et al., 1982, MCCORMICK et al., 1999). Das Vorkommen von *S. hofmanni* wurde bisher zwar mehrfach beschrieben, jedoch gibt es bislang keine ökologische Charakterisierung dieser Art.

1.4 Cyanotoxine aus der Gattung *Scytonema*

Aus einigen Arten der Gattung *Scytonema* wurden einzelne Cyanotoxine mit verschiedenen antibiotischen Wirkungen isoliert. Sie gehören diversen Substanzklassen an.

Scytonema sp. TISTR 8208 synthetisiert ein Peptid-Antibiotikum gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, das aus aromatischen Aminosäuren aufgebaut ist. (CHETSUMON et al., 2005). Aus *Scytonema hofmanni* PCC 7110 wurden peptidische Substanzen charakterisiert. Dabei handelt es sich um die cyclischen Peptide Scyptolin A und B und Hofmannolin sowie um Scytcyclamide A bis C mit cytotoxischer und enzyminhibierender Wirkung (MARTEN et al., 2003; GREVE, 2005). Ein potentes anti-HIV-Peptid wurde aus *Scytonema varium* isoliert. Scytovirin bindet spezifisch an das hoch glycosylierte virale Hüllprotein gp120, gp160 und gp41 des HI-Virus, jedoch nicht an den zellularen CD4 Rezeptor oder andere getestete Proteine (BOKESCH et al., 2003).

Aus *Scytonema pseudohofmanni* wurden von ISHIBASHI et al. (1986) fünf cytotoxische und antifungale Alkaloide, Scytophycin A bis E, isoliert und charakterisiert. Tolytoxin und noch

drei weitere Scytophycine werden von *S. mirabile*, *S. burmanicum* und *S. ocellatum* synthetisiert (CARMELI, 1990). Tolytoxin zerstört die Actinmikrofilamente der Zellen durch Depolymerisation. Glycolipide, die in den Prozess der Blutgerinnung eingreifen wurden aus *Scytonema julianum* gewonnen. Sie sind in der Lage, den Platelet-activating-Faktor zu inhibieren und führen zur Aggregation der Blutplättchen im Kaninchenblut (ANTONOPOULPU et al., 2005).

1.4.1 Das Cyanotoxin Cyanobacterin, synthetisiert von *Scytonema hofmanni*

Cyanobacterin ist ein chloriertes γ -Lacton und weist Absorptionsmaxima bei Wellenlängen von 208 und 266 nm auf. In wässriger Lösung ist es schwerlöslich (Abb. 2). Die relativ aufwendige Extraktion von Cyanobacterin erfolgt über mehrere Schritte mit tert-Butyl-Methylether (TBE). In dem so gewonnenen Rohextrakt wird die Cyanobacterinkonzentration mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) bestimmt (vgl. 2.2.2.2). Gleichzeitig mit Cyanobacterin wird die Anhydro-Form (ACB) isoliert. Die Substanzen liegen im Verhältnis von 3:1 (CB:ACB) vor. (MASON et al., 1982; PIGNATELLO et al., 1983). Konkrete Aussagen über die Konzentration von Cyanobacterin in der Trockenmasse von *S. hofmanni* werden erst nach etwa einer Woche erhalten.

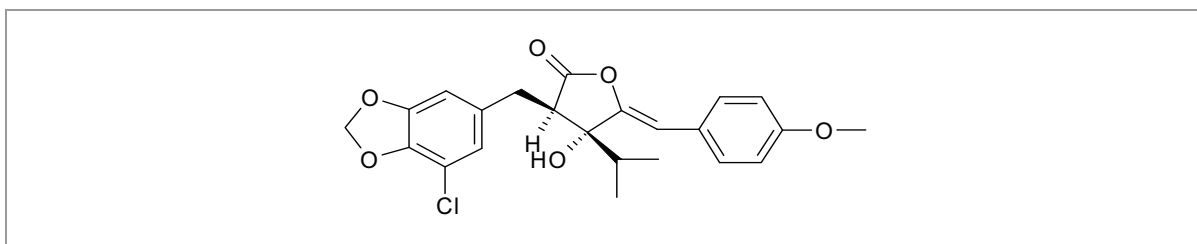


Abb. 2: Strukturformel von Cyanobacterin (nach PIGNATELLO et al., 1983)

Der Wirkmechanismus des von *Scytonema hofmanni* synthetisierten Toxins Cyanobacterin (CB) ist bereits gut untersucht. Mehrere Autoren (z.B. MASON et al., 1982; PIGNATELLO et al., 1983; ABARZUA et al., 1999) beschrieben toxische Wirkungen von Cyanobacterin auf andere Cyanobakterien, Algen und Angiospermen. Es wurde nachgewiesen, dass Cyanobacterin, ähnlich wie synthetische Herbizide, z.B. DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff), auf den Elektronentransport in der Photosynthese im Photosystem II wirkt (z.B. GLEASON & PAULSON, 1984). Über mögliche toxische Wirkungen auf heterotrophe Organismen gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. So konnten einerseits keine Wirkungen auf Tiere festgestellt werden (GLEASON, 1991). Andererseits beschrieb K LAPES (1990) eine akute Toxizität gegenüber dem Wasserfloh *Daphnia magna* schon bei den zur Photosynthesehemmung notwendigen Konzentrationen.

Cyanotoxine werden auch hinsichtlich ihrer Eignung als Antifoulingwirkstoffe untersucht. Sie sollen alternativ synthetische Substanzen ersetzen, die z.B. durch Akkumulation im Wasser und in Sedimenten eine starke Schädigung von Ökosystemen bewirken können. Wegen der nachgewiesenen toxischen Effekte anderer Cyanotoxine auf tierische Lebewesen und der strukturellen Ähnlichkeit von Cyanobacterin mit Repellentien wie Homoserin-Lacton, wurden inhibitorische Effekte auf das Anheftungsverhalten von Foulingorganismen vermutet (ABARZUA et al., 1999; ARMSTRONG et al., 2001). Angesichts der herbiziden Eigenschaften von Cyanobacterin und der möglichen Beeinflussung von Makrofoulingorganismen existieren bereits zwei Patente zur technischen Nutzung dieses Cyanotoxins für den Einsatz in der Landwirtschaft (GLEASON, 1986) und als natürlicher Antifouling-Wirkstoff (ABARZUA, 1996).

Somit wird Cyanobacterin für die technische Verwendung in größerem Umfang benötigt.

In der Arbeitsgruppe Mason und Gleason (Universität Minnesota, St. Pauls, USA) wurden bei der Kultivierung von *S. hofmanni* etwa 2 g Frischmasse (400 mg Trockenmasse) je Liter Kultur gewonnen. Die Cyanobacterinkonzentration in der Trockenmasse betrug kontinuierlich etwa 2 mg Cyanobacterin je Gramm Trockenmasse (mg CB g TM^{-1}) (MASON et al., 1982; mündliche Angaben GLEASON, 2003). Im Gegensatz dazu wurden in der Arbeitsgruppe Abarzua (Universität Rostock) auch wesentlich höhere Konzentration an Cyanobacterin in *S. hofmanni* erhalten. Es traten allerdings beträchtliche Schwankungen auf. So wurden Konzentration zwischen 0 und 29 mg CB g TM^{-1} ermittelt. (vgl. Tab. 1, Auswahl)

Charge	c_{CB} [mg CB g TM^{-1}]	Charge	c_{CB} [mg CB g TM^{-1}]
FKG	2,6	IGV2	0,0
BCH1	12,6	IGV3	0,1
BCH2	28,9	IGV6	2,7
BCH3	10,0	Med 1 (Wand)	3,9
ÖKO1	0,7	Med 1 (Mitte)	9,8
IGV1	0,1	Med 2	9,5

Tab. 1: Cyanobacterinkonzentration [mg CB g TM^{-1}] in verschiedenen Chargen von *S. hofmanni*. FKG: Kultivierung, Prof. Gleason (University of Minnesota, USA), BCH: Kultivierung, Biochemie (Universität Rostock, Deutschland), ÖKO: Kultivierung, Angew. Ökologie (Universität Rostock, Deutschland), IGV: Kultivierung in Platten-Fotobioreaktor, Inst. f. Getreideverarbeitung, Abteilung Biotechnologie der Algen (Bergholz-Rehbrücke, Deutschland) Med: Kultivierung in MEDUSA-Fotobioreaktoren, Institut für Biotechnologie (TU Berlin, Deutschland)

	Rostock	St. Pauls
<i>S. hofmanni</i> -Stamm	UTEX 1581	UTEX B 1581 und UTEX 2349
Medium	BG11	BG11 ^{*1}
Spurenelemente ^{*2}	nein	ja
pH-Wert (Start)	7,7	7,7
CO ₂ [% (v/v)]	3	0 oder 5
Temperatur [°C]	20 - 25	20 oder 20 - 25
PFD [$\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	15 - 25	50 – 80
Belichtungszyklus	Dauerlicht	Dauerlicht oder H:D 12:12
Ernte nach Tagen:	21-28	14-35

Tab. 2: Vergleich der Kultivierungsbedingungen von *Scytonema hofmanni* in den Arbeitsgruppen Abarzua (Rostock) und Mason / Gleason (St. Pauls). ^{*1} mit 0,4 statt mit 0,04 g l⁻¹ K₂HPO₄; ^{*2} nach STANIER et al. (1971)

Vergleicht man die Kultivierungsbedingungen, so weisen sie einige Variationen auf (Tab. 2). *Scytonema hofmanni* wurde erfolgreich mit für Cyanobakterien etablierten Methoden empirisch kultiviert. Jedoch war bisher der Einfluss der Kulturbedingungen auf die Toxinkonzentration nicht Ziel von Untersuchungen. Um Cyanobacterin für einen technischen Einsatz in großem Maßstab zu produzieren, muss die Kultivierung unter ökonomischen Gesichtspunkten erfolgen. Das heißt, mit geringem Aufwand muss viel Biomasse mit einem konstant hohen Toxingehalt produziert werden. Auf Grund der langen Zeit, die zur Bestimmung der Cyanobacterinkonzentration notwendig ist (s.o.), ist die TBE-Extraktion für ein effektives Monitoring und eine schnelle gezielte Steuerung der biotechnologischen Produktion von Cyanobacterin nicht geeignet.

1.5 Zielstellung

Auf Grund der beschriebenen Tatsachen ergaben sich für die vorliegende Promotionsarbeit zwei generelle Fragenkomplexe:

I. Technische Verwendung von Cyanobacterin:

1. Welche Kultivierungsbedingungen sind Voraussetzung für eine hohe Biomasseproduktion von *Scytonema hofmanni* mit einer hohen Cyanobacterinakkumulation?
2. Ist eine technische Verwendung von Cyanobacterin als Herbizid oder Antifoulant sinnvoll?
3. Lässt sich die Cyanobacterinkonzentration in der Biomasse von *Scytonema hofmanni* schneller und weniger aufwendig als mit der TBE-Extraktion und anschließender Analyse mittels HPLC ermitteln?

II. Ökologie:

1. Welche Schlüsse lassen sich aus den optimalen Kultivierungsbedingungen hinsichtlich der Ökologie von *Scytonema hofmanni* im natürlichen aquatischen Habitat ziehen?
2. Spielen Interaktionen mit anderen photoautotrophen Organismen für die Synthese von Cyanobacterin eine Rolle?

2. Materialien und Methoden

2.1. Kultivierung

2.1.1. Das Cyanobakterium *Scytonema hofmanni* (Agardh) (UTEX1581)

Die Untersuchungen erfolgten mit dem Cyanobakterium *Scytonema hofmanni* (Agardh) Stamm UTEX B 1581 (Culture Collection of Algae at the University of Texas, Austin, USA). In der Stammhaltung wurde *S. hofmanni* unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur im Cyanobakterienmedium BG11 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), modifiziert nach RIPPKA et al. (1979) (s. Anhang) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte ohne aktive Belüftung bei einer Photonenflussdichte (PFD) von 20–30 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit Tageslicht Leuchtstoffröhren (36W/ 12-950, OSRAM GmbH) und bei einem Hell- / Dunkelrhythmus von 12:12 Stunden (H:D 12:12).

Aus den Stammkulturen wurden Vorkulturen unter den gleichen Bedingungen, aber mit Belüftung (5 ml min^{-1}) über vier Wochen herangezogen. Diese Biomasse wurde unter sterilen Bedingungen gewonnen und im Mörser homogenisiert. Die gleichmäßig dispergierten Zellen wurden in steriles BG11 Medium (pH 7,7) überführt. Zur Charakterisierung der Kultivierungen wurde als Biomasseparameter die *in vivo* Chlorophyll *a* Fluoreszenz (FL) (vgl. 2.2.1.1) bestimmt. Bei allen unterschiedlichen Versuchsansätzen lag die Initialfluoreszenz im Bereich von 150–300 mV. Das entsprach einer Abundanz von 20–40 mg Trockenmasse (TM) je Liter (ca. 100–200 mg Frischmasse (FM)) je Liter; vgl. 2.2.1.2). Nachfolgend wurden die Kultivierungsbedingungen entsprechend des Experimentdesigns (vgl. 2.3) variiert.

2.1.2. Photoautotrophe Mikroorganismen

Die Kulturen der Grünalge *Chlorella vulgaris* (Beijerinck) SAG211-11b (Sammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen, Deutschland) sowie der Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC6803 (Institut Pasteur, Collection National de Cultures de Microorganismes, Paris Cedex, Frankreich) und *Microcystis firma* (Bréb et Lenorm) Schmidle, Gromov/Leningrad 398 wuchsen unter den gleichen Bedingungen wie *S. hofmanni*. Die mesoeuryhaline Kieselalge *Nitzschia pusilla* (Grunow) wurde in Form eines Isolates aus dem Jadebusen (vgl. ABARZUA et al., 1999) bei 75 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (H:D 12:12) und bei 15 °C im Diatomeen-Medium f/2, modifiziert nach GUILLARD (1975) mit sterilem Ostseewasser bei 12 PSU (Practical Salinity Units) kultiviert. Zu Beginn der Inkubationen der photoautotrophen Mikroorganismen wurden Abundanzen von 0,075–0,1 10^6 Zellen ml^{-1} eingestellt.

2.1.3. Cyprisarven von *Balanus improvisus* (Darwin)

Zur Kultivierung der Cyprisarven von *Balanus improvisus* (Darwin) wurden adulte Seepocken am Fährleger in Hohe Düne und in der Unterwarnow (Rostock, Deutschland) gesammelt. Die Adulti wurden bei Raumtemperatur im filtrierten, autoklavierten und leicht belüfteten Ostseewasser (12 PSU) gehalten. Die Fütterung erfolgte alle zwei Tage mit Zellen der Kieselalge *Skeletonema costatum* (CCAP 1077/3) (Culture Collection of Algae and Protozoa, Argyll, Schottland, Großbritannien). Zusätzlich wurden wöchentlich frisch geschlüpfte Nauplien von *Artemia* spec. (Red Dragon™, Western Brine Shrimp International, Inc.) (nach RITTSCHOF et al., 1984) gereicht.

Die von den Adulti ins Medium entlassenen Nauplien wurden nach Abdunklung des Zuchtbeckens aufgrund ihres positiv phototaktischen Verhaltens in einer beleuchteten Ecke gewonnen. Die Hälterung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den Adulti. Dem Medium waren die Antibiotika Penicillin G (2 mg l⁻¹) und Streptomycin (4 mg l⁻¹) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zugesetzt. Die Nauplien erhielten täglich *S. costatum*. Das Medium wurde für die Nauplien-Kultur alle zwei Tage gewechselt. Nach zwei bis drei Wochen erfolgte die Metamorphose zur Cyprisarve. Unter dem Mikroskop wurde der Zustand der Larven hinsichtlich der Bedeckung mit Bakterien bzw. Pilzen, der Aktivität und der Existenz von Degenerationen beurteilt. Für die Toxizitätstests wurden nur Cyprisarven ausgewählt, die kaum bewachsen waren und eine hohe Aktivität (z.B. aktives Suchverhalten) aufwiesen. Zur Synchronisation des Anheftungsverhaltens wurden sie vier Tage im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt. Die Balanidenzucht erfolgte nach KACAN (1997).

2.2 Extraktionen und Analysen

Die Optimierung der Wachstumsbedingungen von *S. hofmanni* und der erzielbaren CB-Ausbeute erfolgte sowohl anhand von Parametern für die Biomasse als auch für das die Zellen umgebende Medium (Abb. 3).

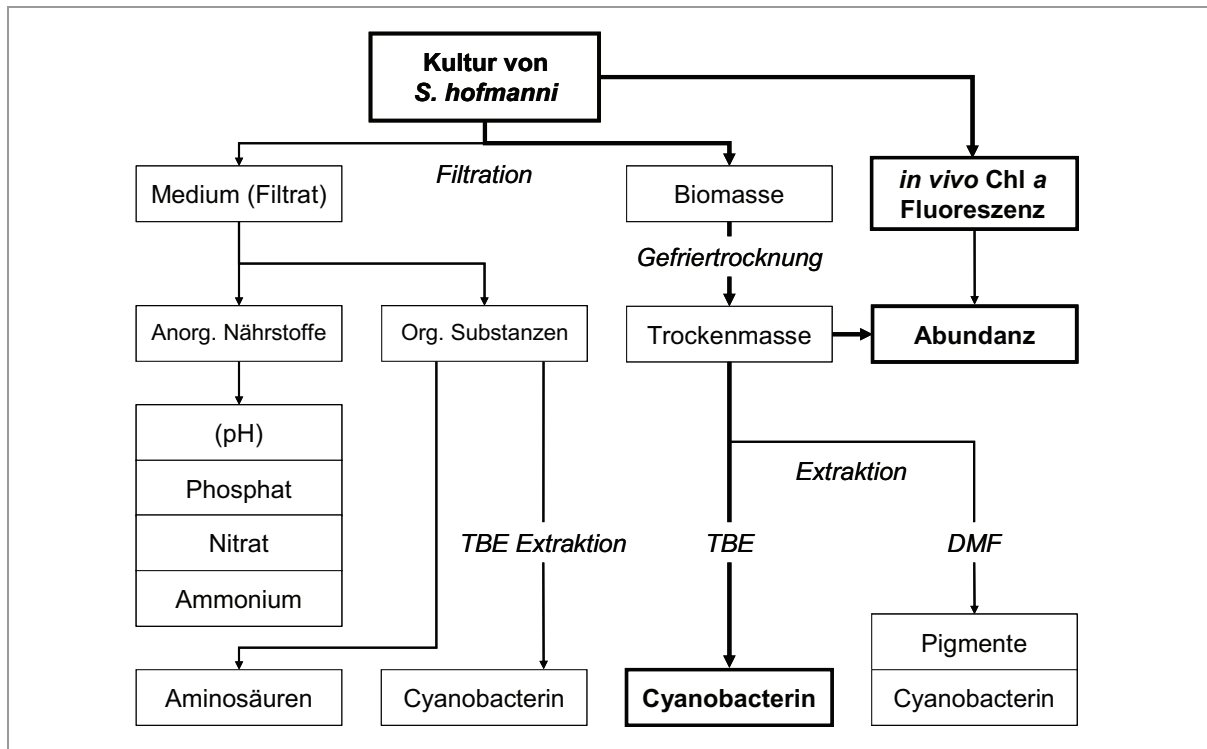


Abb. 3: Grundlegendes Schema der Parametrisierung von Untersuchungen zur Optimierung der *S. hofmanni*-Kultur und der Cyanobacterin (CB) -Ausbeute. Chl *a*: Chlorophyll *a*, TBE: tert-Butylmethylether, DMF: N,N-Dimethylformamid

2.2.1 Charakterisierung der Biomasse von *S. hofmanni*

2.2.1.1 *in vivo* Chlorophyll *a* Fluoreszenz

Die Bestimmung der Chlorophyll *a* Fluoreszenz erfolgte nach KARSTEN et al. (1996) an einem Fluorimeter für phototrophe Mikroorganismen in Polypropylen-Einweg-Küvetten (\varnothing 50 mm, Kleinfeld Labortechnik GmbH). Chlorophyll *a* (Chl *a*) wurde bei 470 nm (Blaulicht) mit Leuchtdioden angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde als Spannungsänderung [mV] registriert. Die Messung erfolgte im Bereich zwischen 130 mV (Blindwert Medium) und 1500 mV (Maximalwert, justiert mit Glasfilter orange (RG 129 665, Schott AG)). Proben mit Signalen oberhalb des justierbaren Messbereiches wurden verdünnt; die Signale nachfolgend proportional zur Verdünnung transformiert.

2.2.1.2 Trockenmasse und Abundanz

Da *S. hofmanni* dichte verzweigte Kolonien bildet, waren eine direkte Zellzählung und damit die Berechnung der Abundanz [Zellen ml⁻¹] nicht möglich. Somit wurde die Trockenmasse (TM) als Äquivalent der Abundanz [mg TM l⁻¹] genutzt. Hierfür erfolgte die Filtration von *S.*

hofmanni mittels Unterdruck auf Papierfilter (S13400, Ø 50 mm, Satorius AG). Nach 48 h Gefriertrocknung (Lyovac GT2, Steris Corp.) wurde die Trockenmasse bestimmt.

Zur praktikablen Ermittlung der Abundanz-Äquivalente [mg TM l^{-1}] von *S. hofmanni* wurde mit Hilfe der gemessenen Chlorophyll *a* Fluoreszenz *in vivo* (vgl. 2.2.1.1) ein einfaches Konversionsmodell entwickelt.

$$\text{Abundanz-Äquivalente } [\text{mg TM l}^{-1}] = \text{FL} \times 0,0494$$

Das Modell gilt für vitale und ungestresste Zellen von *S. hofmanni* bei $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unabhängig von Temperatur und Zeit.

Die Verwendung des Begriffes „Abundanz“ erfolgt in der vorliegenden Arbeit im Sinne der Vereinfachung, obwohl streng genommen durchweg Abundanz-Äquivalente ermittelt wurden.

2.2.1.3 Exponentielles Wachstum

Anhand der Parameter Abundanz und / oder der *in vivo* Chlorophyll *a* Fluoreszenz wurde die exponentielle Wachstumsrate (μ) [d^{-1}] nach SCHLEGEL et al. (1995) von Messpunkt zu Messpunkt berechnet.

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}$$

μ Wachstumsrate [d^{-1}]

t Zeitpunkt t (Anzahl der Messtage)

N_t Parameter (Abundanz oder FL) zum Zeitpunkt t

N_0 Parameter (Abundanz oder FL) zum Zeitpunkt t_0

Die Güte der Anpassung der modellierten Kurve an die gemessenen Daten wurde über Minimieren der Summe der Abweichungsquadrate mit Hilfe der Solverfunktion (MS Excel) optimiert.

Bei geringer Anzahl an Messwerten (z.B. bei wöchentlicher Messung) wurde die Wachstumsrate zwischen t_0 und t_{K50} (Zeit, bei der der halbmaximale Wert der Fluoreszenz oder der Abundanz erreicht wurde) mit N_0 und N_{K50} (halbmaximaler Wert) berechnet. Die Werte beider Methoden sind vergleichbar.

2.2.1.4 Kapazität

Um die Ergebnisse verschiedener Kultivierungsmethoden, insbesondere von unterschiedlichen Erntezeitpunkten, vergleichen zu können, wurde die Kapazität (K) (maximal erreichbarer Wert eines Parameters) ermittelt. Die Berechnung erfolgte mit SigmaPlot 2002 für Windows Version 8.0 mittels „standard four parameter logistic curve“.

2.2.2 Pigmente und Cyanobacterin

2.2.2.1 Chlorophyll *a* und Carotenoide

In Abhängigkeit von der Abundanz wurden für die Pigmentanalyse 1–10 ml von *S. hofmanni*-Kultur auf Glasfaserfilter (GF92, Ø 25 mm, Schleicher & Schüll GmbH) filtriert. Die Filter wurden über 24 h gefriergetrocknet und nachfolgend die Trockenmasse mittels Feinwaage (LA 1205, Satorius AG) bestimmt. Die Trockenmasse wurde im Ultraschallbad mit 3 ml N,N-Dimethylformamid (DMF) (3 x 30 min) extrahiert. Nach 24 h bei 5 °C wurde der Ansatz erneut im Ultraschallbad (3 x 30 min) behandelt. Um eine partikelfreie Lösung zu erhalten, wurde der Extrakt anschließend für 5 min bei 5200 g und 10 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus instruments GmbH) zentrifugiert.

Das Adsorptionsspektrum der DMF-Extrakte wurde in Halbmikroküvetten (6040-UV, light path 10 mm, Hellma GmbH & Co. KG) im Spektralphotometer (UV-2401 PC, UV-VIS Recording, Shimadzu Ltd. Corp.) im Spektralbereich von 200–800 nm, in 0,5 nm-Schritten aufgenommen. Die Konzentrationen von Chlorophyll *a* bzw. Carotenoiden [$\mu\text{g mg TM}^{-1}$] wurde nach PORRA et al. (1989) und SCHUBERT et al. (2004) bestimmt. Da Cyanobakterien kein Chlorophyll *b* besitzen, wurden für Chl *b* Werte ≤ 0 bestimmt.

$$\begin{aligned}
 1. \quad c_{\text{Chl } a} [\mu\text{g mg TM}^{-1}] &= 12,00(E_{664} - E_{750}) - 3,11(E_{647} - E_{750}) \\
 2. \quad c_{\text{Chl } b} [\mu\text{g mg TM}^{-1}] &= 20,78(E_{647} - E_{750}) - 4,88(E_{664} - E_{750}) \\
 3. \quad c_{\text{Car}} [\mu\text{g mg TM}^{-1}] &= \frac{1000(E_{480} - E_{750}) - 1,12c_{\text{Chl } a} - 34,07c_{\text{Chl } b}}{245}
 \end{aligned}$$

E_{480} – Extinktion bei 480 nm (Absorption von Carotenoiden)

E_{647} – Extinktion bei 647 nm (Absorption von Chlorophyll *b*)

E_{664} – Extinktion bei 664 nm (Absorption von Chlorophyll *a*)

E_{750} – Extinktion bei 750 nm (Trübung)

2.2.2.2 Cyanobacterin

Die Extraktion von Cyanobacterin erfolgte nach MASON et al. (1982). 100 mg TM des Cyanobakteriums *S. hofmanni* wurden mit 2,7 ml einer 0,5-%igen gepufferten Lysozym-Lösung (Eiweiß - Lysozym: EC 3.2.1.17, Sigma-Aldrich Chemie GmbH; TRIS-EDTA Puffer, pH 7,0) behandelt. Nach 24 h Inkubation bei 5 °C wurde die Biomasse mit einer Ultraschallspitze (Sonoplus GM70, Bandelin electronic GmbH & Co. KG) für 5 min homogenisiert. Das Homogenat wurde 48 h gefriergetrocknet. Die so aufbereitete Biomasse wurde 3 x mit 25 ml tert-Butyl-methylether (TBE) im Ultraschallbad jeweils 30 min lang extrahiert. Nach 10-

minütiger Zentrifugation bei 10 °C und 5200 g wurde der Überstand im Rotationsverdampfer (Rotavac™ System, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) bis zur Trockne eingengt. Die Masse des Rohextraktes (RE) wurde mit einer Analysenwaage (MP2, Satorius AG) bestimmt und anschließend in Methanol mit einer Konzentration von 10 mg RE ml⁻¹ resuspendiert. Diese Suspension wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung oder Analyse gelagert.

Cyanobacterin wurde mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) modifiziert nach MASON et al., (1982) nachgewiesen und quantifiziert. Die Separation von 50 µl injizierter Probe erfolgte im Chromatographiesystem (Agilent Serie 1100, Hewlett Packard Co.) isokratisch mit Hypersil-RP-C18-Säulen als stationärer Phase. Jeder Zyklus enthielt einen Gradientenspülschritt.

Als Eluenten dienen 80% Methanol/Wasser (9:1) und 20% (v/v) Wasser mit einer Flussrate von 0,8 ml min⁻¹. CB wurde über RP-C18-Säulen (Hypersil ODS, 225 mm (Knauer GmbH) oder LiChrospher® 100, 85 mm (Merck KGaA)) separiert und anhand seiner charakteristischen Absorptionsmaxima bei 208 und 266 nm mittels Diodenarray-Detektor nachgewiesen. Die Retentionszeit betrug 22,7 ± 0,8 min (Hypersil ODS) oder 13,5 ± 0,5 min (LiChrospher®). Das Absorptionsmaximum bei 208 nm ist etwa doppelt so hoch wie bei 266 nm. Folglich wurde die CB-Konzentration anhand des 208-nm-Peaks bestimmt. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software HP ChemStation Rev.A.04.01 (Agilent). Hier wurde zur Standardisierung aufgereinigtes CB verwendet. Vom Beginn der Extraktion bis zur Kalkulation der betreffenden CB-Konzentration erforderte die beschriebene Methodik eine Dauer von etwa sechs Tagen.

Nach Extraktion der Biomasse von *S. hofmanni* mit DMF, ließ sich analog zu Chlorophyll *a* und Carotenoiden (vgl. 2.2.1.3) aus dem Absorbtionsspektrum ebenfalls die CB-Konzentration ermitteln. Die für CB charakteristischen Wellenlängen von 208 und 266 nm sind aufgrund der Störung bzw. der hohen UV-Absorption durch das Extraktionsmittel ungeeignet. Neben CB wird jedoch gleichzeitig ein Derivat, das Anhydrocyanobacterin (ACB), extrahiert. ACB weist ein weiteres Absorbtionsmaximum bei etwa 357 bis 360 nm auf. CB und ACB kommen im Verhältnis 3:1 vor (MASON et al., 1982). Für die Extraktion mit DMF wurde ein konstantes Verhältnis beider Substanzen angenommen. Auf dieser Grundlage und der Korrelation errechneter Werte mit denen der CB-Konzentration im TBE Extrakt, wurden in dieser Arbeit die folgenden Gleichungen zur Berechnung der CB-Konzentration [$\mu\text{g CB mg TM}^{-1}$] entwickelt:

1. $c_{ACB} [\mu\text{g mg TM}^{-1}] = \frac{(E_{360} - E_{750})}{0,4493^{*1}}$
2. $c_{CB} [\mu\text{g mg TM}^{-1}] = c_{ACB} \times 3^{*2} \times 1,2679^{*3}$

E_{360} – Extinktion bei 360 nm (Absorption von ACB)

E_{750} – Extinktion bei 750 nm (Trübung)

*¹Steigung aus 5-Punktkalibrierung

*²Verhältnis von CB zu ACB 3:1 (MASON et al., 1982)

*³Anstieg des linearen Regressionsmodells für ACB-Konzentration nach DMF-Extraktion und der CB-Konzentration nach TBE-Extraktion

Da das Absorptionsmaximum leicht variierte, wurde für E_{360} der Mittelwert aus den Messwerten eines Spektrums von 355 bis 365 nm gebildet.

Mit dieser Methode konnten mit vertretbarem Aufwand innerhalb von etwa einem Tag Informationen über die CB-Konzentration gewonnen werden. So war eine Bestimmung der CB-Konzentration auch in kurzen zeitlichen Abständen praktikabel.

Die Berechnungen der Kapazität der Cyanobacterinkonzentration für die Wachstumsversuche erfolgten wie unter 2.2.1.4 beschrieben.

2.2.3 Charakterisierung der Filtrate von *S. hofmanni*-Kulturen

Die Filtrate wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben von *S. hofmanni*-Kulturen gewonnen. Im Filtrat wurden die anorganischen Parameter pH, gelöstes reaktives Phosphat (SRP; Phosphat), Nitrat und Ammonium bestimmt. Des Weiteren wurden die Konzentrationen an freien gelösten Aminosäuren und von CB im Medium ermittelt.

2.2.3.1 pH-Wert und anorganische Nährstoffe

Der pH Wert des Mediums wurde unmittelbar im Anschluss an die Filtration ermittelt. (Universal Multiline P4, Elektrode: Sentix 413, WTW GmbH & Co. KG).

SRP wurde als Molybdänblau photometrisch bei 810 nm (Spektralphotometer, CADS 100, Dr. Bruno Lange GmbH) nach MURPHY & RILEY (1962) bestimmt (Reagenzien: s. Anhang). Zu 25 ml Medium (Probe [PR]) bzw. destilliertem Wasser (Blindwert [BW]) wurden 0,5 ml Mischreagenz (Schwefelsäure und Ammoniummolybdat) gegeben und die Trübung (TR) ermittelt. Nach Zugabe von 0,25 ml Ascorbinsäurelösung wurden die Ansätze 25 min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Nachfolgend wurden die Extinktionen (E) am Spektralphotometer gemessen. Die Berechnung der SRP-Konzentration [μM] erfolgte nach folgender Gleichung:

$$c_{\text{SRP}} [\mu\text{M}] = \frac{(E_{PR} - TR_{PR}) - (E_{BW} - TR_{BW})}{F_{\text{Kalib}}}$$

F_{Kalib} – Kalibrierungsfaktor der jeweils genutzten Reagenzien

Nitrat wurde zur Quantifizierung im Nährstoffanalysator (ALPKEM, RFA300 HR, Perstorp Analytical Inc.) an mit Kupfer ummantelten Kadmiumgranula zu Nitrit reduziert. Der sich nach Reagenzzusatz entwickelnde Azofarbstoff wurde photometrisch bei 543 nm gemessen (HANSEN & KOROLEFF, 1999). Die Proben wurden ggf. für Messungen zum Erreichen des kalibrierten Konzentrationsbereiches von 0,1-10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ verdünnt (max. 1:1000).

Die Ammoniumbestimmung erfolgte mit der Indolblau-Methode und photometrischer Messung bei 630 nm modifiziert nach SAGI (1966). Zu 35 ml Medium (PR) wurde 1 ml Phenolreagenz addiert und vermischt. Anschließend wurde die entstehende Lösung mit 1 ml Mischreagenz (Natriumhypochlorid in Citratpuffer) versetzt und kräftig geschüttelt. Alle Ansätze wurden bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Die Extinktionen (E) wurden nach 12 h am Spektralphotometer gemessen. Der korrigierte Reagenzblindwert (BW_K) ergab sich als Differenz aus den Messungen mit destilliertem Wasser bei einfacher und doppelter Reagenzzugabe. Die Berechnung der Ammonium-Konzentration [μM] erfolgte nach der Gleichung:

$$c_{\text{Ammonium}} [\mu\text{M}] = \frac{E_{PR} - BW_K}{F_{\text{Kalib}}}$$

2.2.3.2 Freie gelöste Aminosäuren

Die Bestimmung der Konzentration freier gelöster Aminosäuren im Medium (Tab. 3) erfolgte mittels HPLC (Agilent Serie 1100, Hewlett Packard Inc.) nach LINDROTH & MOPPER (1997). Ein Aminosäuregemisch (Standard H Pierce, No.20088) wurde als Standard injiziert. Zum Nachweis wurden die Aminosäuren mit o-Phthalaldehyd (OPA)-Reagenz (Pierce, o-Phthalaldehyd) nach HUBBERTEN (1994) derivatisiert. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine RP-C18 Hypersil 120 ODS Säule (225 mm, Knauer GmbH) bei 25 °C. Der Nachweis erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion bei einer Anregung von 340 nm und bei einer Emission von 455 nm. Die Chromatogramme wurden mit der Software HP ChemStation Rev.A.04.01 (Agilent Technologies Inc.) ausgewertet.

Alanin	A	Histidin	H	Serin	S
Arginin	R	Isoleucin	I	Taurin	X
Asparagin	N	Leucin	L	Threonin	T
Asparaginsäure	D	Lysin	K	Tryptophan	W
Glutamin	Q	Methionin	M	Tyrosin	Y
Glutaminsäure	E	Ornithin	O	Valin	V
Glycin	G	Phenylalanin	F		

Tab. 3: Untersuchte freie gelöste Aminosäuren im Kulturmedium von *S. hoffmanni* und deren Kodierung (Einbuchstaben-Code)

2.2.3.3 Cyanobacterin

Um CB zu extrahieren, wurden 100 ml Medium dreimalig mit 25 ml TBE ausgeschüttelt. Die Trennung des Ethers von der wässrigen Phase erfolgte im Scheidetrichter jeweils über 15 min. Der Etherextrakt wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt, in 2 ml Methanol gelöst und dann bei -20 °C gelagert. Die CB-Analyse erfolgte mittels HPLC (vgl. 2.2.2.2).

2.2.3.4 Kapazität und Raten

Die Kapazität für im Medium gelöste Substanzen wurde wie unter 2.2.1.4 beschrieben berechnet. Aus der Halbwertszeit wurde eine Rate (μ Zunahme, k Abnahme) nach PAUL & CLARK (1996) berechnet.

$$k(\mu) = \frac{\ln 2}{HWZ}$$

2.2.4 Parameter für Toxizitätstests mit photoautotrophen Mikroorganismen

Die CB-Toxizität für photoautotrophe Mikroorganismen wurde anhand des Wachstums, der Abundanz und des Dark-Yields beurteilt.

2.2.4.1 Abundanz und Wachstum

Die Abundanz [$Z \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$] wurde mittels Blutzählkammer (Fuchs-Rosenthal, Kammervolumen: 3,194 mm³) unter dem Mikroskop (BH2-RFCA Referenz-Kontrast, Olympus Ltd.) ermittelt. Von den 16 vorhandenen großen Feldern wurden jeweils vier ausgezählt und für die gesamte Kammer hochgerechnet. Aus drei Unterproben jeder Probe wurde der Mittelwert (MW_{UP}) gebildet, der in die Berechnung der Abundanz einging.

$$\text{Abundanz}[Z \times 10^6 \text{ ml}^{-1}] = \frac{MW_{UP} \times 0,001}{3,194}$$

Auf der Grundlage der Abundanz wurde die exponentielle Wachstumsrate μ nach SCHLEGEL et al. (1995) (vgl. 2.2.1.4) berechnet.

2.2.4.2 Maximale Quantenausbeute des Photosystems II (Dark-Yield)

Der Dark-Yield oder die maximale Quantenausbeute der Photosynthese (Φ_{\max}) charakterisiert grundlegend die photochemische Effizienz der Zellen. Sie stellte einen wichtigen Marker der Vitalität photoautotropher Organismen dar (KLUG 2005). Die Bestimmung von Φ_{\max} beruhte u.a. auf dem Prinzip, die durch Chlorophyll aufgenommene Energie nicht in photochemische Arbeit umzuwandeln, wobei die maximale Fluoreszenzemission des PSII induziert wurde. Dies konnte sowohl durch Hemmung des PSII mit DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) als auch mittels übersättigendem Lichtpuls vorgenommen werden.

2.2.4.1.1 Bestimmung von Φ_{\max} mittels DCMU am Spektralfluorometer

Die *in vivo* Chlorophyll *a* Fluoreszenz wurde in 3 ml in Kunststoffküvetten (Sarstedt AG & Co) am Spektralphotometer F-4010 (Hitachi Ltd. Corp.) gemessen. Die Zellsuspension wurde bei einer Wellenlänge von 675 nm angeregt und die resultierende Chlorophyll *a* Fluoreszenz wurde bei 720 nm gemessen. Nach Dunkeladaptation wurde die minimale- oder Grundfluoreszenz (F_0) der vitalen Zellen bestimmt. Durch Zugabe von DCMU (Endkonzentration 0,01 μM) wurde die erhöhte (maximale) Fluoreszenz (F_m) induziert. Die Differenz aus F_m und F_0 wird als variable Fluoreszenz (F_v) bezeichnet. Wird F_v auf F_m normiert, ergibt sich nach LIBBERT (1993) die maximale Quantenausbeute der Photosynthese (Φ_{\max}).

$$\Phi_{\max} = \frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

2.2.4.1.2 Bestimmung von Φ_{\max} mit dem Puls-Amplituden modulierten Chlorophyllfluorometer

Die *in vivo* Chlorophyll *a* Fluoreszenz wurde mit dem Puls-Amplituden modulierten Chlorophyllfluorometer (PAM) PAM 2000 (Walz Mess- und Regeltechnik GmbH) gemessen. Die Filtration der Zellen erfolgte auf Glasfaserfilter (GF 92, \varnothing 25 mm, Schleicher & Schüll GmbH). Hierbei war es wichtig, viel Biomasse auf kleiner Fläche anzureichern. Das Lichtleiterkabel wurde 7 mm über der Probe platziert.

Zur Bestimmung der minimalen Chlorophyll *a* Fluoreszenz F_0 wurden dunkel adaptierte Zellen mit schwachem Messlicht (655 nm, maximal 0,1 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Mit einem sättigenden Lichtimpuls (bis zu 12.000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 0,4-0,8 s) wurden alle Komponenten der Elektronentransportkette schlagartig reduziert. Somit standen keine oxidier-

ten Elektronenakzeptoren für das Photosystem II mehr zur Verfügung. Die Chlorophyllfluoreszenz stellte einen Verlustprozess zur Abführung überschüssiger Anregungsenergie dar. Somit wurde während des Sättigungspulses die maximale Chlorophyll *a* Fluoreszenz (F_m) emittiert (KROMKAMP & FORSTER 2003). Φ_{max} wurde wie unter 2.2.4.1.1 beschrieben berechnet.

2.2.5 Extraktion potenzieller Effektoren aus Wachstumssmedien photoautotropher Mikroorganismen

Ein Extrakt des Kulturmediums photoautotropher Mikroorganismen wurde zur Untersuchung ihrer potentiellen Wechselwirkungen mit *S. hofmanni* präpariert. 14 Tage alte Kulturen wurden am Ende der stationären Phase für 10 min bei 5200 g und 20 °C zentrifugiert und der Überstand steril filtriert (Filter FP30/0,2 CA-S, 0,2 µm, Schleicher & Schüll GmbH). Im Medium erfolgte die Bestimmung der Konzentration freier gelöster Aminosäuren (vgl. 2.2.3.2).

2.3 Experimentdesign

Die Kultivierung von *Scytonema hofmanni* wurde hinsichtlich der Abundanz und der CB-Konzentration optimiert (Abb. 4). Darüber hinaus wurden die Interaktionen von *S. hofmanni* mit photoautotrophen Mikroorganismen untersucht. Die toxikologischen Untersuchungen zielten auf die akute bzw. subchronische Toxizität für Mikroorganismen und für einen Makrofouling-Organismus ab. Vor dem Hintergrund einer möglichen technischen Anwendung wurden auch Untersuchungen zur Persistenz von Cyanobacterin vorgenommen.

2.3.1 Optimierung der Wachstumsbedingungen und der erreichbaren CB-Konzentration in *S. hofmanni*-Kulturen

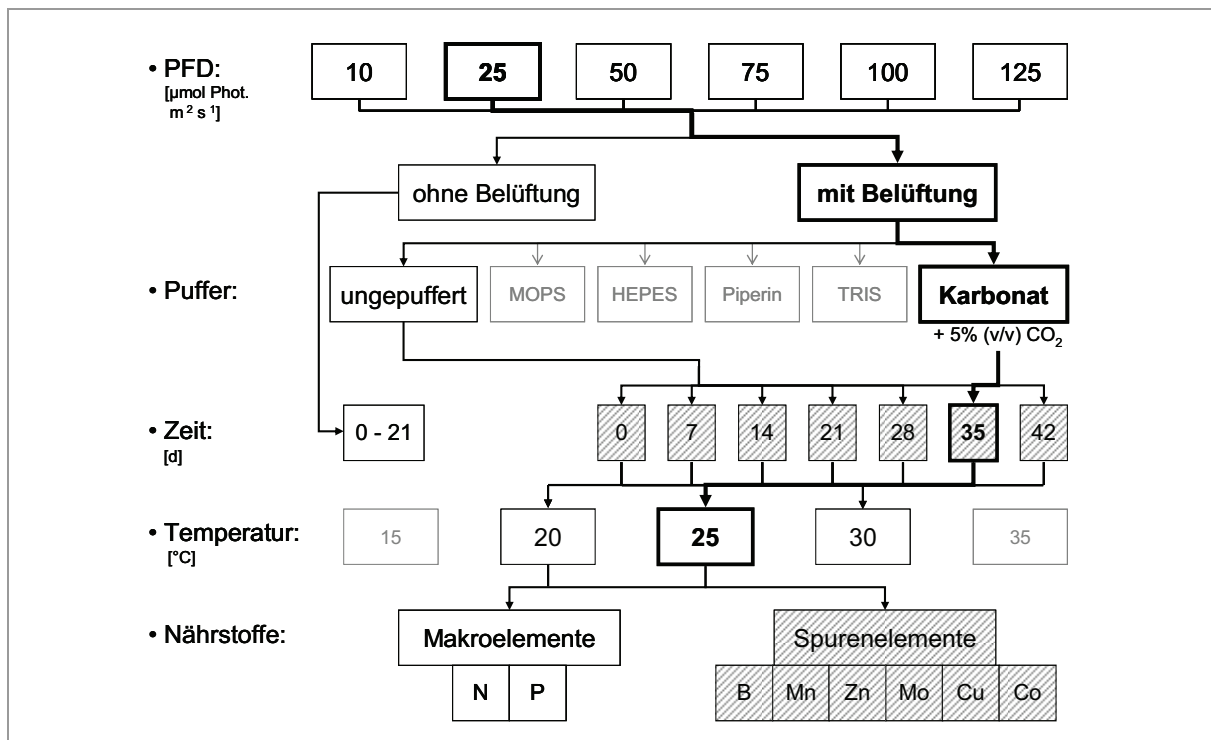


Abb. 4: Übersicht über das Experimentdesign und die variierten Parameter zur Optimierung der Wachstumsbedingungen und der Cyanobacterinkonzentration in *S. hofmanni*-Kulturen bei 25 °C. Schraffierte Felder: Untersuchungen zusätzlich bei weiteren Temperaturen, Matte Felder: Untersuchung nach einem Test nicht weiter verfolgt

2.3.1.1 Variation der Photonenflussdichte und der CO_2 -Verfügbarkeit

Kultivierung ohne Belüftung:

Der Einfluss der PFD auf das Wachstum von *S. hofmanni* und die CB-Konzentration in der Biomasse wurde in Polypropylen-Einweg-Küvetten (\varnothing 50 mm, Kleinfeld Labortechnik GmbH) in 10 ml Medium untersucht. Die Kultivierung erfolgte bei 10, 25, 50, 75, 100 und 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Photosynthetisch Aktive Strahlung, PAR; Tageslicht-Leuchtstoffröhren, OSRAM 36W/12-950) sowohl bei Dauerlicht als auch bei H:D 12:12. Die Kultivierungstemperatur betrug 25 °C. Die Küvetten waren dicht verschlossen und wurden nicht belüftet. Die *in vivo* Chlorophyll *a* Fluoreszenz wurde am Fluorimeter alle 24 h bestimmt. Bei Dauerlicht erfolgte die Messung über 16 Tage und bei H:D 12:12 über 20 Tage. Das exponentielle Wachstum wurde zwischen dem 2. und 13. Tag berechnet und die Dauer der exponentiellen Phase ermittelt. Die Bestimmung der maximal erreichbaren Fluoreszenz K_{FL} erfolgte durch Mittlung der gemessenen Fluoreszenzwerte nach Erreichen der stationären Phase.

Kultivierung mit Belüftung:

Der Einfluss der PFD auf das Wachstum von *S. hofmanni* sowie die CB-Konzentration wurde in 75 ml Medium in belüfteten Kulturen (5 ml min^{-1}) untersucht. Die Kultivierung erfolgte bei 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (H:D 12:12), und 25 °C. Jeweils nach 14, 21, 28 und 35 Tagen wurde die Biomasse gewonnen gefriergetrocknet und als Trockenmasse quantifiziert. Die maximal erreichbare Abundanz K_{TM} wurde wie unter 2.2.1.4 beschrieben berechnet. Weil der pH-Wert im ungepufferten Medium stark anstieg, erfolgten weitere Untersuchungen unter Zugabe der Puffer MOPS, Piperin, HEPES und TRIS.

Kultivierung mit Belüftung unter CO₂-Anreicherung (Karbonatpuffer):

Um eine pH-Konstanz auch über einen längeren Zeitraum (> 14 Tage) zu gewährleisten, wurden die *S. hofmanni*-Kulturen mit 5% (v/v) CO₂ (5 ml min^{-1}) belüftet. Die Kultivierung erfolgte in 250 ml BG11-Medium.

Der Einfluss der PFD auf die Biomasseproduktion von *S. hofmanni* sowie die CB-Konzentration wurde bei 25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, H:D 12:12 und 25 °C untersucht. Die Biomasse wurde nach 35 Tagen gewonnen. Alle weiteren Untersuchungen erfolgten mit 5% (v/v) CO₂-Belüftung.

2.3.1.2 Variation der Wachstumstemperatur

Der Einfluss der Temperatur wurde zeitlich aufgelöst bei 15, 20, 25, 30 und 35 °C auf das Wachstum und die Biomasseproduktion von *S. hofmanni* sowie die CB-Konzentration untersucht. Die Kultivierung erfolgte bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (H:D 12:12). Im Ansatz (t_0) und jeweils nach 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tagen wurden die Chlorophyll *a* Fluoreszenz ermittelt sowie die Biomasse gewonnen.

2.3.1.3 Variation von Nährstoffen und Spurenelementen

Die Verfügbarkeit der Nährstoffe Phosphat (freies gelöstes Phosphat, ortho-Phosphat - SRP) und Stickstoff (Nitrat) wurde hinsichtlich der Biomasseproduktion von *S. hofmanni* sowie der CB-Synthese untersucht. Nach 14 Tagen erfolgte ein Wechsel des Mediums unter sterilen Bedingungen, wobei die SRP- und Nitratkonzentrationen variiert wurden (Tab. 4). Beim Mediumwechsel wurden die SRP- Konzentration mit 65 μM und die Nitratkonzentration mit 13 mM festgelegt (vgl. 3.1.2). Die Kultivierung erfolgte bei 25 °C und 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, H:D 12:12. Die Biomasse wurde nach 28 Tagen gewonnen.

Kontr	Kontrolle, nach 14 Tagen kein Wechsel des Mediums
+N +P	BG11, Nitrat: 13 mM, SRP: 65 μ M (entspricht Standardmedium)
+N -P	BG11, Nitrat: 13 mM, <u>ohne SRP</u>
+N +10P	BG11, Nitrat: 13 mM, <u>SRP: 650 μM</u>
-N +P	BG11, <u>ohne Nitrat</u> , SRP: 65 μ M
+10N +P	BG11, Nitrat: <u>130 mM</u> , SRP: 65 μ M

Tab. 4: Variation des BG11-Mediums modifiziert nach RIPPKA et al. (1979) nach 14 Tagen Kultivierung von *S. hofmanni* für die Untersuchungen zur Nährstoffverfügbarkeit

Die potentielle Verfügbarkeit der Spurenelemente Bor, Mangan, Zink, Molybdän, Kupfer und Kobalt für die Biomasseproduktion von *S. hofmanni* sowie die CB-Konzentration wurde untersucht, indem jeweils das zu untersuchende Element dem Standard-Medium nicht beigelegt wurde. Die Konzentrationen aller anderen Komponenten wurden nicht verändert. (Tab. 5, Konzentrationen s. Anhang) Die Kultivierung erfolgte bei 20 °C und 25 °C und 25 μ mol Photonen $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (H:D 12:12). Die Biomasse wurde nach 35 Tagen gewonnen.

- B	Borsäure H_3BO_3
- Mn	Manganchlorid MnCl_2
- Zn	Zinksulfat ZnSO_4
- Mo	Natriummolybdat Na_2MoO_4
- Cu	Kupfersulfat CuSO_4
- Co	Kobaltnitrat $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$
+ all	Medium mit allen Spurenelementen nach STANIER et al. (1971)
- all	Kontrolle, ohne Spurenelemente

Tab. 5: Variation der Spurenelemente; + : im Medium vorhanden, - : nicht im Medium vorhanden, all: alle Spurenelemente

2.3.2 Interaktion von *S. hofmanni* mit photoautotrophen Mikroorganismen

2.3.2.1 Biotest mit *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma*

Die Interaktion zwischen *S. hofmanni* und *C. vulgaris* bzw. *M. firma* wurde auf festen Substraten (BG11 Medium, modifiziert nach RIPPKA et al. (1979), 1,5% Agar) untersucht. Nach vier Tagen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden jeweils 2 ml einer Kultur von *C. vulgaris* und *M. firma* auf eine Platte (\varnothing 50 mm) mit jeweils 3 Replikaten ausgestrichen. Diese Kulturen wurden bei 25 °C und 25 μ mol Photonen $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12 inkubiert. Nach vier Tagen wurde jede Platte mit drei Zellkolonien von *S. hofmanni* aus einer vier Wochen alten Kultur beimpft. Nach 7 und 21 Tagen wurden die Kulturen auf das Vorhandensein von Plaques untersucht. Für die Durchmesser aller Plaques einer Platte wurde der Mittelwert be-

rechnet. Aus den Mittelwerten der 3 Platten wurde der Median, das Maximum und das Minimum bestimmt.

2.3.2.2 Einfluss von Exsudaten, Cyanotoxinen und Arginin auf die CB-Konzentration

Der Einfluss der ins Medium abgegebenen Exsudate von *C. vulgaris* (C.v.), *M. firma* (M.f.) und *Synechocystis* sp. (Sc.) wurde hinsichtlich der Biomasseproduktion von *S. hofmanni* sowie der CB-Konzentration untersucht. Nach 14 Tagen erfolgte die Zugabe von 20 ml der steril filtrierten Mediumextrakte (vgl. 2.2.5) des jeweiligen Mikroorganismus' zu 230 ml der *S. hofmanni*-Kultur. Die abschließenden Beprobungen erfolgten nach weiteren 14 Tagen Inkubation. Der Einfluss der Cyanotoxine Microcystin-RR (Calbiochem EMD Chemicals Inc.) (MC) und CB sowie der Aminosäure L-Arginin (L-Arginin-Monohydrochlorid, Merck KGaA) (R) wurden untersucht (Tab. 6), indem die Substanzen nach 14 Tagen zu jeweils 250 ml Kultur gegeben wurden. Die Kultivierung erfolgte bei 25 °C, 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (H:D 12:12) und mit 5% (v/v) CO₂-Belüftung. Die Biomasse wurde nach 28 Tagen gewonnen.

Kontr	Kontrolle
Sc.	20 ml Mediumextrakt von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 zu 230 ml Medium
C.v.	20 ml Mediumextrakt von <i>C. vulgaris</i> SAG211-11b zu 230 ml Medium
M.f.	20 ml Mediumextrakt von <i>M. firma</i> zu 230 ml Medium
R	L - Arginin 5 μM
MC	Microcystin-RR 24 nM
CB	Cyanobacterin 2,3 μM

Tab. 6: Konzentrationen von Exsudaten, Cyanotoxinen und Arginin nach Applikation in *S. hofmanni* –Kulturen mit 14tägiger Vorinkubation

2.3.3 Die Toxikologie von Cyanobacterin

2.3.3.1 Toxizität

2.3.3.1.1 Photoautotrophe Mikroorganismen

Die akute Toxizität von Cyanobacterin für die Photosynthese photoautotropher Mikroorganismen wurde anhand von Φ_{max} mittels Sättigungspulsmethode am PAM 2000 bestimmt (vgl. 2.2.4.1.2). Jeweils 500 ml von vier Tage alten Kulturen (log-Phase) der Mikroalgen bzw. Cyanobakterien *N. pusilla*, *M. firma* und *C. vulgaris* und 300 ml einer 14 Tage alten *S. hofmanni*-Kultur wurden bei 5200 g bei 20 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 150 ml BG11 (bei *N. pusilla* in f/2 Medium, vgl. Anhang) resuspendiert. Die Hemmung

der Photosynthese erfolgte in der Positivkontrolle mit DCMU [0,01 μM]. Die verwendeten Endkonzentrationen von CB betragen jeweils 0; 0,12; 0,23; 0,47; 1,16; 2,33; 3,49 und 4,65 μM CB. Vor der Messung wurden die Proben 5 min mit den Herbiziden inkubiert. Die Mittelwerte von Φ_{max} für unbehandelte Zellen wurden mit 100% zur Normierung aller Werte von Behandlungen genutzt, um anhand relativer Inhibition die Arten miteinander vergleichen zu können. Die effektive Konzentration, die eine fünfzigprozentige Hemmung bewirkt (ED_{50}) wurde wie unter 2.2.1.4 beschrieben berechnet. Außerdem erfolgte die Ermittlung der effektiven Konzentration von Cyanobacterin, die der Wirkung von 0,01 μM DCMU (ED_{DCMU}) entspricht.

Die subchronische Toxizität von Cyanobacterin wurde für *N. pusilla* über einen Zeitraum von vier Tagen getestet. Die Kultivierung von *N. pusilla* erfolgte wie unter 2.1.2. beschrieben mit CB-Konzentrationen von 0; 0,02; 0,23 und 1,16 μM CB. Ausgehend von einer Abundanz von $0,05 \times 10^6$ Zellen ml^{-1} wurde μ für exponentielles Wachstum nach SCHLEGEL et al. (1995) (vgl. 2.2.1.4) berechnet. Darüber hinaus erfolgte alle 24 h die Bestimmung von Φ_{max} spektral-photometrisch mittels DCMU (vgl. 2.2.4.1.1).

2.3.3.1.2 Cyprislarven von *B. improvisus*

Die toxische Wirkung von Cyanobacterin auf die Metamorphose von Cyprislarven von *B. improvisus* zu jungen Adulti wurden in Glaspetrischalen (Durchmesser 50 mm) untersucht. Zur Erzeugung eines Biofilms wurden die Petrischalen mit 10 ml Ostseewasser (12 PSU) drei Wochen bei 15 °C inkubiert. Vor dem Besatz mit Cyprislarven erfolgte ein Austausch des Konditionierungsmediums gegen 10 ml filtriertes und sterilisiertes Ostseewasser (12 PSU). Pro Ansatz wurden jeweils 50 Larven verwendet. Cyanobacterin wurde mit einer Endkonzentration von 1 % (23,3 mM) bzw. 2,5% (58,1 mM) in methanolischer Lösung dem Seewasser (2 ml methanolische Lösung je Liter Medium) zugesetzt. Das entspricht der CB-Konzentration in experimentellen Antifoulinganstrichen (vgl. ABARZUA et al., 2007). Über drei Tage wurden die angehefteten und vollständig metamorphosierten jungen Adulti von *B. improvisus* gezählt.

2.3.3.2 Persistenz von Cyanobacterin

Der Abbau von Cyanobacterin wurde in Biotopwasser der Unterwarnow (Stadthafen Rostock) bei der jeweiligen Habitat-Temperatur (10 bzw. 20 °C) untersucht. Jeweils 200 ml Wasser mit einer Ausgangskonzentration von 2,3 μM CB (1 mg CB l^{-1}) wurden für 10 Tage inkubiert. Täglich wurden 10 ml des Ansatzes entnommen. Die Extraktion der Proben erfolgte wie unter

2.2.3.3 beschrieben mit 5 ml TBE. Nachfolgend wurde CB mit Hilfe der HPLC quantifiziert (vgl. 2.2.2.2).

2.4 Statistik

Für die meisten Untersuchungen wurden jeweils drei Replikate (n) verwendet. Abweichende n sind im gegebenen Falle angegeben. Die Ermittlung von Median (Med), Maximum (Max) und Minimum (Min) erfolgte bei $n \geq 3$.

Die Signifikanzprüfung (Asymptotische zweiseitige Signifikanz) für die Unterschiede von Medianen erfolgte mit dem Man-Whitney-Test mit SPSS13.0 für Windows. Die zweiseitige Spearman-Rang-Korrelationsanalyse erfolgte mit GraphPad 2.0 für Windows. Bei $p \leq 0,05$ wurden die Korrelationen und Medianunterschiede als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung der Wachstumsbedingungen von *S. hofmanni*-Kulturen

3.1.1 Variation der Photonenflussdichte und der CO₂-Verfügbarkeit

3.1.1.1 Kultivierung ohne Belüftung

Wachstum:

Bei Dauerlicht überlebte von drei parallelen *Scytonema*-Kulturen nur ein Replikat zwei Wochen. Bei 25 und 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Dauerlicht befanden sich die Kulturen zum Ende des Messzeitraumes noch in der exponentiellen Phase. Die exponentielle Phase endete bei 10 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nach 13, bei 75 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nach 14 Tagen. Sie verkürzte sich bei hohen PFD über 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ auf 11 Tage.

Bei 10 und 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12 wurde mit 18 Tagen die signifikant längste exponentielle Wachstumsphase ermittelt. Zwischen 25 und 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12 war die Länge der exponentiellen Phasen nicht signifikant verschieden. Sie endeten nach 13–15 Tagen. (Abb. 5)

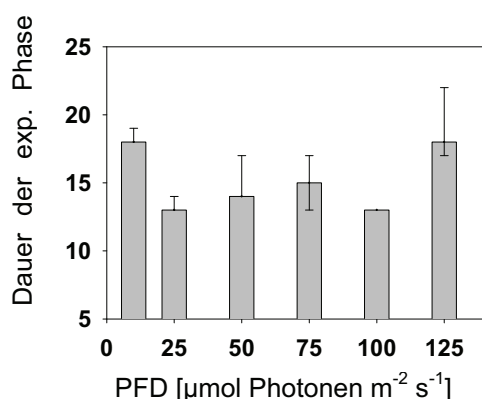


Abb. 5: Dauer der exponentiellen Phase [d] von *Scytonema hofmanni*-Kulturen in Abhängigkeit von der PFD; H:D 12:12, unbelüftet (Med, Max, Min, H:D n = 3)

Mit höheren PFD im Dauerlicht nahm μ ab. Bei 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ konnte nahezu kein Wachstum beobachtet werden (Abb. 6b). Zwischen 10 und 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ war das exponentielle Wachstum bei Dauerlicht mit dem bei H:D 12:12 vergleichbar.

Bei H:D 12:12 wurde bei 10 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ das signifikant niedrigste Wachstum von 0,13 d^{-1} bestimmt. Das exponentielle Wachstum zwischen 25–125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ unterschied sich nicht signifikant. Es wurde eine Wachstumsrate zwischen 0,15 und 0,17 d^{-1} bestimmt. Das Wachstum bei 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ war jedoch signifikant geringer als bei

25 und 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Abb. 6a). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Untersuchungen bei einem Hell- Dunkelrhythmus von 12 h:12 h durchgeführt.

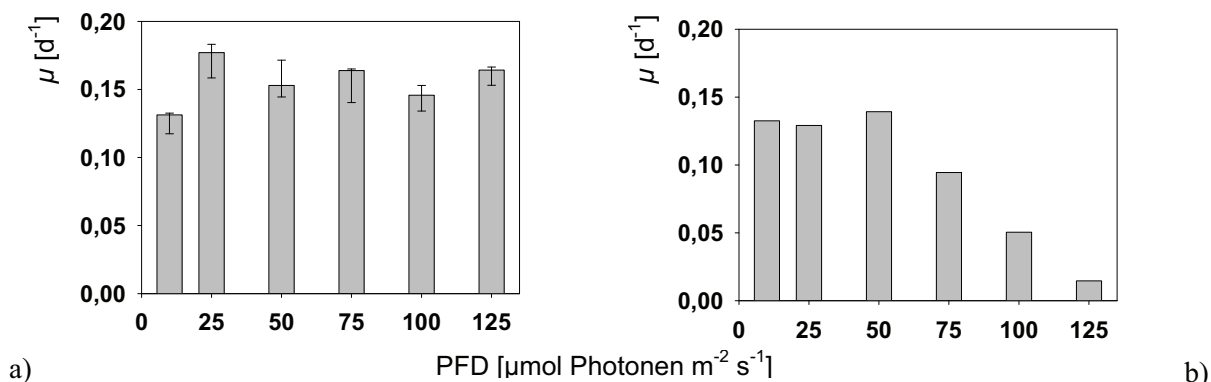


Abb. 6: Wachstumsraten von unbelüfteten *Scytonema hofmanni*-Kulturen in Abhängigkeit von der PFD basierend auf der Chlorophyll *a* Fluoreszenz [mV], H:D 12:12 (a) und Dauerlicht (b), (H:D 12:12 Med, Max, Min, $n = 3$; Dauerlicht: $n = 1$)

Chlorophyll *a* Fluoreszenz:

Bei 25 und bei 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Dauerlicht wurde die maximal mögliche Chlorophyll *a* Fluoreszenz (K_{FL}) geschätzt, da die stationäre Phase im Messzeitraum noch nicht erreicht wurde. K_{FL} betrug im Bereich von 10 und 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 950 mV und fiel bei höheren PFD bis 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ auf 295 mV ab (Abb. 7b).

Bei 10 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (H:D 12:12) war K_{FL} mit 1342 mV und bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (H:D 12:12) mit 1279 mV am höchsten. Mit steigenden PFD fiel K_{FL} auf 653 mV bei 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (H:D 12:12) ab. K_{FL} unterschied sich bei 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mit 1290 mV nicht signifikant von den Werten bei 10 und 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Die K_{FL} Werte waren signifikant höher als bei Dauerlicht (Abb. 7a).

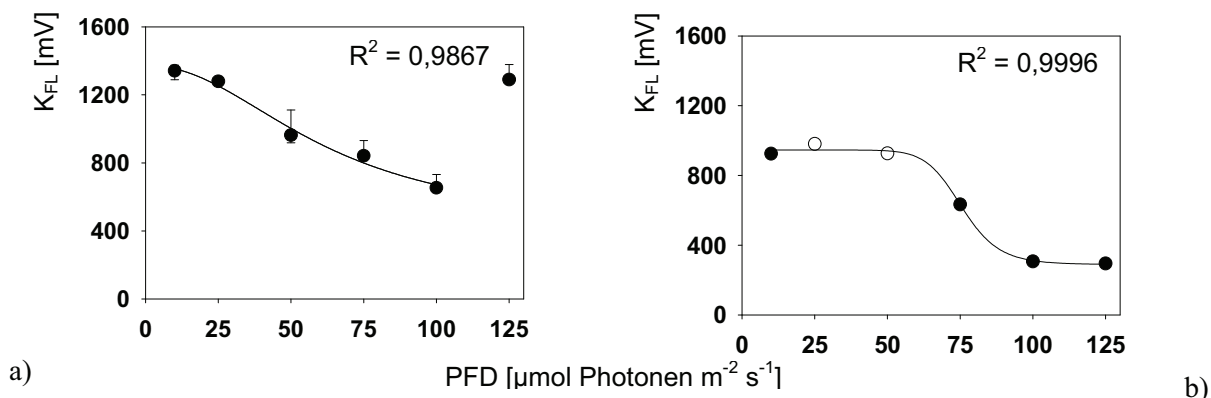


Abb. 7: Maximal erreichte Chlorophyll *a* Fluoreszenz K_{FL} [mV] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von PFD, H:D 12:12 (a) und Dauerlicht (b), unbelüftet, (a: Med, Max, Min, $n = 3$; b: $n = 1$, weiße Punkte: K_{FL} geschätzt)

Abundanz:

Unabhängig von der PFD, H:D 12:12 unterschied sich die Abundanz nicht signifikant von einander (Ausnahme: 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Es wurden 1100 mg TM l^{-1} produziert. Bei 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ war die Abundanz mit 870 mg TM l^{-1} signifikant am geringsten. (Abb. 8)

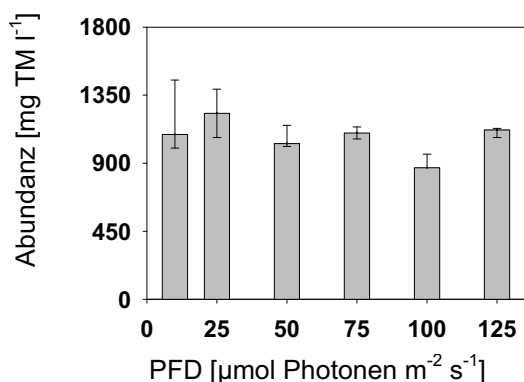


Abb. 8: Abundanz [mg TM l^{-1}] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, nach 25 Tagen, unbelüftet (Med, Max, Min, n = 3)

Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis:

Die Carotenoidkonzentration veränderte sich zwischen 10 und 75 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nicht signifikant und betrug 0,05 mg g TM^{-1} . Die Chlorophyll *a* Konzentration verringerte sich von 0,13 mg g TM^{-1} bei 10 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ auf 0,04 mg g TM^{-1} 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Bei 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ stieg sie signifikant auf 0,06 mg g TM^{-1} an. Das signifikant höchste Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis wurde bei 10 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mit 2,7 bestimmt. Bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ betrug das Verhältnis 2,2. Bei 50 und 75 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ wurden demgegenüber signifikant weniger ermittelt. (50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$: 0,9; 75 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$: 0,8). Mit 0,6 wurde bei 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ das signifikant geringste Verhältnis erhalten. Bei 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ stieg das Verhältnis erneut signifikant leicht an. Das Verhältnis von 1,0 war mit den bei 50 und 75 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ gemessenen Werten vergleichbar (Abb. 9). Die Chlorophyll Konzentration korrelierte nicht mit der ermittelten Abundanz.

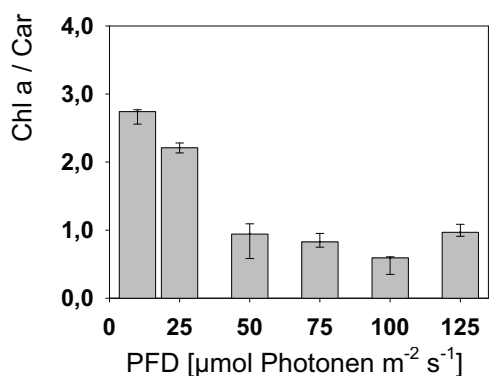


Abb. 9: Chlorophyll *a*-Carotenoid-Verhältnis (Chl *a* / Car) von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, nach 25 Tagen, unbelüftet (Med, Max, Min, $n = 3$)

pH-Wert im Medium:

Bei allen untersuchten PFD war nach zehn Tagen Versuchsdauer eine Konstanz des pH-Wertes bei 8,6 zu verzeichnen.

3.1.1.2 Kultivierung mit Belüftung

Wachstum:

Das exponentielle Wachstum μ unterschied sich im Bereich von 10 bis 75 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nicht signifikant von einander. Es wurde eine Wachstumsrate von $0,07 \text{ d}^{-1}$ ermittelt (Abb. 10).

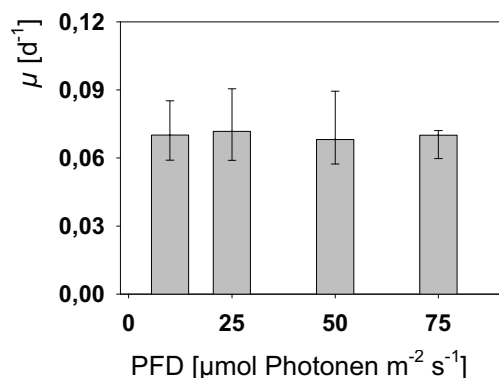


Abb. 10: Wachstumsraten (μ) von *Scytonema hofmanni*-Kulturen bei Belüftung ohne Anreicherung von CO_2 in Abhängigkeit von der PFD und basierend auf der Abundanz [mg TM l^{-1}], H:D 12:12, über 35 Tage, (Med, Max, Min, $n = 3$)

Abundanz:

Die Abundanz nahm von der dritten bis fünften Woche bei allen PFD nicht mehr signifikant zu. Unabhängig von der PFD war die Abundanz nach 35 Tagen nicht signifikant verschieden. Sie betrug 250 mg TM l^{-1} (Abb. 11). Das entspricht dem berechneten K_{TM} für die Experimente bei den unterschiedlichen PFD.

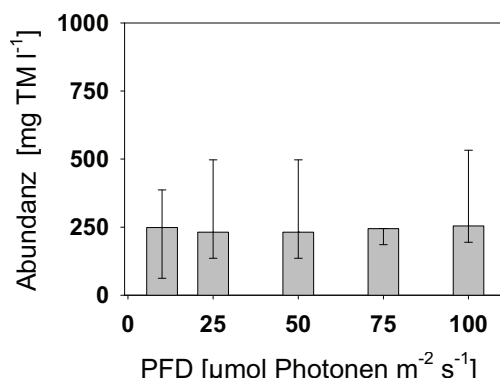


Abb. 11: Abundanz [mg TM l^{-1}] von *Scytonema hofmanni* –Kulturen bei Belüftung ohne Anreicherung von CO_2 in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, über 35 Tage, (Med, Max, Min, $n = 3$)

pH-Wert im Medium:

Im ungepufferten Medium stieg der pH-Wert bei $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (H:D 12:12, $25 \text{ }^\circ\text{C}$) nach 2 Wochen signifikant von 7,7 auf über 9,5 an (Abb. 12) Dieselbe Veränderung im pH-Verlauf wurde auch bei den anderen PFD beobachtet. Auch mit den Puffern MOPS, Piperin, HEPES und TRIS stieg der pH-Wert nach der zweiten Woche erneut über 9,5.

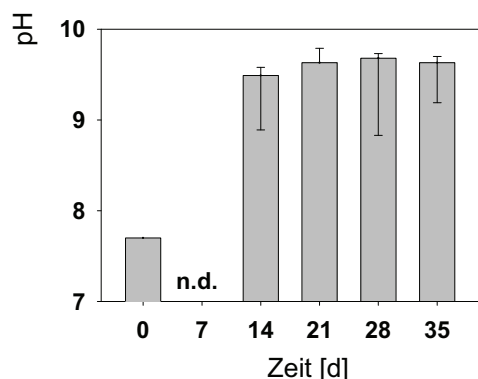


Abb. 12: pH – Wert des Kulturmediums bei Belüftung ohne Anreicherung von CO_2 über 35 Tage, $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12 (Med, Max, Min, $n = 3$)

3.1.1.3 Kultivierung mit 5% (v/v) CO_2

Abundanz:

Bei $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ betrug die Abundanz 770 mg TM l^{-1} ($n = 6$). Bei $50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden mit 409 mg TM l^{-1} signifikant 53% der Abundanz von $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produziert. Zwischen 75 und $125 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unterschied sich die Abundanz nicht signifikant von der bei $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Jedoch war mit steigenden PFD eine Tendenz zu höheren Abundanzen zu beobachten ($75 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$:

850 mg TM l⁻¹ (Max 1071 Min 597); 100 μmol Photonen m⁻²s⁻¹: 904 mg TM l⁻¹ (Max 1407 Min 468), 125 μmol Photonen m⁻²s⁻¹: 1042 mg TM l⁻¹ (Max 1762 Min 630)) (Abb. 13).

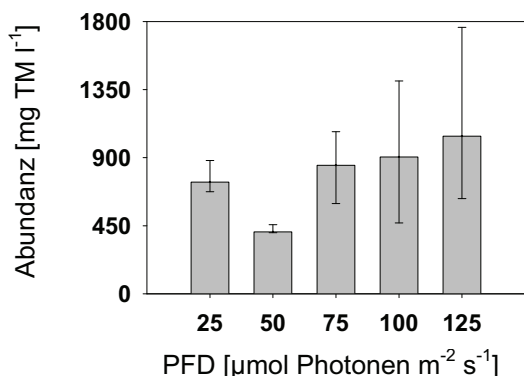


Abb. 13: Abundanz [mg TM l⁻¹] von *Scytonema hofmanni* bei Belüftung mit 5% (v/v) CO₂, in Abhängigkeit von der PFD, H:D12 h : 12 h, nach 35 Tagen, (Med, Max, Min, n = 3; n = 6 bei 25 μmol Photonen m⁻²s⁻¹)

Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis:

Die Carotenoidkonzentration veränderte sich mit steigenden PFD nicht signifikant und betrug 0,2 mg g TM⁻¹. Die Chlorophyll *a* Konzentration verringerte sich mit steigender PFD von 0,9 mg g TM⁻¹ auf 0,2 mg g TM⁻¹. Die Chlorophyll *a* Konzentration korrelierte nicht mit der ermittelten Abundanz.

Das Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis war bei 25 μmol Photonen m⁻²s⁻¹ mit 4,0 signifikant am höchsten. Mit steigenden PFD nahm dieses Verhältnis signifikant und kontinuierlich ab. Das geringste Verhältnis wurde bei 125 μmol Photonen m⁻²s⁻¹ mit 0,5 bestimmt (Abb. 14).

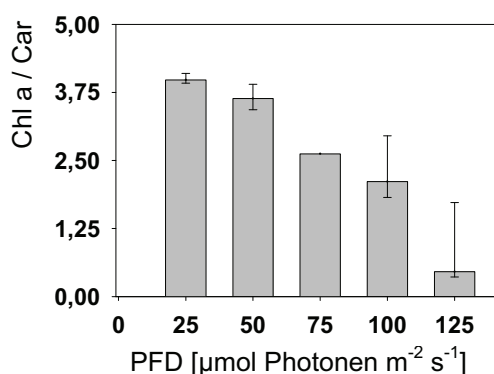


Abb. 14: Chlorophyll *a* - Carotenoid-Verhältnis (Chl *a* / Car) in *Scytonema hofmanni* bei Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12 h : 12 h, nach 35 Tagen (Med, Max, Min, n = 3; bei 75 μmol Photonen m⁻²s⁻¹: n = 1)

pH-Wert im Medium:

Mit 5% (v/v) CO₂ im Belüftungsgemisch wurde der pH-Wert zwischen dem 14. und 42. Tag konstant bei 8,5 gehalten (25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12, 25 °C) (Abb. 15). Somit unterschied sich der pH-Wert im Medium signifikant von dem ohne Kohlendioxidanreicherung. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Variation anderer abiotischer Parameter.

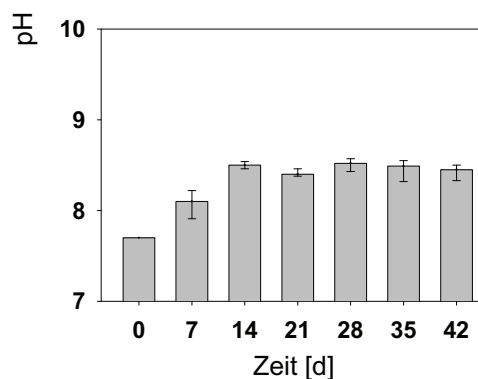


Abb. 15: pH – Wert des Kulturmediums bei Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ über 35 Tage, 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12 (Med, Max, Min, n = 3)

○ Zusammenfassung Einfluss von PFD und CO₂-Verfügbarkeit

Das Cyanobakterium *S. hofmanni* wuchs nicht bei Dauerlicht. Das exponentielle Wachstum unterschied sich bei 25 °C im Bereich von 25-125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (H:D 12:12) nicht signifikant von einander.

Der pH-Wert lag bei einer Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ nach 14 Tagen konstant bei 8,5. Mit CO₂-Belüftung betrug die Abundanz mit 850 mg TM l⁻¹ nach 35 Tagen das Dreifache gegenüber der Kultivierung ohne CO₂-Anreicherung (25 °C, unabhängig von der PFD). Mit steigenden PFD nahm das Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis ab.

Die weiteren Untersuchungen wurden mit 5% (v/v) CO₂ und bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (H:D 12:12) durchgeführt.

3.1.2 Variation der Wachstumstemperatur

Wachstum:

Bei der Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf das Wachstum wuchs *S. hofmanni* 15 °C und bei 35 °C nicht. Das exponentielle Wachstum über 35 Tage betrug bei 20 °C 0,073 d⁻¹ und bei 30 °C 0,077 d⁻¹. Bei 20 °C und 30 °C unterschieden sich die Werte für μ nicht signifikant von einander. Mit 0,111 d⁻¹ wurde bei 25 °C die höchste Wachstumsrate ermittelt (Abb. 16). Sie lag um 50% höher als bei 20 °C und 30 °C.

Die Wachstumsrate auf Basis der Chlorophyll *a* Fluoreszenz war mit der aus der Abundanz errechneten vergleichbar (vgl. 3.1.4.1)

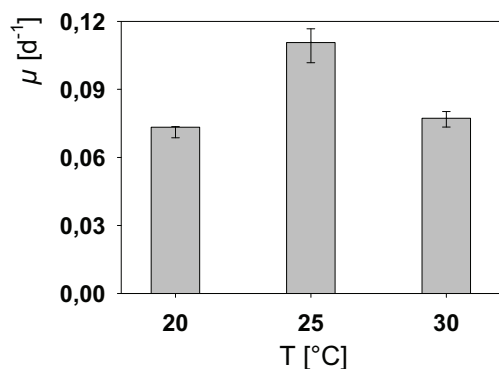


Abb. 16: Spezifische Wachstumsraten von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur basierend auf der Abundanz [$mg\ TM\ l^{-1}$] über 35 Tage, $25\ \mu mol\ Photonen\ m^{-2}s^{-1}$, H:D 12:12, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 , (Med, Max, Min, $n = 3$)

Abundanz:

Nach 35 Tagen betrug die Abundanz bei $20\ ^\circ C$ $629\ mg\ TM\ l^{-1}$ und bei $30\ ^\circ C$ $510\ mg\ TM\ l^{-1}$ (Abb. 17). Für die Wachstumstemperatur von $20\ ^\circ C$ konnte die maximal erzielbare Abundanz (K_{TM}) von $863\ mg\ TM\ l^{-1}$ und bei $30\ ^\circ C$ von $623\ mg\ TM\ l^{-1}$ berechnet werden. Die Abundanz bei $20\ ^\circ C$ war signifikant höher als bei $30\ ^\circ C$.

Bei $25\ ^\circ C$ betrug die Abundanz nach 35 Tagen $738\ mg\ TM\ l^{-1}$. Sie war gegenüber der bei $20\ ^\circ C$ und $30\ ^\circ C$ signifikant erhöht (Abb. 17). Zwischen der dritten und fünften Woche erfolgte der Hauptzuwachs. Bei $25\ ^\circ C$ wurde das K_{TM} mit $1296\ mg\ TM\ l^{-1}$ berechnet.

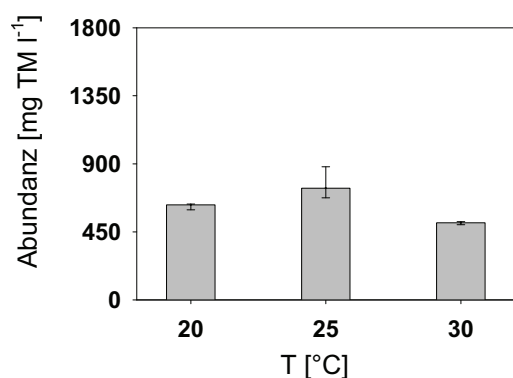


Abb. 17: Abundanz [$mg\ TM\ l^{-1}$] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur nach 35 Tagen, $25\ \mu mol\ Photonen\ m^{-2}s^{-1}$, H:D 12:12, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 , (Med, Max, Min, $n = 3$)

Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis:

Bei 20 °C wurde im Ansatz der Kultur ein Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis von 4,7 bestimmt. Nach dem siebten Tag war das Verhältnis signifikant niedriger (1,4). Vom 7. bis 28. Tag stieg das Verhältnis kontinuierlich an und am 28. Tag unterschied sich das Verhältnis nicht mehr signifikant vom Anfangswert (4,1). Nach 35 Tagen wurde ein signifikanter Abfall des Verhältnisses auf 3,7 und nach 42 Tagen auf 3,3 ermittelt. Nach 31 Tagen wurde das Maximum des Verhältnisses berechnet (Abb. 18a).

Bei 25 °C betrug das Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis zu Beginn 4,2. Nach sieben Tagen wurde signifikant ein geringeres Verhältnis von 3,2 bestimmt. Vom 14. bis 28. Tag war das Verhältnis konstant bei 4,7 und im Vergleich zum Ansatz signifikant leicht erhöht. Nach 35 Tagen wurde ein signifikanter Abfall des Verhältnisses auf 4,0 und nach 42 Tagen auf 3,6 ermittelt. Das Maximum des Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnisses wurde nach 24 Tagen berechnet (Abb. 18b).

Bei 30 °C betrug das Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis zum Beginn 3,3. Nach 7 Tagen fiel das Verhältnis signifikant auf 2,1. Das Verhältnis nach 14 Tagen unterschied sich nicht von dem von einer Woche vorher. Nach 21 Tagen stieg das Verhältnis auf 3,9 an und blieb bis zum 28. Tag konstant ($p > 0,05$). Nach 35 Tagen stieg das Verhältnis erneut auf 4,4 an. Zwischen dem 21. und 35. Tag war das Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnis signifikant höher als das vom Ansatz. Das Maximum des Verhältnisses wurde nach 35 Tagen berechnet (Abb. 18c).

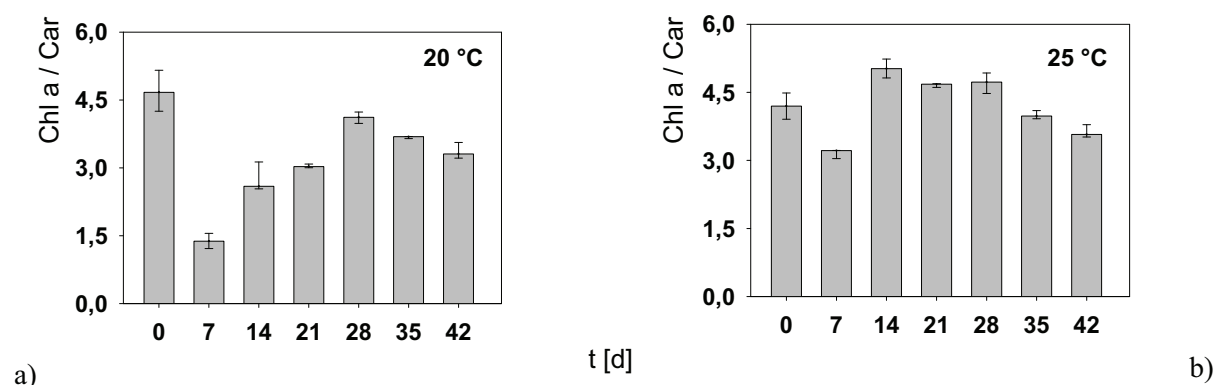
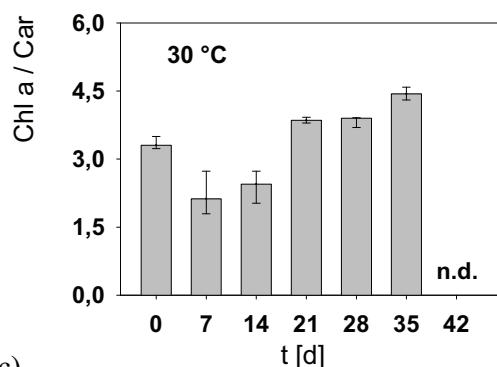


Abb. 18a-b: Chlorophyll *a* – Carotenoid-Verhältnis (Chl *a* / Car) in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur über 42 Tage, 20 °C (a), 25 °C (b), 25 μmol Photonen $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12 Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$)



c)

Abb. 18c: Chlorophyll *a* – Carotenoid-Verhältnis (Chl *a*/ Car) in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur über 42 Tage, 30 °C (c), 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12 Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$)

SRP-Umsatz:

Im frischen Medium betrug die Konzentration an SRP 129,8 μM ($n = 6$). Drei Stunden nach Beimpfen des Mediums mit Zellen von *S. hofmanni* wurden 67,9 μM SRP (Max 74,4 Min 51,0; $n = 9$) gemessen (c₀). Das entspricht einer Aufnahme von 48% des im Medium zur Verfügung stehenden Phosphates innerhalb dieser Zeit. Bei allen Temperaturen wurde SRP aus dem Medium nach 35 Tagen vollständig aufgenommen. Die Umsatzrate betrug 0,036 d^{-1} (Abb. 19).

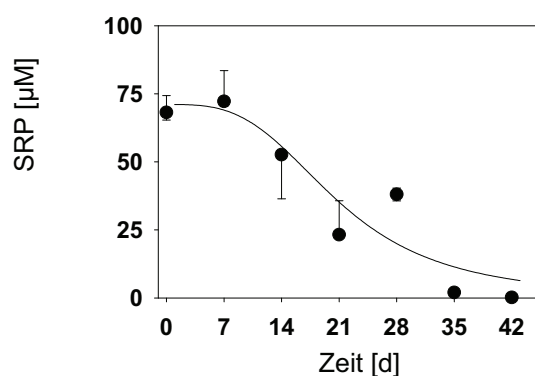


Abb. 19: Verlauf der SRP-Konzentration im Kulturmedium von *Scytonema hofmanni*, 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$, $R^2 = 0,8827$)

Nitrat- und Ammoniumumsatz bei 25 °C:

Im frischen Medium betrug die Nitratkonzentration (c₀) 14,7 mM (Max: 15,4 Min: 13,3; $n = 6$). Nach 35 Tagen wurden 52% des im Medium vorhandenen Nitrates aufgenommen. Die Aufnahmerate betrug 0,036 d^{-1} . Nach 6 Wochen unterschied sich die Nitratkonzentration im Medium nicht signifikant von der des frischen Mediums (Abb. 20a).

Bis zur dritten Woche nahm die Konzentration an Ammonium im Medium von 2,4 μM bis 1,9 μM kontinuierlich ab. Von der dritten bis zur sechsten Woche wurde ein Anstieg der Ammoniumkonzentration bis auf 3,2 μM beobachtet. Dabei war die Konzentration signifikant höher als im frischen Medium (Abb. 20b).

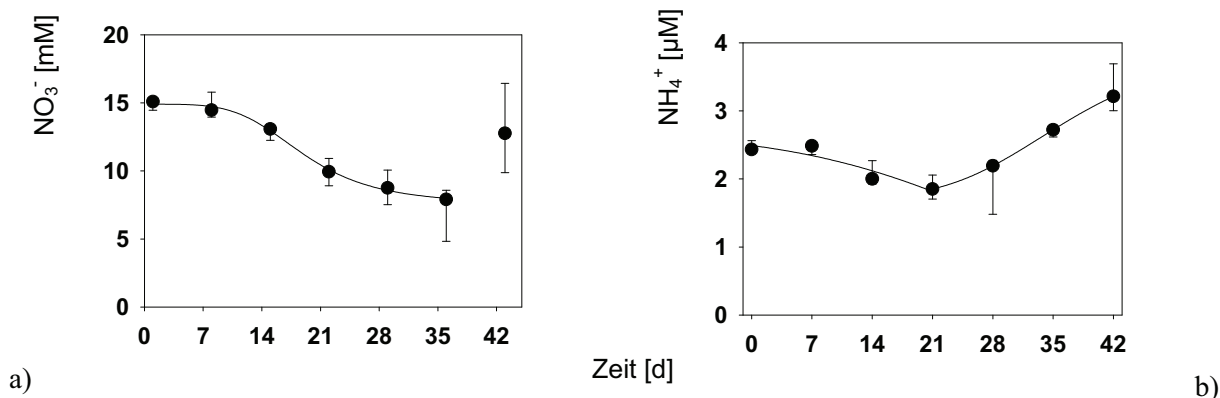


Abb. 20: Verlauf der Nitrat- (a) und Ammoniumkonzentration (b) im Kulturmedium von *Scytonema hofmanni*, 25 μmol Photonen $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$)

○ Zusammenfassung Temperatur

Bei 25 °C waren das exponentielle Wachstum von *Scytonema hofmanni* mit $0,111 \text{ d}^{-1}$ und die Abundanz nach 35 Tagen mit 740 mg TM l^{-1} (maximal erreichbare Abundanz $K_{\text{TM}} = 1300 \text{ mg TM l}^{-1}$) am größten. Das Maximum des Chlorophyll *a* / Carotenoid-Verhältnisses wurde hier nach 24 Tagen ermittelt. Nach 35 Tagen wurden bei 25 °C 52% des im Medium vorhandenen Nitrates aufgenommen. Die Ammoniumkonzentration sank bis zum 21. Tag ab, danach stieg sie jedoch bis zum 42. Tag über den Ausgangswert hinaus an. Unabhängig von der Temperatur war SRP im Medium nach 35 Tagen verbraucht.

3.1.3 Variation von Nährstoffen und Spurenelementen

3.1.3.1 Phosphat und Nitrat

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Nährstoffen auf das Wachstum von *S. hofmanni* betrug die Abundanz der Kontrollkulturen 334 mg TM l^{-1} . Sowohl bei Verwendung des Vollmediums (+N+P) als auch im nitratfreien Medium (-N+P) betrug die Abundanz das Doppelte (+N+P: 615 mg TM l^{-1} ; (-N+P: 609 mg TM l^{-1}). Im phosphatfreien Medium (+N-P) war die Abundanz mit 348 mg TM l^{-1} gegenüber der Kontrolle geringfügig erhöht. Im Vergleich mit der Abundanz des Vollmediums wurden hier 57% erhalten. Im phosphatangereicherten Medium (+N+10P) wurde gegenüber der Kontrolle 1,4-mal so viel ($p < 0,05$) Biomasse pro-

duziert (478 mg TM l^{-1}). Gegenüber dem Vollmedium betrug die Abundanz 78%. Im nitratangereicherten Medium wuchs *S. hofmanni* nicht (Abb. 21).

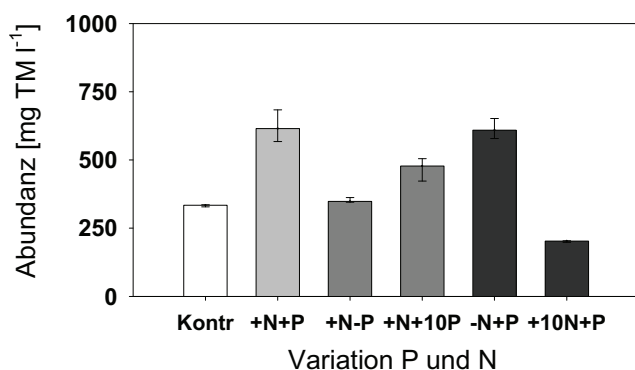


Abb. 21: Abundanz [mg TM l^{-1}] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Nährstoffe Phosphat und Nitrat nach 28 Tagen, $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ H:D 12 h:12 h, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$) (vgl. 2.3.1.3 zu Nährstoffkonzentrationen)

3.1.3.2 Spurenelemente

In den Kontrollkulturen wurden bei Untersuchungen zum Einfluss von Spurenelementen auf das Wachstum von *S. hofmanni* bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 851 mg TM l^{-1} produziert. Gegenüber der Kontrolle betrug die Abundanz im Medium mit allen Spurenelementen 68% (580 mg TM l^{-1}). Bei Molybdän- und Manganmangel war die Abundanz gegenüber der Kontrolle signifikant geringer (Mo: 728 mg TM l^{-1} , Mn: 504 mg TM l^{-1}) und war mit der bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ vergleichbar. Ohne Bor entsprach die Abundanz der der Kontrolle (950 mg TM l^{-1}). Bei Mangel an Zink betrug die Abundanz 69% und bei Mangel an Kobalt 60% gegenüber der Kontrolle (Zn: 585 mg TM l^{-1} , Co: 495 mg TM l^{-1}). Bei Mangel an Kupfer wurden 75% (640 mg TM l^{-1}) der Biomasse je Liter der Kontrolle geerntet (Abb. 22a).

Bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ betrug die Abundanz in der Kontrolle ohne Zusatz von Spurenelementen (-all) 795 mg TM l^{-1} . Wurde das Medium mit allen Spurenelementen angereichert (+all), wurden 582 mg TM l^{-1} produziert. Das war tendenziell etwas weniger als in der Kontrolle ($p = 0,127$). Die Abundanz beider Ansätze entsprach der bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($p > 0,05$). Fehlten die Spurenelemente Zink, Molybdän und Kobalt, unterschied sich die Abundanz nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. Bei Kupfermangel wurden 83% (662 mg TM l^{-1}) der Abundanz der Kontrolle erreicht. Diese Abundanz entsprach der bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($p > 0,05$). Demgegenüber wurde bei Mangel an Bor und Mangan das 1,7fache der Abundanz (B: $1365 \text{ mg TM l}^{-1}$; Mn: $1478 \text{ mg TM l}^{-1}$) produziert. Die Abundanz bei Kupfermangel unterschied sich nicht signifikant von +all ($p > 0,05$). Fehlte jeweils eines der anderen Spurenelemente, war die Abundanz signifikant höher als bei +all. (Abb. 22b)

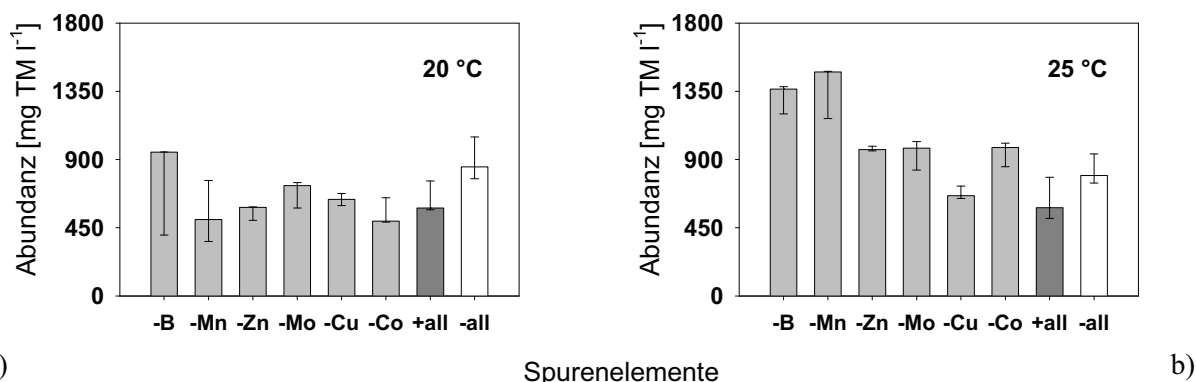


Abb. 22: Abundanz [mg TM l⁻¹] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Spurenelementen (+ mit, - ohne) bei 20 °C (a) und 25 °C (b), 25 μmol Photonen m⁻²s⁻¹ H:D 12:12, 35 Tage, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)

○ Zusammenfassung Nährstoffe und Spurenelemente

Sowohl im Vollmedium als auch im nitratfreien Medium wurde gegenüber der Kontrolle mit 615 mg TM l⁻¹ das Doppelte an Biomasse produziert. Im phosphatfreien Medium unterschied sich die Abundanz nicht signifikant von der Kontrolle.

Unabhängig von der Temperatur war die Abundanz im Medium, angereichert mit allen Spurenelementen, geringer als in der Kontrolle ohne Spurenelemente mit 800 mg TM l⁻¹. Bei Kupfermangel betrug die Abundanz mit 660 mg TM l⁻¹ 83% der Kontrolle. Sie unterschied sich nicht signifikant von der im Medium mit allen Spurenelementen.

3.1.4 Korrelationen der Abundanz

3.1.4.1 Korrelation der Abundanz mit der Chlorophyll *a* Fluoreszenz

Die Chlorophyll *a* Fluoreszenz und die Abundanz korrelierten. (Spearman-Rang (zweiseitig), $p < 0,0001$); $y = 0,0494x$ (n = 42; $R^2 = 0,8932$), Abb. 23.

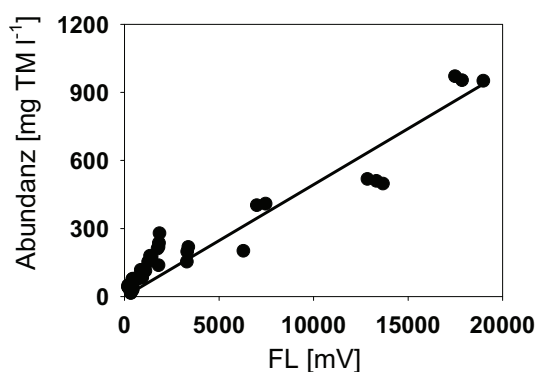


Abb. 23: Korrelation von Abundanz [mg TM l⁻¹] und Chlorophyll *a* Fluoreszenz von *Scytonema hofmanni* bei 25 μmol Photonen m⁻²s⁻¹, unabhängig von Temperatur und Zeit; $y = 0,0494x$; n = 42 ($R^2 = 0,8932$)

3.1.4.2 Korrelation der Abundanz mit dem pH-Wert

Unabhängig von PFD, Temperatur und Spurenelementen korrelierte die Abundanz von *S. hofmanni* nach 35 Tagen mit der CO₂-Anreicherung in der Luft (n = 88; Spearman Rang, P < 0,0001) und somit mit dem pH-Wert im Medium (n = 88; Spearman Rang, P = 0,001).

Mit Hilfe der Gauss'schen Gleichung ($y = y_{\max} + ae^{-0,5\left(\frac{x-x_{\max}}{b}\right)^2}$, R² = 0,2426) konnte das Abundanzmaximum von 860 mg TM l⁻¹ bei pH 8,24 abgeschätzt werden (Abb. 24).

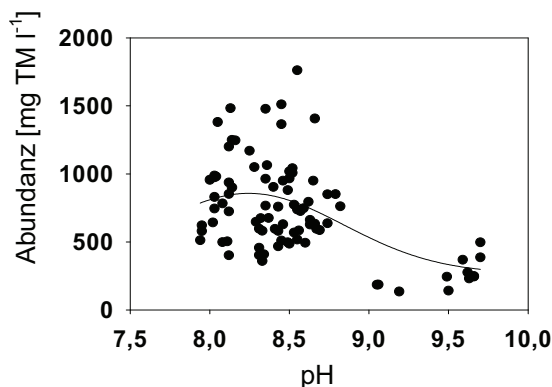


Abb. 24: Korrelation der Abundanz von *Scytonema hofmanni* [mg TM l⁻¹] mit dem pH-Wert nach 35 Tagen, gepoolte Daten unabhängig von PFD, Temperatur, Spurenelementen und zusätzlicher CO₂-Belüftung; (n = 89, R² = 0,2426)

3.2 Optimierung der erzielbaren CB-Konzentration in *S. hofmanni*-Kulturen

3.2.1 Variation der Photonenflussdichte und der CO₂-Verfügbarkeit

3.2.2.1 Kultivierung ohne Belüftung

Für eine TBE Extraktion konnte unter den gegebenen Bedingungen ohne Belüftung der Kulturen nicht genügend Trockenmasse gewonnen werden.

Im DMF-Extrakt wurde die signifikant höchste CB-Konzentration bei 25 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ mit 2,8 mg CB g TM⁻¹ bestimmt. Die niedrigste Konzentration betrug 1,3 mg CB g TM⁻¹ bei 125 μmol Photonen m⁻² s⁻¹. Sie unterschied sich nicht signifikant von den Konzentrationen bei 10 und 50 μmol Photonen m⁻² s⁻¹. Bei 75 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ lag die CB-Konzentration bei 1,8 mg CB g TM⁻¹ und bei 100 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ bei 1,9 mg CB g TM⁻¹. Die ermittelten Konzentrationen lagen im Bereich von 2 mg CB g TM⁻¹ (Abb. 25).

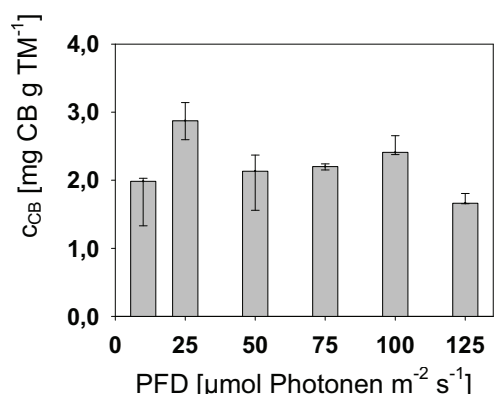


Abb. 25: CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* aus unbelüfteten Kulturen in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, nach 20 Tagen, DMF-Extrakt (Med, Max, Min, $n = 3$)

3.2.2.2 Kultivierung mit Belüftung ohne CO_2 -Anreicherung

Im Bereich von 10 bis $75 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurde zeitunabhängig eine CB-Konzentration von $0,05 \text{ mg CB g TM}^{-1}$ ($p > 0,05$) gemessen. Nach 35 Tagen unterschieden sich die Konzentrationen an Cyanobacterin zwischen 10 und $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nicht signifikant voneinander. Unabhängig von PFD und Zeit konnte CB nicht in allen Replikaten nachgewiesen werden (Abb. 26).

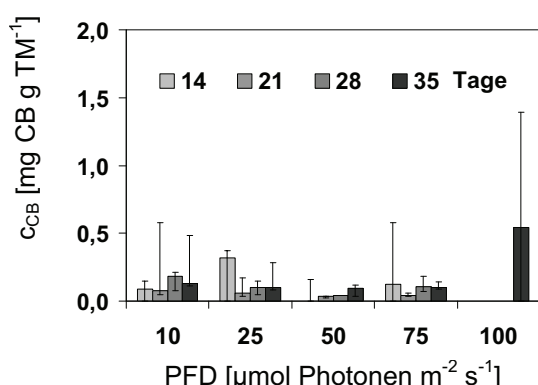


Abb. 26: CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* bei Belüftung ohne Anreicherung von CO_2 in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, über 35 Tage, (Med, Max, Min, $n = 3$)

3.2.2.3 Kultivierung mit 5% (v/v) CO_2

Bei $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ betrug die CB-Konzentration nach 35 Tagen $12,7 \text{ mg CB g TM}^{-1}$. Mit $0,8 \text{ mg CB g TM}^{-1}$ wurde bei $50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die geringste Konzentration ermittelt. Mit weiter steigenden PDF stieg die CB-Konzentration wieder signifikant an. Bei $75 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden $4,2 \text{ mg CB g TM}^{-1}$ und bei $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden $7,7 \text{ mg CB g TM}^{-1}$ synthetisiert. Zwei Replikate bei $125 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ enthielten

4,8 und 5,9 mg CB g TM⁻¹. Im dritten war die Konzentration mit 45,1 mg CB g TM⁻¹ zehn Mal höher (Abb. 27).

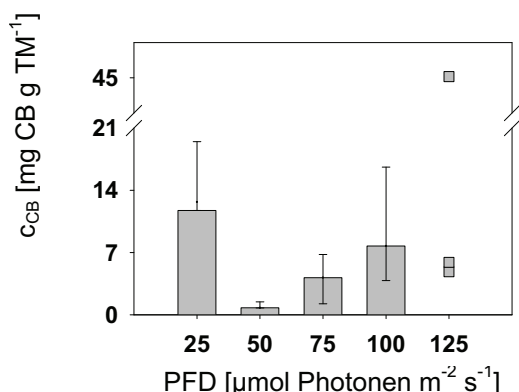


Abb. 27: CB-Konzentration [mg CB g TM⁻¹] in *Scytonema hofmanni* bei Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ in Abhängigkeit von der PFD, H:D12 h : 12 h, nach 35 Tagen, (Med, Max, Min, n = 3; n = 5 bei 25 μmol Photonen m⁻² s⁻¹)

○ Zusammenfassung PFD und CO₂-Verfügbarkeit

Ohne CO₂-Anreicherung enthielt die Trockenmasse von *S. hofmanni* unabhängig von der Photonenflussdichte weniger als 0,5 mg CB g TM⁻¹. Mit 5% (v/v) CO₂ betrug die Cyanobacterinkonzentration bei 25 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ nach 35 Tagen mit 13 mg CB g TM⁻¹ das 250fache gegenüber der Kultivierung ohne CO₂-Anreicherung. Die Cyanobacterinkonzentrationen in der Biomasse unterschieden sich bei 25 und 125 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ (5% (v/v) CO₂) nicht signifikant von einander. Bei 125 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ betrug die Konzentration in einem Replikat 45 mg CB g TM⁻¹. Das entsprach der 3,5fachen Konzentration, die bei 25 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ erhalten wurde.

3.2.2 Variation der Wachstumstemperatur

Cyanobacterinkonzentration:

Bei einer Wachstumstemperatur von 20 °C konnte bis zum 14. Tag kein Cyanobacterin nachgewiesen werden. Die Cyanobacterinkonzentration änderte sich vom 21. bis zum 42. Tag nicht mehr signifikant (0,5 mg CB g TM⁻¹). Das berechnete K_{CB} betrug 0,61 mg CB g TM⁻¹ (Abb. 28a).

Bei 25 °C war in den ersten 14 Tagen wiederum kein CB nachweisbar. Nach 28 Tagen betrug die Konzentration 2,4 mg CB g TM⁻¹. Ein sprunghafter Anstieg der Cyanobacterinkonzentration um das Siebenfache (14,3 mg CB g TM⁻¹) erfolgte nach 35 Tagen (p < 0,05). Mit 11,7 mg CB g TM⁻¹ veränderte sich diese Konzentration bis zum 42. Tag nicht mehr signifikant. Das berechnete K_{CB} betrug 13,4 mg CB g TM⁻¹ (Abb. 28b).

Bei 30 °C erfolgte der Cyanobacterinnachweis ebenfalls erst ab dem 21. Tag. Nach 35 Tagen wurden 0,5 mg CB g TM⁻¹ bestimmt. Das berechnete K_{CB} betrug bei 30 °C 0,5 mg CB g TM⁻¹. Die Werte bei 20 und 30 °C unterschieden sich nicht signifikant von einander (Abb. 28c).

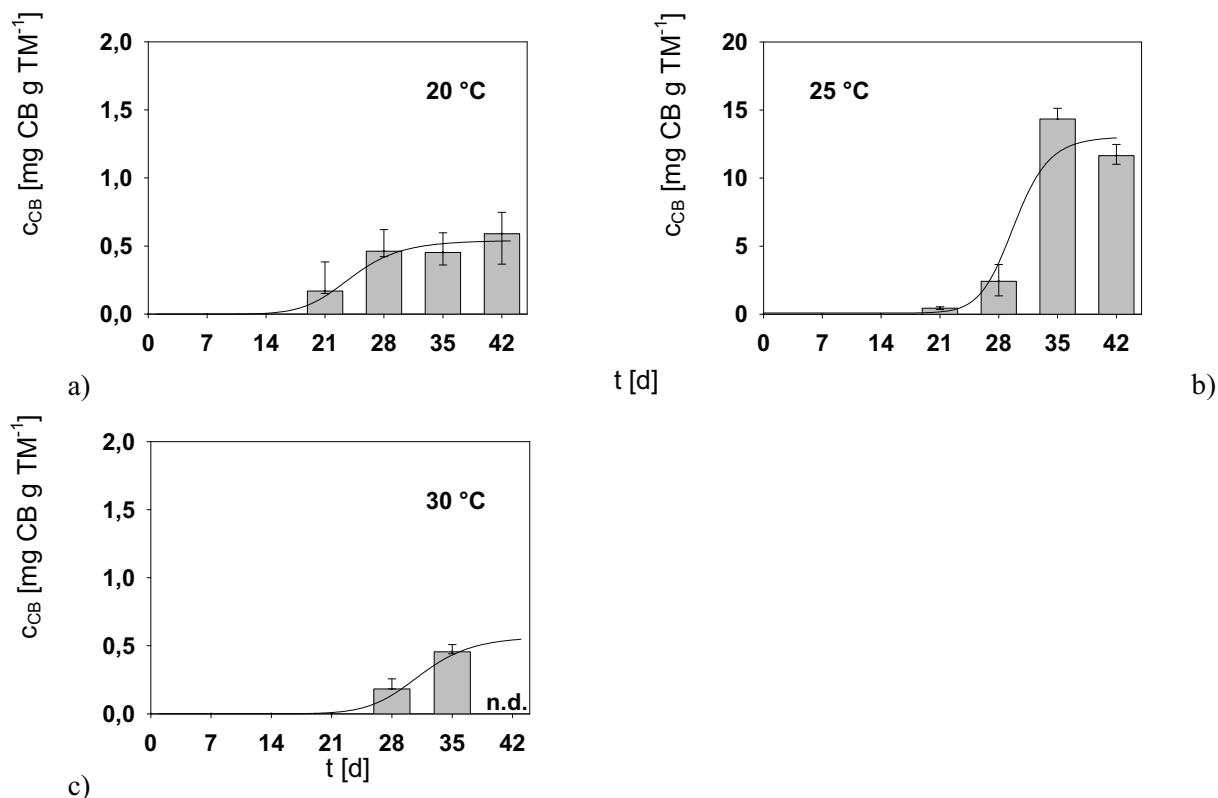


Abb. 28: CB-Konzentration [mg CB g TM⁻¹] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur über 42 Tage, 20 °C (a), 25 °C (b – mit abweichender Skalierung), 30 °C (c), 25 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹, H:D 12:12, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)

Konzentration freier gelöster Aminosäuren im Medium bei 25 °C:

Zwischen dem 7. und 21. Tag unterschieden sich die Konzentrationen freier gelöster Aminosäuren im Medium mit 9,9 μ M nicht signifikant von einander. Nach 28 Tagen verringerte sich die Konzentration signifikant und bis zum 42. Tag wurden keine Veränderungen festgestellt (5,7 μ M).

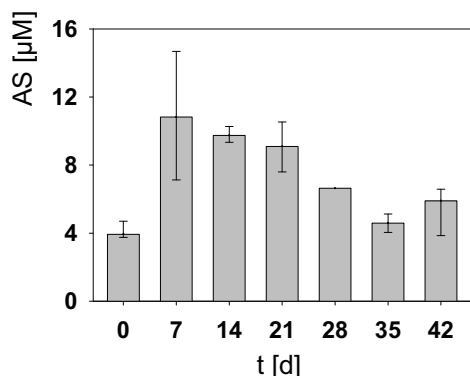


Abb. 29: Konzentration freier gelöster Aminosäuren [μM] im Medium von *Scytonema hofmanni* über 42 Tage; 25 μmol Photonen m⁻²s⁻¹, H:D 12:12; 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)

Das Ergebnis ließ sich auch auf die einzelnen Aminosäuren übertragen. Jedoch verringerte sich die Konzentration von Alanin (A), Asparaginsäure (D), Glycin (G) Asparagin (N), Ornithin (O), Arginin (R), Serin (S) und Histidin (H), Threonin (T) und Valin (V) zwischen dem 7. und 35. Tag um mehr als 50%. Die größte Abnahme der Konzentration erfolgte bei den Aminosäuren Asparaginsäure (83%) sowie Serin / Histidin und Arginin mit jeweils 66%. Die allgemein höchsten Konzentrationen im Medium (gemessen über den gesamten Zeitraum) wurden für Glycin, Ornithin, Serin / Histidin, Alanin und Asparaginsäure bestimmt (Abb. 30).

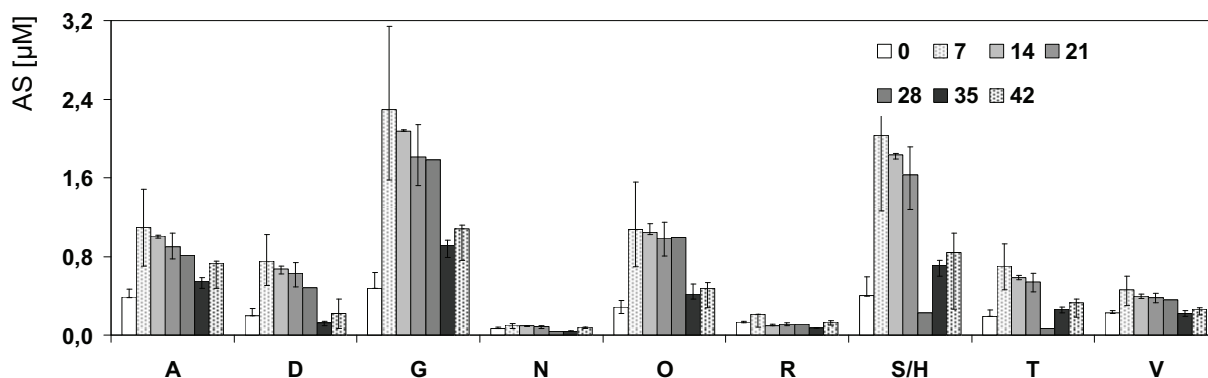


Abb. 30: Konzentration freier gelöster Aminosäuren [μM] im Medium von *Scytonema hofmanni* über 42 Tage; 25 μmol Photonen m⁻²s⁻¹, H:D 12:12; 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)

○ Zusammenfassung Temperatur und Zeit

Bei 20 °C und 30 °C betrug die maximal erreichbare Cyanobacterinkonzentration (K_{CB}) 0,5-0,6 mg CB g TM⁻¹. Dem gegenüber wurde bei 25 °C mit einem K_{CB} von 13 mg CB g TM⁻¹ die 26fache Cyanobacterinkonzentration bestimmt. Bei dieser Temperatur betrug die Konzentration nach 28 Tagen 2 mg CB g TM⁻¹. Nach 35 Tagen erfolgte ein Anstieg auf 14 mg

CB g TM⁻¹. Die Konzentration freier gelöster Aminosäuren im Medium erreichte bei 25 °C nach 35 Tagen ein Minimum.

3.2.3 Variation von Nährstoffen und Spurenelementen

3.2.3.1 Phosphat und Nitrat

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Nährstoffen auf die Cyanobacterinkonzentration in der Biomasse von *S. hofmanni* betrug Konzentration in den Kontrollkulturen 1,9 mg CB g TM⁻¹. Sowohl bei Verwendung des Vollmediums (+N+P) als auch im phosphatfreien Medium (+N-P), wurde das 1,8fache (+N+P: 3,6 mg CB g TM⁻¹; +N-P: 3,3 mg CB g TM⁻¹) der CB-Konzentration der Kontrolle erreicht. Die CB-Konzentration bei +N+P und +N-P unterschied sich nicht signifikant von einander. Im phosphatangereicherten Medium (+N+10P) war die CB-Konzentration mit 2,2 mg CB g TM⁻¹ gegenüber der Kontrolle leicht erhöht und gegenüber dem Vollmedium betrug die Konzentration 60%. Im nitratlimitierten Medium (-N+P) unterschied sich die Konzentration nicht signifikant von der Kontrolle (1,1 mg CB g TM⁻¹). Die Cyanobacterinkonzentration von -N+P betrug gegenüber dem Vollmedium 30%. Im nitratangereicherten Medium wurde kein Cyanobacterin in der TM von *S. hofmanni* nachgewiesen (Abb. 31).

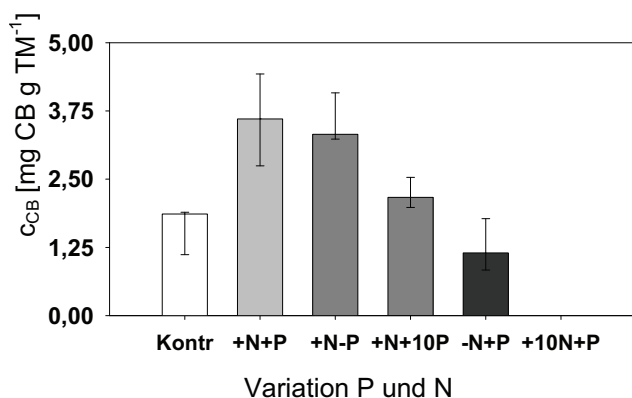


Abb. 31: CB-Konzentration [mg CB g TM⁻¹] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Nährstoffe Phosphat und Nitrat nach 28 Tagen, 25 μmol Photonen m⁻²s⁻¹ H:D 12 h:12 h, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3) (vgl. 2.3.1.3 zu Nährstoffkonzentrationen)

3.2.3.2 Spurenelemente

Bei Untersuchungen zur Abhängigkeit der Cyanobacterinkonzentration von der Verfügbarkeit von Spurenelementen wurden in der Kontrollkultur bei 25 °C ohne Zusatz von Spurenelementen (- all) 15,5 mg CB g TM⁻¹ synthetisiert. Im Vollmedium, angereichert mit allen Spurenelementen (+ all), betrug die CB-Konzentration 31% der Kontrolle (4,7 mg CB g TM⁻¹). Fehl-

te Molybdän, war die Konzentration mit der Kontrolle vergleichbar (16,1 mg CB g TM⁻¹) und unterschied sich signifikant vom Ansatz mit allen Spurenelementen. Fehlten jeweils die anderen Spurenelemente im Medium, war die Cyanobacterinkonzentration gegenüber der Kontrolle geringer (Cu: 8,9 mg CB g TM⁻¹; Zn: 6,3 mg CB g TM⁻¹; B: 5,8 mg CB g TM⁻¹). Bei Mangel an Kupfer, Zink und Bor war das Resultat signifikant und diese Ansätze unterschieden sich nicht von +all. Ohne Kobalt im Medium wurden 8,7 mg CB g TM⁻¹ nachgewiesen. Bei Manganmangel betrug die Konzentration 8,8 mg CB g TM⁻¹ (Abb. 32b).

Bei 20 °C traten, unabhängig von den Spurenelementen, erhebliche Schwankungen in der CB-Konzentration auf. Sie lag unter 10% der bei 25 °C ermittelten. In der Kontrolle wurden 1,3 mg CB g TM⁻¹ gemessen. Wurde das Medium mit allen Spurenelementen angereichert, betrug die Konzentration 46% ($p > 0,05$) der Kontrolle (0,6 mg CB g TM⁻¹) (Abb. 32a).

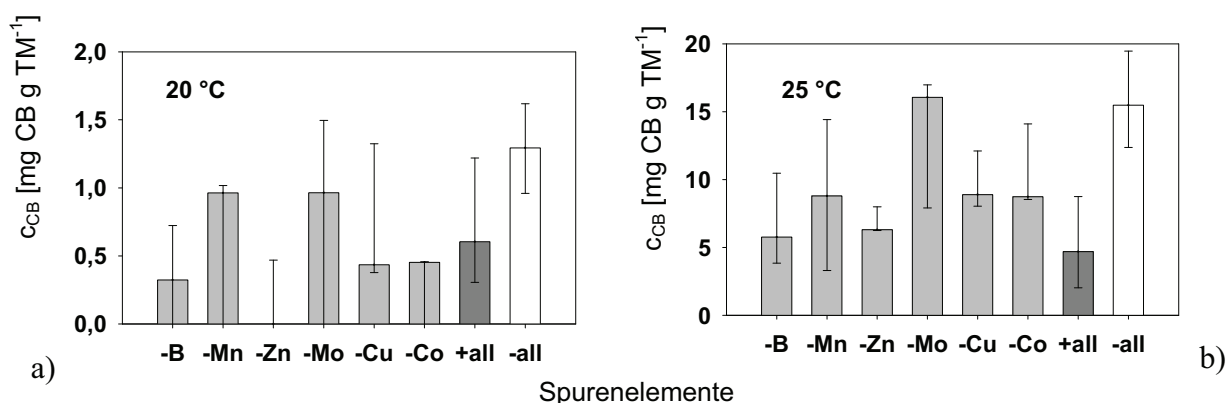


Abb. 32: CB-Konzentration [mg CB g TM⁻¹] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Spurenelementen (+ mit, - ohne) bei 20 °C (a) und 25 °C (b), 25 µmol Photonen m⁻²s⁻¹, H:D 12:12, 35 Tage, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)

○ Zusammenfassung Einfluss der Nährstoffsituation auf die CB-Konzentration in *S. hofmanni*

Gegenüber der Kontrolle erhielt man im Vollmedium nach 2 Wochen die doppelte Cyanobacterinkonzentration (4 mg CB g TM⁻¹). Im phosphatfreien Medium unterschied sich die CB-Konzentration nicht signifikant von der des Vollmediums. Die Cyanobacterinkonzentration im nitratfreien Medium betrug 1 mg CB g TM⁻¹.

Ohne Spurenelemente (Kontrolle) betrug die Cyanobacterinkonzentration bei 25 °C 16 mg CB g TM⁻¹. Mit allen Spurenelementen im Medium wurden bei dieser Temperatur 31% (5 mg CB g TM⁻¹) der Konzentration der Kontrolle bestimmt. Bei Molybdänmangel unterschied sich die Cyanobacterinkonzentration nicht signifikant von der Kontrolle. Fehlten die Elemente Bor, Zink und Kupfer unterschied sich die CB-Konzentration nicht signifikant von der mit allen Spurenelementen. Die Cyanobacterinkonzentration der Kontrolle war unabhän-

gig von der Temperatur größer als im Medium mit allen Spurenelementen. Unabhängig von der Verfügbarkeit der Spurenelemente war die Konzentration bei 20 °C signifikant geringer als bei 25 °C.

3.2.4 Korrelationen der CB-Konzentration in *S. hofmanni*

3.2.4.1 Korrelation der CB-Konzentration mit dem pH-Wert

Die Cyanobacterinkonzentration in *S. hofmanni* korrelierte bei 25 °C (35 Tage), unabhängig von der PFD, der Verfügbarkeit von Spurenelementen mit der Anreicherung der Luft mit CO₂ und mit dem pH-Wert im Medium (Spearman-Rang, zweiseitig, $P < 0,0001$, $n = 59$).

Mit Hilfe der Gauss'schen Gleichung ($y = ae^{-0,5\left(\frac{x-x_{\max}}{b}\right)^2}$, $R^2 = 0,1586$) konnte das Maximum der CB-Konzentration von 8,5 mg CB g TM⁻¹ bei pH 8,4 abgeschätzt werden. (Abb. 33)

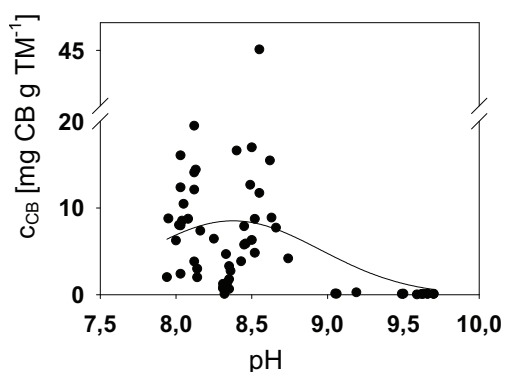


Abb. 33: Korrelation der CB-Konzentration [mg CB g TM⁻¹] in *Scytonema hofmanni* mit dem pH-Wert bei 25 °C nach 35 Tagen, gepoolte Daten unabhängig von PFD, Spurenelementen und zusätzlicher CO₂-Belüftung ($n = 59$, $R^2 = 0,1586$)

3.2.4.2 Korrelation der CB-Konzentration mit der Abundanz

Unabhängig von PFD, Temperatur, Zeit, Spurenelementen und CO₂-Belüftung korrelierte die CB-Konzentration in *S. hofmanni* mit der Abundanz der Kultur (Spearman-Rang, zweiseitig, $p < 0,0001$). Es wurde eine exponentielle Abhängigkeit der CB-Konzentration von der Abundanz festgestellt ($y = 0,5367 e^{(0,0023x)}$, $R^2 = 0,5054$). Bis zu 300 mg TM l⁻¹ lag die Konzentration unter 0,5 mg CB g TM⁻¹. Bei Abundanzen über 600 mg TM l⁻¹ wurden auch CB-Konzentrationen über 5 mg CB g TM⁻¹ ermittelt (Abb. 34).

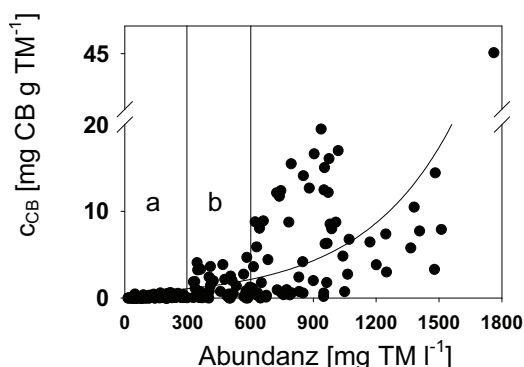


Abb. 34: Korrelation der CB-Konzentration [mg CB g TM⁻¹] in *Scytonema hofmanni* mit der Abundanz [mg TM l⁻¹], gepoolte Daten unabhängig von PFD, Temperatur, Zeit, Spurenelementen und CO₂-Belüftung; a ≤ 0,5 und b ≤ 5,0 mg CB g TM⁻¹ (n = 208, r² = 0,5054)

3.2.4.3 Bestimmung der CB-Konzentration in der Biomasse mittels DMF-Extraktion

In den chromatographisch untersuchten DMF-Extrakten von *S. hofmanni* wurde eine Veränderung des Peaks bei 360 nm in Abhängigkeit von der CB-Konzentration in der Trockenmasse beobachtet. Auf dieser Grundlage wurde eine Berechnung der Cyanobacterinkonzentration mit Absorptionwerten des DMF Extraktes entwickelt (vgl. 2.2.2.2). Die mit beiden Methoden ermittelten Werte für die Konzentrationen korrelierten (Spearman-Rang (zweiseitig), $p < 0,0001$) und es konnte ein lineares Regressionsmodell verwendet werden ($y = x$, n = 52; $R^2 = 0,7204$), (Abb. 35). Mit der DMF-Extraktion erhielt man innerhalb von 24 h Informationen über die Cyanobacterinkonzentration in *S. hofmanni*.

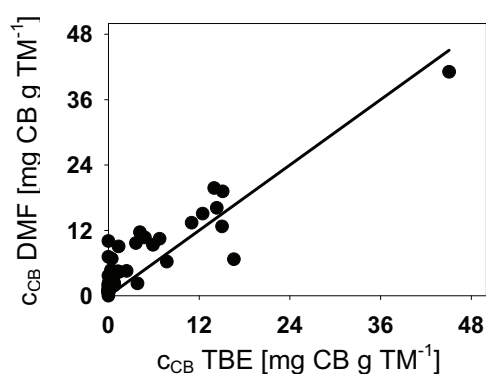


Abb. 35: Korrelation der Cyanobacterinkonzentration [mg CB g TM⁻¹] in *Scytonema hofmanni* ermittelt durch TBE- und DMF-Extraktion; unabhängig von PFD, Temperatur und Zeit; $y = x$; n = 52 ($R^2 = 0,7204$)

3.2.5 CB-Konzentration im Medium

Nur bei wenigen Proben konnte im Medium Cyanobacterin nachgewiesen werden. Die Konzentrationen waren zudem sehr gering und wiesen innerhalb der Replikate große Schwankun-

gen auf. Es konnten keine Gesetzmäßigkeiten bezüglich der CB-Konzentrationen im Medium abgeleitet werden. Beim Nachweis von CB im Medium wurden, unabhängig von PFD, Temperatur und Spurenelementen, Konzentrationen von $43,1 \mu\text{g CB l}^{-1}$ (Max 792,1 Min 4,4; n 45), ermittelt. Das entsprach 40,2‰ (Max 549,0 Min 1,1) des pro Liter Kultur synthetisierten Gesamt-CB. Die CB-Konzentration im Medium korreliert jedoch mit der Konzentration in der Trockenmasse (Spearman Rang, zweiseitig, $p = 0,0081$)

○ Zusammenfassung Korrelation der CB-Konzentration in *S. hofmanni*-Kulturen

Das Maximum der CB-Konzentration ($8,5 \text{ mg CB g TM}^{-1}$) wurde bei einem pH-Wert von 8,4 abgeschätzt. Die Cyanobacterinkonzentration in *S. hofmanni* korrelierte mit der Abundanz der Kultur. Ab 300 mg TM l^{-1} wurden CB-Konzentrationen von über $0,5 \text{ mg CB g TM}^{-1}$ erzielt und ab 600 mg TM l^{-1} erreichten die Konzentrationen Werte über $5 \text{ mg CB g TM}^{-1}$. Mit Hilfe der DMF-Extraktion von *S. hofmanni* ließen sich innerhalb von 24 h Information über die Cyanobacterinkonzentration gewinnen.

Die Konzentration an CB wies im Medium starke Schwankungen auf. Sie betrug im Durchschnitt 40‰ ($43 \mu\text{g CB l}^{-1} \approx 0,1 \mu\text{M}$) der Gesamtkonzentration an Cyanobacterin in einer Kultur.

3.3 Interaktionen von *S. hofmanni* mit photoautotrophen Mikroorganismen

3.3.1 Biotest mit *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma*

Bei der Untersuchung von vitalen Zellen von *S. hofmanni* auf *C. vulgaris* konnten nach sieben Tagen kleine Plaques im *C. vulgaris*-Biofilm von 4,3 mm Durchmesser um die *S. hofmanni*-Kolonien festgestellt werden. Dagegen wurde auf dem Biofilm von *M. firma* keine Reaktion beobachtet. Nach 21 Tagen waren die Plaques bei *C. vulgaris* unverändert ($p = 0,822$). Im Gegensatz dazu, wurden zu diesem Zeitpunkt bei *M. firma* um *S. hofmanni* große Plaques von 30,7 mm Durchmesser ermittelt ($p < 0,05$) (Abb. 36, 37).

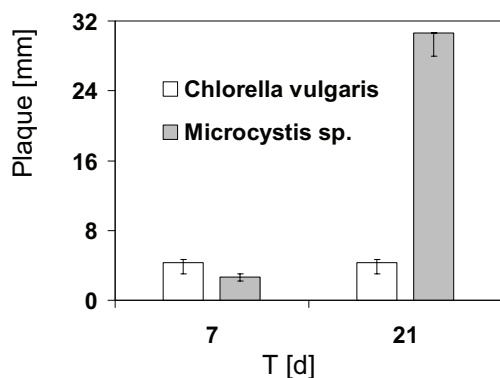


Abb. 36: Plaquesdurchmesser [mm] um *Scytonema hofmanni* auf Agarkulturen von *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma* nach 7 und 21 Tagen. $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (med, max, min, $n = 3$)

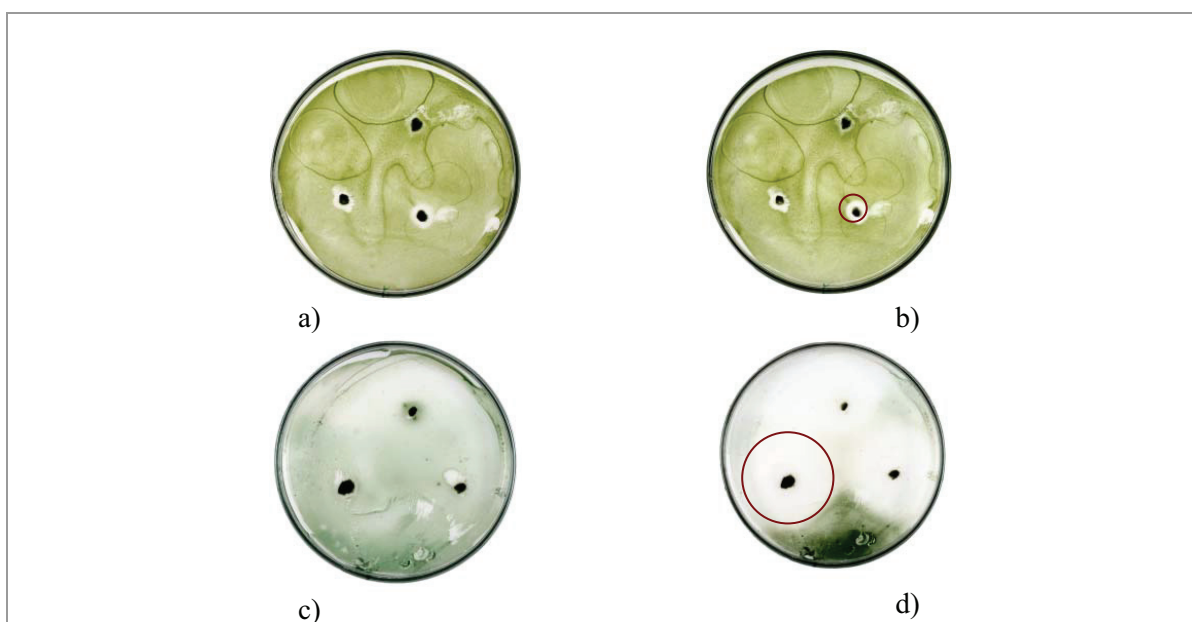


Abb. 37: Plaquesdurchmesser [mm] um *Scytonema hofmanni* auf Agarkulturen von *Chlorella vulgaris* (a, b) und *Microcystis firma* (c, d) nach 7 (a, c) und 21 Tagen (b, d). $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (med, max, min, $n = 3$)

3.3.2 Einfluss von Exsudaten auf die CB-Konzentration

3.3.2.1 Abundanz und CB-Konzentration der Biomasse

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Exsudaten auf die CB-Konzentration in *S. hofmanni* unterschied sich die Abundanz aller Ansätze nach 28 Tagen nicht signifikant voneinander. Sie betrug 470 mg TM l^{-1} .

In der Kontrolle wurde eine Konzentration von $1,4 \text{ mg CB g TM}^{-1}$ gemessen. Keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle ergaben sich nach Zugabe des Mediumextraktes von *Synechocystis* sp. ($0,9 \text{ mg CB g TM}^{-1}$) und von *Chlorella vulgaris* ($2,3 \text{ mg CB g TM}^{-1}$).

Mit dem Mediumextrakt von *M. firma* betrug die CB-Konzentration 5,5 mg CB g TM⁻¹. Sie unterschied sich signifikant von der der Kontrolle (Abb. 38).

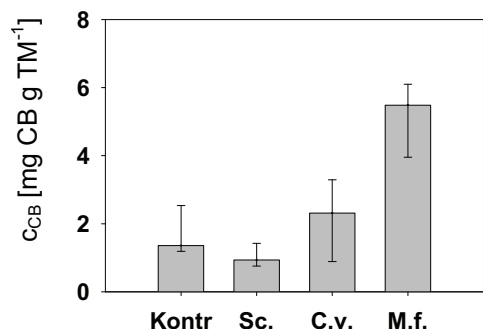


Abb. 38: CB-Konzentration [mg CB g TM⁻¹] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von den Exsudaten von *Synechocystis* sp., *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma* nach 28 Tagen; 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)

3.3.2.2 Freie gelöste Aminosäuren im Medium photoautotropher Mikroorganismen

Die höchste Konzentration freier gelöster Aminosäuren wurde im Medium von *M. firma* mit 20 μM bestimmt. Bei *Synechocystis spec.* und *C. vulgaris* waren die Konzentrationen mit 4,5 und 2,2 μM deutlich geringer. (Abb. 39)

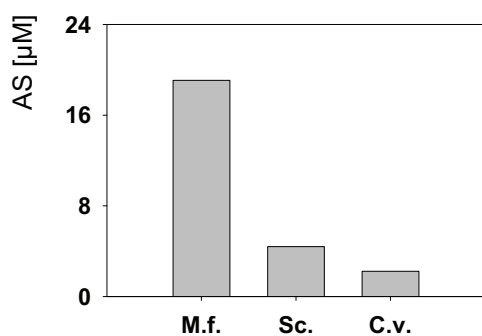


Abb. 39: Konzentration freier gelöster Aminosäuren [μM] im Medium von *Synechocystis* sp., *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma* nach 14 Tagen, 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ H:D 12:12, 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (n = 1)

Die höchsten Konzentrationen im Mediumextrakt von *M. firma* wurden bei Glycin mit 7,1 μM , bei Phenylalanin und Serin mit 1,9 μM und bei Isoleucin mit 1,2 μM bestimmt (Abb. 40).

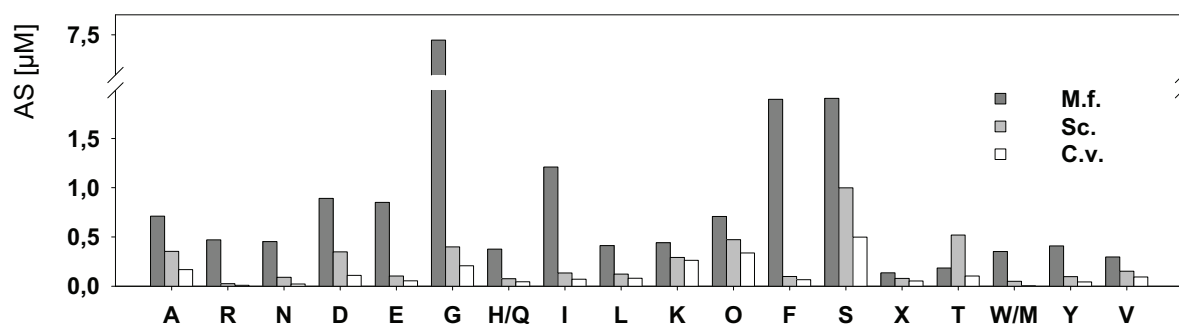


Abb. 40: Konzentration der einzelnen freien gelösten Aminosäuren [µM] im Medium von *Synechocystis* sp., *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma* nach 14 Tagen, 25 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ H:D 12:12, 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (n = 1)

3.3.3 Cyanotoxine und Arginin

3.3.3.1 Abundanz und CB-Konzentration der Biomasse

Der Einfluss von Cyanotoxinen und der Aminosäure Arginin auf die Konzentration von Cyanobacterin in der Trockenmasse von *Scytonema hofmanni* wurde anhand von Ansätzen untersucht, deren Abundanzen sich nach 28 Tagen nicht signifikant voneinander unterschieden. Sie betragen 425 mg TM l⁻¹. In der Kontrolle wurde eine CB-Konzentration von 1,9 mg CB g TM⁻¹ bestimmt. Mit Arginin betrug die Konzentration 5,3 mg CB g TM⁻¹ und mit Microcystin 4,0 mg CB g TM⁻¹. Die Erhöhung der Cyanobacterinkonzentration war in beiden Fällen signifikant (Arginin: p = 0,039; Microcystin p = 0,02). Die Zugabe von Cyanobacterin zum Medium von *S. hofmanni* führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Konzentration in der Trockenmasse (1,8 mg CB g TM⁻¹) (Abb. 41)

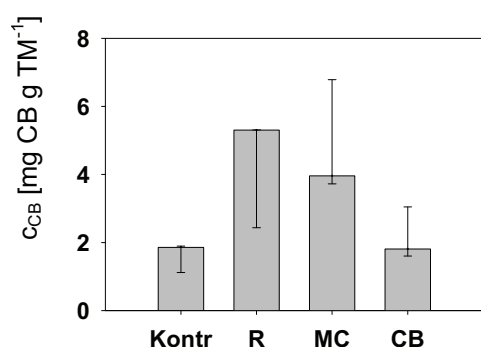


Abb. 41: CB-Konzentration [mg CB g TM⁻¹] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von Cyanotoxinen und Arginin nach 28 Tagen; 25 µmol Photonen m⁻²s⁻¹, H:D 12:12, 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)

- Zusammenfassung Interaktionen von *S. hofmanni* mit photoautotrophen Mikroorganismen

Im Biotest wurde nach sieben Tagen keine Reaktion von *S. hofmanni* auf *M. firma* beobachtet. Jedoch betrug nach 21 Tagen der Durchmesser der Plaques um *S. hofmanni* auf *M. firma* 31 mm.

Die höchste Konzentration freier gelöster Aminosäuren (aufsummiert) der zu untersuchenden Organismen wurde im Medium von *M. firma* mit 20 μM bestimmt. Nach Zugabe des Mediumextraktes von *M. firma* wurde gegenüber der Kontrolle eine um das Vierfache erhöhte CB-Konzentration in der Trockenmasse von *S. hofmanni* bestimmt. Durch den Zusatz des Cyanotoxins Microcystin konnte gegenüber der Kontrolle eine Verdopplung und mit Arginin eine Verdreifachung der CB-Konzentration erzielt werden. Cyanobacterin selbst führte zu keiner signifikanten Erhöhung CB-Konzentration in der Biomasse von *S. hofmanni*.

3.4 Toxikologie von Cyanobacterin

3.4.1 Toxizität

3.4.1.1 Photoautotrophe Mikroorganismen

Akute Toxizität:

Mit einer ED_{50} von 0,12 μM CB reagierte *N. pusilla* am empfindlichsten auf Cyanobacterin. Bei *C. vulgaris* betrug die ED_{50} 0,29 μM CB. *M. firma* wies mit 1,24 μM CB eine um das zehnfache geringere Empfindlichkeit gegenüber Cyanobacterin auf (Abb. 42a).

Die ED_{DCMU} von *N. pusilla* und *M. firma* unterschieden sich nicht signifikant voneinander (*N. pusilla*: 1,02 μM CB und *M. firma*: 1,28 μM CB). ED_{DCMU} von *C. vulgaris* war mit 0,84 μM CB signifikant geringer als bei den anderen beiden Arten (Abb. 42b).

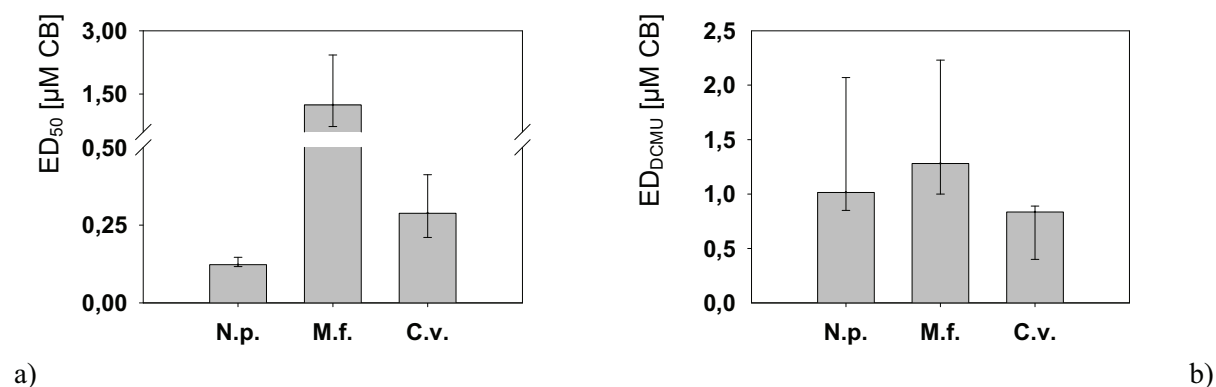


Abb. 42: ED_{50} (a) und ED_{DCMU} (b) [μM CB] auf die Photosyntheseaktivität (Φ_{max}) von *Nitzschia pusilla*, *Microcystis firma* und *Chlorella vulgaris* (Med, Max, Min, $n = 4$)

Durch dem Zusatz von 4,65 μM CB Cyanobacterin unterschied sich Φ_{max} von *S. hofmanni* mit 99,0% nicht von der Kontrolle ohne zusätzliches Cyanobacterin (99,8%). Bei *S. hofmanni* bewirkte DCMU [0,01 μM] nur eine geringe Hemmung von Φ_{max} um 16% (Abb. 43).

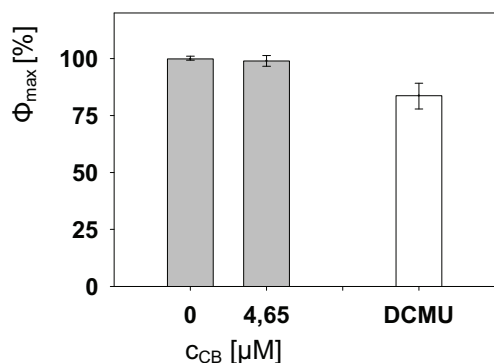


Abb. 43: Φ_{max} [%] unter Einfluss von Cyanobacterin und DCMU auf *Scytonema hofmanni* (Med, Max, Min, n = 4; DCMU [0,01 μM], n = 8)

Subchronische Toxizität:

Ohne CB nahm Φ_{max} von *N. pusilla* innerhalb von vier Tagen von 94,6% auf 79,5% leicht ab. Bei der geringsten Cyanobacterinkonzentration war nach einem Tag Φ_{max} kaum nachweisbar. Innerhalb von vier Tagen wurde konzentrationsabhängig ein signifikanter Erholungseffekt festgestellt ($p \leq 0,05$). Φ_{max} erhöhte sich bei 0,02 μM CB von 5,8 auf 51,8% und bei 0,23 μM CB von 15,2 auf 48,0. Bei der höchsten Konzentration von 1,16 μM CB wurde nach 4 Tagen bei zwei Replikaten eine Steigerung von Φ_{max} um 27% beobachtet, während beim dritten keine Aktivität mehr festgestellt wurde. Trotz des Erholungseffektes war Φ_{max} durch Cyanobacterin nach vier Tagen noch signifikant gehemmt (Abb. 44).

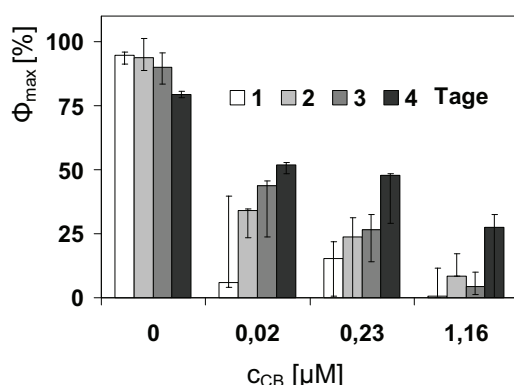


Abb. 44: Zeitlicher Verlauf von Φ_{max} [%] für *Nitzschia pusilla* in Abhängigkeit von der applizierten CB-Konzentration [μM] im Medium (Med, Max, Min, n = 3)

Ausgehend von einer Abundanz von $0,05 \times 10^6$ Zellen ml^{-1} wurde das exponentielle Wachstum über vier Tage bestimmt. Ohne Cyanobacterin betrug μ 0,35 d^{-1} . Bei 0,02 μM CB wurde

eine Wachstumsrate von $0,15 \text{ d}^{-1}$ bestimmt. Die Rate betrug bei $0,23 \text{ }\mu\text{M}$ CB $0,06 \text{ d}^{-1}$ und bei $1,16 \text{ }\mu\text{M}$ CB $0,08 \text{ d}^{-1}$. Gegenüber der Kontrolle wurde mit allen verwendeten Cyanobacterinkonzentrationen eine signifikante Wachstumshemmung erreicht (Abb. 45).

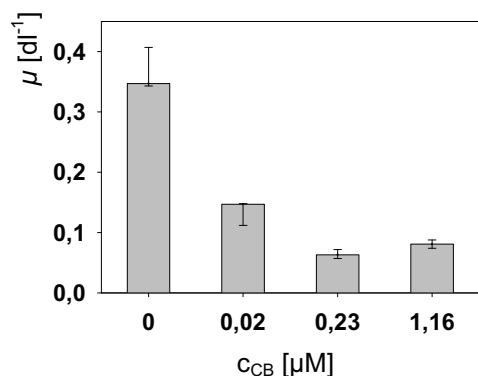


Abb. 45: Wachstumsraten von *Nitzschia pusilla* in Abhängigkeit von der CB-Konzentration [μM] über 4 Tage basierend auf der Abundanz [$Z \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$] (Med, Max, Min, $n = 3$)

3.4.1.2 Cyprisarven von *Balanus improvisus*

Unabhängig von der CB-Konzentration erfolgte die Adhäsion und Metamorphose von Cyprisarven im Wesentlichen bis zum zweiten Tag. Nach drei Tagen waren bei Zusatz von CB gegenüber der Kontrolle (79%) geringfügig weniger ($p < 0,05$) Cyprisarven zu jungen Adulti metamorphosiert ($23,3 \text{ }\mu\text{M}$ CB: 72%; $58,1 \text{ }\mu\text{M}$ CB: 71%). Zwischen den beiden verwendeten CB-Konzentrationen wurden nach drei Tagen keine signifikanten Unterschiede der Anzahl der Anheftungen und Metamorphosen festgestellt. (Abb. 46)

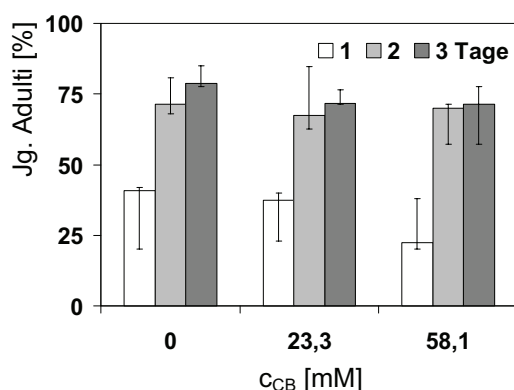


Abb. 46: Zu jungen Adulti metamorphosierte Cyprisarven von *Balanus improvisus* [%] in Abhängigkeit von der CB-Konzentration [μM] über 3 Tage (Med, Max, Min, $n = 3 \times 50$)

3.4.2 Persistenz im Flusswasser

Mit einer Ausgangskonzentration von $2,3 \text{ }\mu\text{M}$ (1 mg l^{-1}) wurde der Abbau von Cyanobacterin im natürlichen Medium (Flusswasser der Unterwarnow) bei 10 und bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ untersucht.

Bei 10°C betrug die Halbwertszeit von Cyanobacterin 5,0 Tage. Die Halbwertszeit verringerte sich bei 20 °C signifikant um 30% auf 3,5 Tage (Abb. 47).

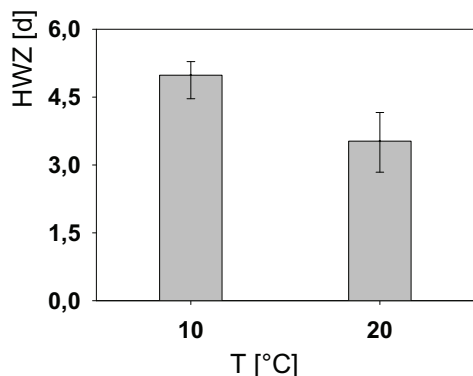


Abb. 47: Halbwertszeit von Cyanobacterin im natürlichen Medium Flusswasser der Warnow in Abhängigkeit von der Temperatur (Med, Max, Min, n = 3)

○ Zusammenfassung Toxizität von Cyanobacterin

Für die getesteten Arten war bei *N. pusilla* die ED_{50} von Cyanobacterin mit 0,1 μM am geringsten. *M. firma* wies mit 1,2 μM die höchste ED_{50} auf. Bei der höchsten getesteten CB-Konzentration (4,65 μM) unterschied sich Φ_{max} bei *S. hofmanni* nicht signifikant von der unbehandelten Kontrolle. DCMU verursachte bei *S. hofmanni* gegenüber der Kontrolle nur eine geringe Hemmung von Φ_{max} um 16%. Nach einem Tag Inkubation mit 0,02 μM Cyanobacterin betrug Φ_{max} von *N. pusilla* 6%. Nach vier Tagen erhöhte sich Φ_{max} auf 52%. Bei dieser Konzentration wurde über die vier Tage eine Wachstumsrate von 0,15 d^{-1} berechnet. Das Wachstum war gegenüber der Kontrolle um 43% gehemmt.

Cyanobacterin hemmte die Metamorphose von *B. improvisus* bei Konzentrationen von 23 und 58 μM um 7%.

Die Halbwertszeit von Cyanobacterin betrug bei 20 °C im Flusswasser 3,5 Tage.

4. Diskussion

4.1 Kultivierung von *S. hofmanni*

4.1.1 Optimale Kultivierung für eine maximale Cyanobacterin-Ausbeute

Für eine effektive biotechnische Produktion von Cyanobacterin durch *Scytonema hofmanni* ist es notwendig, die Ausbeute an Biomasse zu maximieren. Hierfür sind optimale Kultivierungsbedingungen eine wichtige Voraussetzung.

Über den langen Kultivierungszeitraum von bis zu sechs Wochen erfolgte im belüfteten und ungepufferten Kulturmedium von *S. hofmanni* ein Anstieg des pH-Wertes auf über 9,5. Auch durch die Puffer MOPS, Piperin, HEPES und TRIS wurde der pH-Wert nicht dauerhaft konstant gehalten. Mit einer maximal möglichen Abundanz (K_{TM}) von 250 mg TM l^{-1} betrug unter diesen Bedingungen die Biomasseausbeute von *S. hofmanni* nur etwa zwei Drittel der von MASON et al. (1982) beschriebenen 400 mg TM l^{-1} . Durch die Karbonatpufferung (Belüftung mit 5% (v/v) CO_2) erhöhte sich der pH-Wert im Gegensatz dazu nur leicht auf 8,5. Das natürliche Karbonatpuffersystem erwies sich somit als sehr effektiv, um den pH-Wert auch über längere Zeit konstant zu halten. In dem so gepufferten Medium wurde dann durchschnittlich das Dreifache an Biomasse produziert ($K_{TM} = 1300 \text{ mg TM l}^{-1}$). Eine vergleichbar hohe Abundanz entwickelte sich auch in den unbelüfteten verschlossenen Polypropylenküvetten. Das durch die Respiration der lebenden Zellen abgegebene CO_2 reicherte sich im geschlossenen System an und bildete zusammen mit dem Natriumkarbonat des Mediums ebenfalls ein Karbonatpuffersystem. In dem so gepufferten Medium lag der pH-Wert nach 10 Tagen konstant bei 8,6. Für das Wachstum von *S. hofmanni* konnte aus allen Ergebnissen der optimale pH-Wert von ca. 8,2 abgeschätzt werden. Bereits MASON et al. (1982) beschrieben die Notwendigkeit der CO_2 -Anreicherung für ein optimales Wachstum von *S. hofmanni*. Über den zeitlichen pH-Verlauf fanden sich jedoch keine Angaben. Das pH-Optimum für das Wachstum einer verwandten Art, *Scytonema ocellatum*, wurde von PATTERSON & BOLIS (1993) mit 8 bis 8,5 angegeben. Bereits bei GENTILE & MALONY (1969) finden sich Angaben für das optimale Wachstum von Cyanobakterien in diesem Bereich. *Scytonema*-Arten wachsen somit in Kultur bei einem pH-Wert zwischen 8,0 und 8,5 optimal. Darum werden im Folgenden nur die Ergebnisse der Kultivierung mit CO_2 -Anreicherung diskutiert.

Bei Dauerlicht und verschiedenen PFD starben mehrfach Replikate von *S. hofmanni* ab, so dass keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten wurden. Bei einem Lichtrhythmus von H:D 12:12 konnte die Reproduzierbarkeit gewährleistet werden. Folglich beziehen sich die hier diskutierten Ergebnisse auf H:D 12:12. Mit steigender PFD (Ausnahme: $50 \text{ } \mu\text{mol Photo-}$

nen m^2s^{-1}) veränderte sich die Biomasseproduktion nicht signifikant. Die Abundanz nach 35 Tagen Kultivierungszeit betrug durchschnittlich $1300 \text{ mg TM l}^{-1}$. Bei $50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ wies die Abundanz von *S. hofmanni* mit 409 mg TM l^{-1} ein Minimum auf. Jedoch wurde damit die von MASON et al. (1982) bei dieser PFD erhaltene Abundanz von 400 mg TM l^{-1} bestätigt. Nach PATTERSON & BOLIS (1993) unterschieden sich die erhaltenen Abundanzen (600 mg TM l^{-1}) der verwandten Art *Scytonema ocellatum* bei 25 und $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ebenfalls nicht voneinander. Jedoch konnte bei $125 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ eine Tendenz zu einer höheren Abundanz beobachtet werden. So wurde bei einem Replikat bei $125 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mit $1762 \text{ mg TM l}^{-1}$ die höchste Abundanz dieser Untersuchungen ermittelt. *Scytonema* sp. (TISTR 8208) erreichte bei $200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ H:D 12:12 sogar $4000 \text{ mg TM l}^{-1}$ (CHETSUMON et al., 1994). Offensichtlich sind hohe PFD doch ebenso dafür geeignet, um viel Biomasse zu produzieren (vgl. 4.2)

Eine hohe Abundanz von *S. hofmanni* (UTEX 1581) wurde bei 25 und $125 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (H:D 12:12) erreicht. Die folgenden diskutierten Ergebnisse wurden bei $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (H:D 12:12) gewonnen.

Nach vier Wochen Kultivierung wurde eine *S. hofmanni*-Biomasse von 400 mg TM l^{-1} erreicht. Diese Abundanz wurde von MASON et al. (1982) bereits nach drei Wochen beschrieben. Die Verzögerung um eine Woche kann hier mit dem Mörsern der Biomasse für den Ansatz erklärt werden. Im Wesentlichen erfolgte die Zunahme der Abundanz dann zwischen der dritten und vierten Woche. Vom 35. bis zum 42. Tag änderte sich die Abundanz nicht mehr signifikant.

Das tropische Cyanobakterium *S. hofmanni* ließ sich nur in einem eng begrenzten Temperaturbereich kultivieren. Bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ und bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$ waren die Kulturen bereits nach sieben Tagen abgestorben. In der Literatur variieren die Angaben hinsichtlich der Kultivierungstemperatur zwischen $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (z.B. MASON et al 1982; ABARZUA et al., 1999). Nach 35 Tagen wurde die geringste Biomasse bei Temperaturen von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ produziert (510 mg TM l^{-1}). Bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ betrug die Abundanz 630 mg TM l^{-1} . Die höchste Biomasse je Liter Kultur wurde mit 740 mg TM l^{-1} ($K_{\text{TM}} = 1300 \text{ mg TM l}^{-1}$) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht.

Durch den Wechsel des Mediums nach 14 Tagen wurde die Biomasseproduktion von *S. hofmanni* positiv beeinflusst. Gegenüber der Kontrolle (ohne Austausch des Mediums) wurde das Doppelte an Biomasse produziert. Im phosphatfreien Medium war die Abundanz genauso niedrig wie in der Kontrolle. Somit zeigte sich, dass Phosphat (SRP) für *S. hofmanni* unter Laborbedingungen ein limitierender Nährstoff ist. Um die Biomasseausbeute zu steigern, erfolgte bei von MASON et. (1982) die Kultivierung bei der zehnfachen Konzentration an Phos-

phat. Jedoch zeigten die hier vorgestellten Untersuchungen wie auch die von PATTERSON & BOLIS (1995) an *Scytonema ocellatum*, dass bereits diese Konzentration das Wachstum von *Scytonema* signifikant hemmte. Im stickstofflimitierten Medium wächst *S. hofmanni* sehr gut. Die Abundanzen von *S. hofmanni* sowohl aus dem Standardmedium als auch ohne Nitrat unterschieden sich nicht signifikant. Bei einer zehnfach erhöhten Nitratkonzentration kam es aber bereits zum Absterben der Kultur. PATTERSON & BOLIS (1995) fanden bei *S. ocellatum* bei Nitratkonzentrationen zwischen 1,5 und 23 mM keine signifikanten Unterschiede in der Abundanz. Jedoch bei höheren Konzentrationen wurde das Wachstum ebenfalls signifikant gehemmt. Damit liegt die, für die Kultivierung von *S. hofmanni* verwendete Nitratkonzentration von 14 mM genau in diesem optimalen Bereich. In der o.g. Arbeit wurde das verwendete Natriumnitrat für die Kultivierung von *S. ocellatum* ebenfalls als die am besten geeignete anorganische Stickstoffquelle im Medium identifiziert.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von ABARZUA et al. (1999) war bei MASON et al. (1982) das BG11-Medium mit Spurenelementen nach STANIER et al. (1971) angereichert. Gegenüber dem nicht angereicherten BG11-Medium wurde durch die Zugabe aller Spurenelemente tendenziell weniger Biomasse erhalten. Wie Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, beeinflusste diese Kombination an Spurenelementen das Wachstum von *Scytonema hofmanni* (UTEX 1581) nicht signifikant. Offenbar hemmen Bor und Mangan das Wachstum von *S. hofmanni*. Denn fehlten diese Spurenelemente, war die Abundanz sogar deutlich höher als in der Kontrolle. Bei Kupfermangel war die Abundanz noch geringer, als im mit allen Spurenelementen angereicherten Medium. Kupfer ist ein wichtiger Co-Faktor der Enzyme der Atmungskette und somit für Lebewesen essentiell. Neben Eisen und Zink ist Kupfer ein wichtiger Co-Faktor der Superoxid-Dismutase (RAVEN et al., 1999). Das von MÄRZ & ZANKL (1993) für *S. hofmanni*-Isolate aus den Everglades entwickelte Medium enthielt nur die Spurenelemente Kupfer, Kobalt, Eisen und Zink.

Neben einer hohen Biomasseausbeute ist es für die biotechnische Cyanobacterinproduktion wichtig, die in der Biomasse akkumulierte Konzentration an Cyanobacterin zu maximieren. Die Biomasse von *S. hofmanni* enthielt bei Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ unabhängig von der PFD die höchsten Konzentrationen an Cyanobacterin. Im Vergleich zur Kultivierung ohne zusätzliche CO₂-Belüftung wurde bei 25 µmol Photonen m²s⁻¹ (H:D 12:12) und 25 °C 280 mal mehr Cyanobacterin produziert. Bei dieser Kohlendioxidkonzentration wurden auch von CHETSUMON et al. (1994) maximale Konzentrationen von Sekundärmetaboliten in *Scytonema* sp. (TISTR 8208) in einem Photobioreaktor beschrieben. Ohne CO₂-Zusatz betrug die Ausbeute in dieser Studie nur die Hälfte und bei höheren CO₂-Konzentrationen verringerte sie

sich weiter deutlich. Für die Biosynthese von Cyanobacterin durch *S. hofmanni* durfte der pH-Wert nicht unter 8 sinken oder über 9 ansteigen. Sowohl bei einem konstanten, durch veränderliche CO₂-Konzentrationen regulierten pH-Wert von 7,7 (Kultivierung im Photobioreaktor des IGV Potsdam) als auch bei pH-Werten > 9 wurden nur sehr geringe Cyanobacterinkonzentrationen ($\leq 0,5 \text{ mg CB g TM}^{-1}$) nachgewiesen. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Variabilität anderer abiotischer Faktoren. Der optimale pH-Wert für die Biosynthese von Cyanobacterin durch *Scytonema hofmanni* (UTEX 1581) wurde aus allen Ergebnissen mit 8,4 abgeschätzt. Für die Synthese eines anderen Sekundärmetaboliten, Scytophycin, in der verwandten Art *S. ocellatum* wurde ein optimaler pH-Wert von 8,5 angegeben. Sowohl bei pH 8 als auch bei pH 9 betrug hier die Ausbeute an Scytophycin nur noch 50% (PATTERSON & BOLIS 1993). Offensichtlich werden Cyanotoxine in *Scytonema*-Arten in Kultur bei pH-Werten zwischen 8,0 und 8,5 synthetisiert. Somit werden im Weiteren nur die Ergebnisse der Kultivierungen mit 5% (v/v) CO₂ diskutiert.

Die in dieser Arbeit ermittelte PFD-Abhängigkeit der Cyanobacterinsynthese bezog sich auf H:D 12:12. Bei 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ wies die Cyanobacterinkonzentration in der Biomasse von *S. hofmanni* nach 35 Tagen mit nur 1 mg CB g TM⁻¹ ein Minimum auf. *S. hofmanni* wurde von MASON et al. (1982) bei derselben PFD kultiviert. Hierbei wurden 2 mg CB g TM⁻¹ gewonnen. Demgegenüber konnte bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ die Cyanobacterinausbeute um das Siebenfache (14 mg CB g TM⁻¹) gesteigert werden. Bei 100 und 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ unterschied sich die Cyanobacterinkonzentration nicht signifikant von der bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Jedoch wurden in einem Replikat bei 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 45 mg CB g TM⁻¹ bestimmt. Diese Konzentration wurde in der Biomasse einer Kultur mit der höchsten Abundanz innerhalb dieser Untersuchungen erreicht (s.o). Es handelt sich hierbei auch um die höchste jemals beschriebene Cyanobacterinkonzentration in *S. hofmanni* (vgl. z.B. MASON et al., 1982, ABARZUA et al., 2002). Die optimale Photonenflussdichte für die Synthese von Cyanobacterin durch *S. hofmanni* (UTEX 1581) lag bei 25 und 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (H:D 12:12). Die weiter diskutierten Ergebnisse basieren auf der Kultivierung bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (H:D 12:12).

Geringe Konzentrationen an Cyanobacterin wurden unter den o.g. Kultivierungsbedingungen nach drei Wochen in der Biomasse nachgewiesen. Aber erst nach vier Wochen wurde die bei MASON et al. (1982) bereits nach drei Wochen beschriebene CB-Konzentration (2 mg CB g TM⁻¹) überschritten. Zwischen der vierten und fünften Woche erfolgte jedoch ein sprunghafter Anstieg der Konzentration auf das Siebenfache. Nach sechs Wochen erhöhte sich die Cyanobacterinkonzentration nicht mehr signifikant. Damit konnte der optimale Erntezeitpunkt

von *Scytonema hofmanni* (UTEX 1581), bei dem viel Biomasse mit einer hohen Cyanobacterinkonzentration gewonnen wird, auf 35 Tage festgelegt werden.

Die Temperatur hatte auf die Biosynthese von Cyanobacterin einen gravierenden Einfluss. Nur eine kaum nachweisbare Konzentration von Cyanobacterin ($0,5 \text{ mg g TM}^{-1}$) wurde bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ermittelt. Das entsprach einem Viertel der von MASON et al. (1982) beschriebenen Konzentration (2 mg g TM^{-1}). Im Gegensatz dazu wurde bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $14 \text{ mg CB g TM}^{-1}$ ($K_{\text{CB}} = 13 \text{ mg CB g TM}^{-1}$) das Siebenfache dieser Cyanobacterinkonzentration synthetisiert. Von PATTERSON & BOIS (1993) wurde eine maximale Konzentration des Sekundärmetaboliten Scytophycin in *S. ocellatum* ebenfalls bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ beschrieben. Die optimale Temperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ für die Biosynthese von Cyanobacterin durch *Scytonema hofmanni* (UTEX 1581) wurde in den Untersuchungen als Standardtemperatur verwendet.

Durch den Wechsel des Mediums nach 14 Tagen Kultivierung verdoppelte sich die CB-Konzentration in der Biomasse von *S. hofmanni*. SRP spielte für die biomassespezifische Synthese von CB offensichtlich keine Rolle, denn sowohl im phosphatfreien als auch im Standard BG11-Medium unterschieden sich die Konzentration von CB nicht signifikant von einander. Bei zehnfacher Konzentration hemmte SRP allerdings die Bildung von Cyanobacterin. Die verwendete Nitratkonzentration von 14 mM im Medium lag nur wenig höher als die von PETERSON & BOLIS (1995) für die Synthese von Tolytoxin in *S. ocellatum* beschriebene optimale Konzentration von $9\text{-}12 \text{ mM}$. Im Medium ohne Nitrat erreichte die CB-Konzentration ein Minimum. Sie betrug nur etwa die Hälfte der Konzentration in der Kontrolle. Eine optimale Nitrat-Stickstoffversorgung ist somit eine wichtige Voraussetzung, um höhere CB-Konzentrationen zu erhalten.

Spurenelemente beeinflussten die CB-Synthese in *S. hofmanni* grundlegend. Die CB-Konzentration betrug in der Biomasse, die bei der Kultivierung in Standard-BG11-Medium gewonnen wurde, $15 \text{ mg CB g TM}^{-1}$. In der Biomasse aus dem mit allen Spurenelementen angereicherten Medium betrug die CB-Konzentration jedoch nur ein Drittel dieser Konzentration. Von den verwendeten Spurenelementen ist Molybdän anscheinend ein Inhibitor der Cyanobacterinsynthese. Fehlte Molybdän im Medium, unterschied sich die Cyanobacterinkonzentration nicht signifikant von der Kontrolle und es wurde mehr Cyanobacterin als im Medium mit allen Spurenelementen synthetisiert. Synergieeffekte der Spurenelemente untereinander sind wahrscheinlich, da im Medium mit allen Spurenelementen tendenziell die geringste Konzentration an Cyanobacterin ermittelt wurde. Für die Biosynthese von Cyanobacterin durch *Scytonema hofmanni* (UTEX 1581) erwies sich somit die Spurenelementekombination nach STANIER et al. (1971) als ungeeignet.

Unabhängig von der Variation der abiotischen Parameter, konnte ein Zusammenhang zwischen der Abundanz und der Cyanobacterinkonzentration festgestellt werden. Die Konzentration an Cyanobacterin in der Trockenmasse stieg exponentiell mit der Abundanz von *S. hofmanni*. Bei bis zu 300 mg TM l⁻¹ ist die Cyanobacterinkonzentration jedoch niedriger als 0,5 mg CB g TM⁻¹ und damit schwer nachweisbar. Erst über 600 mg TM l⁻¹ wurden Konzentration über 5 mg CB g TM⁻¹ erreicht. PETERSON & BOLIS (1995) wiesen für die Synthese von Tolytoxin durch *S. ocellatum* ebenfalls eine Korrelation mit der Abundanz nach. Um Cyanotoxine von *Scytonema*-Arten allgemein und Cyanobacterin mit *S. hofmanni* effektiv biotechnologisch zu produzieren, ist es offensichtlich notwendig, hohe Biomassekonzentrationen in der Kultur zu erzeugen. Dies ist neben der Einstellung optimaler Wachstumsbedingungen zusätzlich mit einer erhöhten Ausgangsabundanz zu erreichen. Durch den Austausch des Mediums nach zwei Wochen wurden Bedingungen geschaffen, die einer Kultur mit einem hohen Inokulum entsprechen. Hierbei wurde die doppelte Biomasse mit fast doppelt so hoher Cyanobacterinkonzentration geerntet. *S. hofmanni* wurde während der Untersuchungen mit einem Inokulum von 20 mg TM l⁻¹ (100 mg FM l⁻¹) kultiviert. Nach zwei Wochen Kultivierung unter optimalen Bedingungen betrug die Abundanz 120 mg TM l⁻¹. Das entspricht nur etwa zwei Fünftel der kritischen Abundanz von 300 mg TM l⁻¹, ab der Cyanobacterin nachgewiesen werden kann. Daher ist die Kultivierung von *S. hofmanni* bereits mit einem Inokulum in der Größenordnung von 120 mg TM l⁻¹, das heißt mit etwa 600 mg Frischmasse je Liter sinnvoll. Damit ist es möglich, die Kultivierungszeit von fünf auf drei bis vier Wochen (wie z.B. bei ABARZUA et al. (1999) beschrieben) zu verkürzen.

4.1.2 Überwachung der Biomasse und der Cyanobacterinkonzentration während der Kultivierung von *Scytonem hofmanni*

4.1.2.1 Chlorophyll *a* Fluoreszenz als Biomasseparameter

Die Charakteristik des Wachstums ist ein wesentlicher Aspekt für vergleichende ökophysiologische Untersuchungen. Im Allgemeinen wird für Mikroorganismen die Veränderung der Abundanz [Zellen ml⁻¹] über die Zeit betrachtet. *S. hofmanni* jedoch bildet moosartig stark verzweigte Kolonien, in denen eine genaue Zellzählung nicht möglich ist. Somit wurde die Trockenmasse als Abundanz-Equivalent [mg TM l⁻¹] verwendet. In dieser Arbeit wurde darüber hinaus ein einfaches Konversionsmodell von Chlorophyll *a* Fluoreszenz und Abundanz für *S. hofmanni* erarbeitet. Unter anderem beschrieb GARCIA-PICHEL et al. (1998) den direkten Zusammenhang zwischen Biomasse und Chlorophyll *a* Fluoreszenz bei Cyanobakterien. Die Allgemeingültigkeit dieser Korrelation für photoautotrophe Mikroorganismen wurde von

GUSTAVS et al. (2007) herausgearbeitet. Jedoch führen Prozesse der stressbedingten Akklimation des Photosyntheseapparates zwangsläufig zu Unsicherheiten bei den Vertrauensgrenzen. Das heißt, dass zumindest die Anpassung an unterschiedliche Strahlungsbedingungen zu berücksichtigen ist. Vergleicht man die gemessene Chlorophyll *a* Fluoreszenz und die erhaltene Abundanz bei unterschiedlichen PFD, so unterschied sich die Dynamik erheblich von einander. Die Abundanz unterschieden sich von 10 bis 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nicht signifikant, während die Fluoreszenz kontinuierlich abnahm. Die sich verringernde Fluoreszenz korrelierte jedoch mit einer Abnahme der Chlorophyll *a* Konzentration in der Trockenmasse von *S. hofmanni* mit höheren PFD. Somit erfordert eine Kultivierung bei veränderten PFD eine Korrektur des Korrelationsfaktors in Bezug auf die Biomasse. Somit gilt das entwickelte Modell für vitale und ungestresste Zellen von *S. hofmanni* bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, unabhängig von Temperatur und Zeit. Nach diesem Prinzip ist es also möglich, durch Stichproben die Biomasseausbeute im Bioreaktor zu kalkulieren.

4.1.2.2 Methodenvergleich der Cyanobacterinextraktion mit TBE und DMF

Durch die Extraktion der *S. hofmanni*-Trockenmasse mit TBE konnte bei einer Abundanz unter 300 mg TM l^{-1} kein Cyanobacterin nachgewiesen werden. Im DMF-Extrakt wurden hier jedoch bereits 0,5-2 mg CB g TM $^{-1}$ bestimmt. Wurden in den TBE-Extrakten Cyanobacterinkonzentrationen zwischen 0 und 1 mg CB g TM $^{-1}$ ermittelt, betrug demgegenüber die Konzentration im DMF-Extrakt etwa das Zehnfache. Offenbar ist Cyanobacterin in geringen Konzentrationen permanent in *S. hofmanni* vorhanden (vgl. 4.3). Mit Cyanobacterinkonzentrationen von über 5 mg CB g TM $^{-1}$ stimmten die mit beiden Methoden ermittelten Konzentrationen annähernd überein. Solche Konzentrationen wurde erst bei Abundanzen über 600 mg TM l^{-1} in der Biomasse von *S. hofmanni* bestimmt. Die gewonnene Biomasse aus 250 ml Kultur, wurde auf einen Liter normiert. Demzufolge müssen mindestens 75 mg TM mit TBE extrahiert werden, um Cyanobacterin überhaupt nachzuweisen. Um den Einfluss von Verlusten der Extraktion auf die ermittelte Cyanobacterinkonzentration vernachlässigbar gering zu halten, wird empfohlen, Cyanobacterin mit TBE aus mindestens 150 mg TM zu extrahieren.

Die Extraktion mit TBE erforderte bis zur Analyse mittels HPLC sechs Arbeitsschritte inklusive der Überführung des Rohextraktes vom ersten Lösungsmittel TBE und der Resuspension im zweiten (Methanol). Durch die Vielzahl von Arbeitsschritten der TBE-Extraktion und einer veränderten Löslichkeit von Cyanobacterin in Methanol kann es zu Substanzverlusten kommen. Außerdem können erst nach etwa einer Woche Informationen über die CB-Konzentration gewonnen werden. Von MASON et al. (1982) wurde die TBE-Extraktion von

Cyanobacterin primär also für die quantitative Toxingewinnung entwickelt und optimiert. Demgegenüber wird Cyanobacterin mit DMF mit vertretbarem Aufwand in nur zwei Arbeitsschritten extrahiert und eben auch diese Lösung analysiert. Es reichen einerseits schon 5-10 mg TM für die Extraktion aus, andererseits können Aussagen über die Cyanobacterinkonzentration bereits nach einem Tag getroffen werden. Die DMF-Extraktion von Cyanobacterin aus *S. hofmanni* mit anschließender photometrischer Analyse des Extraktes ist daher für analytische Zwecke geeignet. Eine Bestimmung der CB-Konzentration in kurzen zeitlichen Abständen und mit einem größeren Probenumfang wird bereits während der Kultivierung von *S. hofmanni* praktikabel.

4.2 Anwendung von Cyanobacterin als natürliches Herbizid

Cyanobacterin hemmt die Photosyntheseaktivität von *N. pusilla*, *M. firma* und *C. vulgaris* signifikant bereits nach fünf Minuten. Am sensitivsten reagierte die Kieselalge *N. pusilla*. Das Cyanobakterium *M. firma* wies mit einer ED₅₀ von 1,2 µM die geringste Empfindlichkeit gegenüber Cyanobacterin auf. Die von GLEASON & PAULSON (1984) beschriebene Cyanobacterinkonzentration von 4,6 µM hemmt die Photosynthese verschiedener Cyanobakterienstämme (mit wenigen Ausnahmen) unmittelbar nach Zugabe vollständig. An isolierten Thylakoidmembranen von *Synechococcus* sp. ATCC 27146 erfolgte bereits eine Totalinhibition der O₂-Entwicklung durch Cyanobacterin bei einer Konzentration von 25 nM (CARLSON et al., 1987). Cyanobacterin wirkt nicht nur akut toxisch. Auch über mehrere Tage ist Cyanobacterin bei *N. pusilla* wirksam. Noch nach vier Tagen ist die Photosynthese der Zellen gegenüber der Kontrolle auch bei der geringsten verwendeten Cyanobacterinkonzentration von 0,02 µM signifikant gehemmt. Jedoch konnte innerhalb dieser Zeit ein Erholungseffekt beobachtet werden. Das könnte einerseits mit der sich durch Abbau verringernden Cyanobacterinkonzentration aber auch mit der Anpassung von *N. pusilla* erklärt werden. Unter der Einwirkung des Toxins wächst *N. pusilla* weiter, wenn auch stark gehemmt. Cyanobacterin hemmt nicht nur die Photosynthese von Cyanobakterien und Algen. Sowohl bei aquatischen als auch terrestrische Angiospermen erfolgt eine Inhibition der Elektronentransportkette am Photosystem II. So wurde bei der Wasserlinse *Lemna gibba* das Photosystem II bei den bereits beschriebenen 4,6 µM Cyanobacterin vollständig gehemmt (GLEASON & CASE, 1986). Aus dem Boden wird Cyanobacterin aber nicht aufgenommen. Werden jedoch Blätter z.B. verschiedener Getreidesorten mit Cyanobacterin (1µM) besprüht, sterben die Pflanzen innerhalb von 14 Tagen (GLEASON & CASE, 1986). Sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit, als auch die anderer Autoren unterstreichen die starke herbizide Wirkung von Cyanobacterin. Heterotrophe Bakterien zeig-

ten keine Reaktion auf Cyanobacterin GLEASON & PAULSON (1984). Über mögliche toxische Wirkungen auf tierische Organismen sind in der Literatur widersprüchliche Angaben zu finden. So konnten nach GLEASON (1991) keine Wirkungen auf Tiere festgestellt werden. Dagegen beschrieb KLAPES (1990) eine akute Toxizität gegenüber dem Wasserfloh *Daphnia magna* schon bei den zur Photosynthesehemmung ausreichenden Konzentrationen. In dieser Arbeit konnte jedoch eine Verringerung der zu jungen Adulti metamorphosierten Cyprislarven von *Balanus improvisus* um 7% durch die sehr hohen Cyanobacterinkonzentrationen von 23 mM bzw. 58 mM nachgewiesen werden.

Cyanobacterin wird relativ schnell abgebaut. Bei 20 °C war bereits nach drei Tagen nur noch die Hälfte des Toxins im Warnowwasser nachweisbar. Auch bei niedrigeren Temperaturen erfolgt ein rascher Abbau. Die Halbwertszeit betrug bei 10 °C fünf Tage. Biozide dürfen sich nicht in der Umwelt anreichern. Bei der Anwendung in verschiedenen Bereichen, ist es von enormer Bedeutung, dass sie nur dort wirksam sind, wo sie technologisch erforderlich sind. Der schnelle Abbau von Cyanobacterin ist aber auch ein Nachteil. Denn z.B. als Antifoulant soll die Wirkung möglichst über einen langen Zeitraum erhalten bleiben. Cyanobacterin könnte als biogener Wirkstoff synthetische Herbizide wie z.B. DCMU ersetzen. Jedoch als Antifoulant ist Cyanobacterin nur bedingt geeignet. Cyanobacterin, als einziges Biozid in Schiffsfarben eingebunden, zeigte hinsichtlich der sich entwickelnden Biomasse auf dem Schiffskörper unterhalb der Wasserlinie keine Wirkung. In Kombination mit Kupferverbindungen konnte jedoch eine deutliche Verringerung der Biomasse erzielt werden (ABARZUA et al., 2007). Co-Biozide werden oft in einer Konzentration von 1% (m/m) den kupferhaltigen Antifoulingfarben beigemischt (vgl. z.B. YEBRA et al., 2004; ABARZUA et al., 2007) Geht man von einer durchschnittlichen Unterwasserfläche eines Schiffes von 10.000 m² aus, so würden hierfür etwa 60 kg Cyanobacterin benötigt. Auf der Grundlage der von MASON et al. (1982) beschriebenen Biomasseausbeute von 400 mg TM l⁻¹ mit einer Cyanobacterinkonzentration von 2 mg CB g TM⁻¹ müssten hierfür 30 Tonnen *S. hofmanni*-Trockenmasse in 75.000 m³ Kulturmedium produziert werden. Durch die Steigerung auf 1300 mg TM l⁻¹ mit 14 mg CB g TM⁻¹ wäre es nun möglich, die benötigte Menge Cyanobacterin bereits mit 4,3 Tonnen Trockenmasse in 3.600 m³ Medium zu erzeugen.

4.3 Ökologie von *S. hofmanni*

Das Vorkommen der Gattung *Scytonema* wurde sowohl im aquatischen- als auch im terrestrischen Milieu beschrieben (vgl. 1.2). *Scytonema hofmanni* ist im inneren Teil der Everglades stark verbreitet. Das subtropische Klima der Everglades ist von einer fünfmonatigen Regen-

und einer siebenmonatigen Trockenzeit geprägt. Die durchschnittlichen Wassertemperaturen weisen nur geringe Schwankungen zwischen 24 °C während der Trockenzeit und 28 °C zur Regenzeit auf (OBEYSEKERA et al., 1999). Bei höheren Temperaturen wird allgemein die Cyanobakteriendominanz gegenüber anderen Algen beschrieben (WATERMAN et al., 1999, VAN DER GRINTEN et al., 2005). So auch während der Regenzeit in diesen mikrobiellen Gemeinschaften. In den oligotrophen Gebieten macht *Chroococcus turgidus* gemeinsam mit *Scytonema hofmanni* in den „Floating mats“ und im Epiphyton 24–56% der Gesamtbiomasse aus (McCORMICK et al., 1999). Wie die Ergebnisse der Laboruntersuchungen zeigen, ist *S. hofmanni* mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 25 °C ideal an diese Temperaturen angepasst. Die Everglades sind historisch gesehen ein oligotrophes Feuchtgebiet. Aber durch starke landwirtschaftliche Einträge erfolgte eine zunehmende Eutrophierung, insbesondere im vergangenen Jahrhundert. Die Eutrophierung ist vor allem durch den Anstieg der Phosphatkonzentration geprägt. Die inneren Everglades besitzen aber noch ihren oligotrophen Charakter. Hier wurden SRP-Konzentrationen von weniger als 0,1 bis 10 µM SRP gemessen (z.B. GLEASON & SPACKMAN 1974, McCORMICK et al., 1999). In den eutrophierten Bereichen kommt *Scytonema hofmanni* nicht mehr vor. Sie wurde durch *Oscillatoria*- und *Lyngbya*-Arten ersetzt. Nach MÄRZ & ZANKL (1993) reagiert die Wildform von *S. hofmanni*, die dem natürlichen Habitat entnommen wurde, sehr empfindlich auf erhöhte Phosphatkonzentrationen. Auch bei längerer Kultivierung erfolgte hier keine Anpassung an den hohen Nährstoffgehalt. Wahrscheinlich entwickelte sich aber in den 40 Jahren, die *S. hofmanni* (UTEX 1581) unter Laborbedingungen kultiviert wurde, doch eine Anpassung an höhere Phosphatkonzentrationen, denn im phosphatlimitierten Medium war die Abundanz signifikant geringer, als im Standard-BG11-Medium mit einer SRP-Konzentration von 65 µM. Die Anpassung erfolgte hier vermutlich durch Mutationen über mehrere Generationen. In den Everglades verdrängen jedoch euröke Arten, die flexibler auf veränderte Umweltbedingungen reagieren können, *S. hofmanni*. Allerdings enthielt die Biomasse aus dem limitierten Medium die doppelte Cyanobacterinkonzentration. Das könnte eventuell noch eine „konservierte“ Anpassung an die oligotrophen Verhältnisse im natürlichen Ökosystem darstellen. Dafür spricht auch, dass sich der sprunghafte Anstieg der Cyanobacterinkonzentration in der Biomasse bei 25 °C nach 35 Tagen mit der Erschöpfung der Phosphatressourcen im Kulturmedium deckt. Auch bei anderen Cyanobakterienarten erfolgt die Stimulation der Toxinproduktion durch Phosphatlimitation. So steigerte sich z.B. die Konzentration eines photosynthesehemmenden Sekundärmetaboliten in *Trichormus doliolum* bei geringen Phosphatkonzentrationen um das Dreißigfache (VON ELERT & JÜTTNER, 1997). Hinsichtlich der Temperatur und der Phosphatkonzentration

gehört *S. hofmanni* somit zu den stenöken Arten der betrachteten Cyanobakteriengemeinschaft. Der innere, oligotrophe Bereich der Everglades ist darüber hinaus stickstofflimitiert. Von MÄRZ & ZANKL (1993) werden Nitratkonzentrationen von weniger als 0,25 mM vermerkt. Bei einer derart geringen Nitratkonzentration im Kulturmedium kommt es, den o.g. Autoren zufolge, zur Bildung von Heterocysten und zur Fixierung von atmosphärischem Stickstoff in den Filamenten von *S. hofmanni*. Diese Art ist nicht auf die (Nitrat-) Stickstoffversorgung aus dem Medium angewiesen, denn die Abundanz im Medium ohne Nitrat unterschied sich nicht von der Abundanz im Standardmedium. Die Cyanobacterinkonzentration betrug im nitratlimitierten Medium weniger als ein Drittel der Konzentration in der Biomasse des Standard-BG11-Mediums. Da die N₂-Assimilierung ein sehr energieintensiver Prozess ist, steht die hierfür notwendige Energie eventuell nicht mehr der Synthese von Cyanobacterin zur Verfügung. Darüber hinaus können von Bakterien und Cyanobakterien einige Aminosäuren, darunter Arginin, als Stickstoffquelle genutzt werden, z.B. über den Arginin-Decarboxylaseweg. Durch ihn wird Putreszin bereitgestellt, das als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle verwendet werden kann. Arginin-Decarboxylase-Aktivität wurde u.a. bei *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* und Mykobakterien beschrieben. Die Enzyme werden hauptsächlich unter aeroben Bedingungen exprimiert (CUNIN et al., 1986). Von den 5 µM Arginin, die dem Medium zugesetzt wurden, konnten nach zwei Wochen nur noch 0,1 µM nachgewiesen werden, während die Konzentrationen von Glycin mit 2,1 µM, Ornithin mit 1,1 µM und Serin / Histidin mit 1,8 µM relativ hoch waren.

Generell sind Cyanobakterien an geringe Photonenflussdichten angepasst (z.B. WALSBY 1968, HÄDER 1987). Jedoch sind sie oft extremen Strahlungsbedingungen ausgesetzt, die zu reversiblen oder irreversiblen Schäden der Organismen führen können (z.B. HIROSAWA & MIYACHI, 1983; BISCHOF et al., 2002) Das gilt auch für die Art *S. hofmanni*. Bei 50 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ wurde am wenigsten Biomasse produziert. Gegenüber 25 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ betrug die Biomasseausbeute nur die Hälfte. Dennoch ist *S. hofmanni* in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation im Epiphyton oder in den „Floating mats“ extrem höheren Photonenflussdichten ausgesetzt. Um bei diesen Bedingungen zu überleben, sind diverse Schutzmechanismen erforderlich. Intrazellulär kann es durch erhöhte Strahlungsintensitäten zu einer Veränderung des Pigmentgehaltes z.B. durch die Verringerung des Chlorophyll *a*-Gehaltes relativ zum Gehalt schützender Carotenoide kommen (WAYMAN & FAY, 1987). Dementsprechend sank das Chl *a*/Car-Verhältnis bei *S. hofmanni* von 4 bei 25 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ auf 0,5 bei 125 µmol Photonen m⁻²s⁻¹. Eine Möglichkeit des extrazellulären Schutzes von *S. hofmanni* wird von MÄRZ & ZANKL (1993) beschrieben: *S. hofmanni*-Filamente haben zwei

von einander getrennte Bündelscheiden. In die äußere können durch Fällung Kalziumkarbonatkristalle eingelagert werden, die die auftreffende Strahlung abschirmen. So beschreibt SCHERER (1991) eine Korrelation der Anzahl der Kalkgranula in einer Bündelscheide von Cyanobakterien mit der Photonenflussdichte. Wurde *S. hofmanni* bei $125 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ kultiviert, fiel im Vergleich zu den geringeren PFD eine gelblich-bräunliche Färbung der Biomasse auf. Bei einer Kontrolle der Filamente unter dem Mikroskop konnten jedoch keine Granula in der Bündelscheide beobachtet werden. Dafür wies sie eine dunklere Pigmentierung auf. Bei Photonenflussdichten von mehr als $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ wird z.B. nach GARCIA-PICHEL et al. (1991) ein gelb-braunes Pigment, Scytonemin, in der Bündelscheide von Cyanobakterien eingelagert. BÜDEL et al. (1998) beschreibt dieses Pigment ebenfalls in der Bündelscheide symbiotischer Cyanobakterien in Flechten. Nach MÄRZ & ZANKL (1993) erfolgt nur die Pigmentierung der inneren Bündelscheide. Offensichtlich ist Scytonemin das häufigste Lichtschutzpigment in Cyanobakterienmatten. Hier wurde eine deutliche Zonierung des Pigmentes von der Oberfläche ins Matteninnere beschrieben, so dass die Cyanobakterien der oberen Schichten durch die Synthese von Scytonemin die darunter liegenden Organismen vor zu hoher Strahlenbelastung schützten (KARSTEN et al. 1998). Mit der Bildung von Scytonemin und der damit verbundenen Möglichkeit des Wachstums von *S. hofmanni* bei höheren PFD lässt sich auch die Tendenz zu einer gesteigerten Biomasseproduktion bei $125 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ erklären.

4.4 Allelopathische Interaktionen von *S. hofmanni*

Die Zusammensetzung der „Floating mats“ der Everglades ist im Jahresverlauf von einer Sukzession der Arten geprägt. Während in der Trockenzeit die Diatomeen überwiegen, dominieren zur Regenzeit Cyanobakterien - darunter *S. hofmanni* - diese Gemeinschaft (vgl. 4.2). Diatomeen können sich aber wie Cyanobakterien sehr gut an veränderte Umweltbedingungen anpassen (VAN DER GRINTEN et al., 2005). Als Ursache für Sukzessionen kommen neben Ressourcenkompetenzen auch andere Mechanismen in Frage (SHAPIRO 1990). Mittlerweile ist bekannt, dass u.a. komplexe chemische Systeme die Organisation der Organismen einer mikrobiellen Gemeinschaft regulieren (SWIFT et al., 1994). Bereits 1937 prägte MOLISCH den Begriff der Allelopathie: „Pflanzen beeinflussen das Wachstum anderer Pflanzen, indem sie bestimmte Moleküle an die Umwelt abgeben.“ RICE (1984) erweiterte die Definition und so wird heute unter Allelopathie jede positive oder negative Wirkung verstanden, die ein Organismus durch chemische Botenstoffe auf einen anderen ausübt. Nach GROSS et al. (2003) beeinflusst Allelopathie den Konkurrenzkampf zwischen verschiedenen photoautotrophen Or-

ganismen und kann somit zur Sukzession einer Gemeinschaft beitragen. Eine Vielzahl der von photoautotrophen Organismen synthetisierten Substanzen sind Inhibitoren des Elektronentransportes am Photosystem II. So zeigen viele bekannte Cyanotoxine wie z.B. Fischerellin, Anatoxin, Microcystin und Cyanobacterin mehr oder weniger auch starke herbizide Wirkungen (GROSS et al., 1991, GUPTA et al., 2002, SUKENIK et al., 2002). Durch ein Toxin, das die Photosynthese beeinträchtigt, kann die langsam wachsende Art *Trichormus doliolum*, die sich schnell entwickelnde Art *Anabena variabilis* in ihrem Wachstum hemmen. In einer Mischkultur kommt es somit zu einem Wechsel der Dominanz beider Arten (VON ELERT & JÜTTNER 1997). *S. hofmanni* weist ebenfalls ein geringes Wachstum auf. Die exponentiellen Wachstumsraten für die vorliegende Arbeit in Kleinfeld-Küvetten am Fluorimeter bestimmt, lagen bei optimalen Bedingungen zwischen 0,15 und 0,17 d⁻¹. Bei einem anderen mattenbildenden Cyanobakterium, *Microcoleus chthonoplastes*, wurden mit derselben Methode, bei optimalen Bedingungen für diesen Organismus, Wachstumsraten von 0,37 d⁻¹ bestimmt (WITTE, 2005). Somit wurden die Beobachtungen von MASON et al. (1982) bestätigt und darüber hinaus quantifiziert. Das von *S. hofmanni* synthetisierte Cyanobacterin ist ein starkes Herbizid, das die Photosynthese von Cyanobakterien, Algen und höheren Pflanzen inhibiert. Es wirkt bereits in geringen Dosen akut und subchronisch toxisch (vgl. 4.5). Wie die Ergebnisse der ungepufferten Kultivierung zeigten, wird Cyanobacterin offenbar in geringen Konzentrationen von etwa 0,5 mg CB TM⁻¹ permanent von *S. hofmanni* synthetisiert. Darauf lassen auch die kleinen Hemmhöfe im Biotest gegen *C. vulgaris* nach sieben Tagen schließen. Cyanobacterin wirkt entweder über den direkten Zellkontakt von anderen Arten mit *S. hofmanni* oder es wird ins Medium abgegeben (MASON et al., 1982). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit betrug die Cyanobacterinkonzentration durchschnittlich 0,1 µM im Kulturmedium. Bei *N. pusilla* reichten aber bereits 0,02 µM Cyanobacterin aus, um die Photosynthese und damit das Wachstum über mehrere Tage signifikant zu hemmen. Daraus lässt sich ableiten, dass neben anderen Mechanismen *S. hofmanni* offenbar mit der Synthese der Allelochemikalie Cyanobacterin die Sukzession im Epiphyton und in den Floating Mats in entscheidendem Maße mitbestimmen kann.

Cyanobacterin wirkt mit einer ED₅₀ von 0,12 µM stark akut toxisch auf die Photosynthese der Kieselalge *N. pusilla*. Im Vergleich dazu war die Wirkung auf das Cyanobakterium *M. firma* mit einer ED₅₀ von 1,24 µM um das Zehnfache geringer. *S. hofmanni* jedoch wies die geringste Sensitivität der untersuchten Arten gegenüber Cyanobacterin auf. Wie die Untersuchungen zeigten, ist *S. hofmanni* selbst gegen starke Herbizide wie das eigene Toxin oder gar DCMU resistent. Da Cyanobakteriengemeinschaften das Bild der Erde seit 3,5 Milliarden Jahren prä-

gen, erfolgte die Evolution ihrer Toxine vermutlich über die lange Zeit hinweg in Konkurrenz um Ressourcen zueinander. Das bedeutete aber auch eine Co-Evolution ihrer komplexen chemischen Angriffs- und Verteidigungssysteme (CAVALLO, 1993). So wäre z.B. die Modifikation der Bindestelle für Cyanobacterin am Photosystem II eine Möglichkeit, um die toxische Wirkung von Cyanobacterin zu neutralisieren. Dieser Mechanismus wurde bei dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. von GLEASON & PAULSON (1984) beschrieben.

Weil *S. hofmanni* im natürlichen Habitat nicht als Monokultur vorkommt, ist es nahe liegend, dass anderen Arten auch mit diesem Organismus interagieren. Im Biotest wurde nach einer Woche keine Reaktion von *S. hofmanni* auf *M. firma* beobachtet. Jedoch waren nach drei Wochen 3 cm große Hemmhöfe auf der *M. firma*-Kultur um die Zellkolonien von *S. hofmanni* entstanden. Im Gegensatz dazu veränderten sich die kleinen Plaques von 0,5 cm bei *C. vulgaris* in dieser Zeit nicht. Neben der Akkumulation von Cyanobacterin in der Biomasse von *S. hofmanni* wird das Toxin auch ins Medium abgegeben. Somit sind die entstandenen Plaques auf die herbizide Wirkung von Cyanobacterin zurückzuführen. Das bedeutet aber wiederum, dass durch *M. firma* die Synthese von Cyanobacterin initiiert sein musste. Um eine Nährstoffkonkurrenz auszuschließen, wurde ein zellfreier Extrakt aus den Kulturmedien von *C. vulgaris* und *M. firma* gewonnen und zu einer Kultur von *S. hofmanni* gegeben. Das Ergebnis bestätigte das Resultat des Biotestes. Die Biomasse von *S. hofmanni* aus der Kultur die mit dem Mediumextrakt von *M. firma* stimuliert wurde, wies mit 5,5 mg CB g TM¹ eine mehr als doppelt so hohe Cyanobacterinkonzentration auf, als die mit dem Zusatz des Mediumextraktes von *C. vulgaris* und der Kontrolle. Im Medium von *M. firma* wurde eine Konzentration freier gelöster Aminosäuren von 20 µM bestimmt. Die höchsten Konzentrationen wurden bei Glycin, Phenylalanin, Serin und Isoleucin ermittelt. Im Vergleich dazu betrug die Aminosäurekonzentration im Medium von *C. vulgaris* nur etwa ein Zehntel. Die Gattung *Microcystis* synthetisiert hochtoxische Microcystine (CARMICHAEL, 1992). Im Wasser von Seen wurden Konzentrationen dieser Toxine von 0,1 bis 0,5 µM nach dem Massenaufreten von *Microcystis* bestimmt (HILLER & LUCKAS, 2005). Bereits eine Konzentration von 24 nM Microcystin-RR im Kulturmedium bewirkte bei *S. hofmanni* gegenüber der Kontrolle eine Verdopplung der Cyanobacterinkonzentration. Der Zusatz von 5 µM Arginin als alternative organische Stickstoffquelle zum Kulturmedium hatte ebenfalls eine Verdopplung der Cyanobacterinkonzentration zu Folge.

Ob Aminosäuren wie Arginin oder komplexere Moleküle wie Cyanotoxine die Synthese von Cyanobacterin in *S. hofmanni* wird wahrscheinlich durch die Ausscheidung diverser Substanzen direkt stimuliert. Auch die Veränderung der Verfügbarkeit von Spurenelementen z.B.

durch Komplexbildung in Metallothionen, wie bei ROBINSON (1988) beschrieben, wird nicht ausgeschlossen. Kupfer fördert das Wachstum von *S. hofmanni*. Dagegen wirkt Molybdän eher hemmend auf die Synthese von Cyanobacterin (vgl. 4.1.1). Die Produktion von Cyanobacterin ermöglicht es *S. hofmanni* wahrscheinlich, sich gegen schneller wachsende Cyanobakterien (und Algen) zu behaupten. Damit ist Cyanobacterin eine Allelochemikalie, deren Synthese wiederum durch Allelopathie beeinflusst wird (Abb. 48)

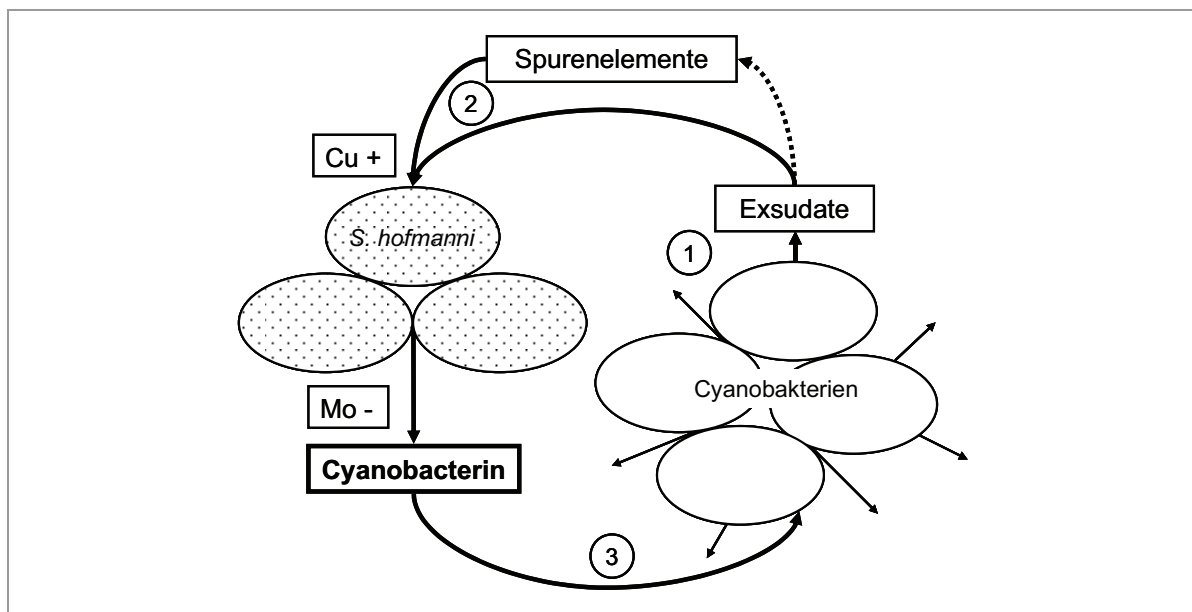


Abb. 48: Postulierte allelopathische Interaktion von *S. hofmanni* in einer Cyanobakteriengemeinschaft, 1: Abgabe von Substanzen cyanobakterieller Herkunft an die Umgebung. 2: Direkte Stimulation von *S. hofmanni* oder Einfluss auf die Verfügbarkeit von Spurenelementen. 3: Hemmung des Wachstums anderer Arten durch Cyanobacterin. gestrichelt: in dieser Arbeit nicht untersucht

4.5 Hinweise auf Biosynthese von Cyanobacterin

Im Allgemeinen erfolgt in Kultur die Synthese von komplexen Sekundärmetaboliten in der stationären Phase (z.B. VOLK 2007). Gleiches gilt für die Synthese von Cyanobacterin in *S. hofmanni*, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen und wie bereits bei MASON et al. (1982) beschrieben. Mit der Herstellung der Zellsuspension von *S. hofmanni* zu Beginn der Untersuchungen wurden Aminosäuren im Medium freigesetzt. Die Konzentration der freien gelösten Aminosäuren nahm bis zum 35. Tag, mit dem sprunghaften Anstieg der Cyanobacterinkonzentration in der Biomasse, kontinuierlich ab. Die Konzentration von Alanin, Asparaginsäure, Glycin, Asparagin, Ornithin, Arginin, Serin und Histidin, Threonin und Valin verringerte sich in dieser Zeit signifikant um mehr als 50%. Über den gesamten Zeitraum hinweg wurden im Medium die höchsten Konzentrationen bei Glycin, Ornithin, Serin und Histidin, Alanin

und Asparaginsäure ermittelt. Nach 21 Tagen wurde das erste Cyanobacterin in der Biomasse von *S. hofmanni* bestimmt.

Durch ^3H -Markierung wurde von GLEASON et al. (1983) nachgewiesen, dass Derivate von Aminosäuren am Aufbau von Cyanobacterin beteiligt sind. So finden sich Reste von Methionin und Serin in den in Methyl-, Methylendioxy- und Methoxysubstituenten und von Valin im Isopropylrest. Die aromatischen Ringe werden durch Derivate der Shikimisäure gebildet (Abb. 49). Im Cyanobacterinmolekül konnten keine Derivate von Thyrosin, Phenylalanin und Leucin nachgewiesen werden. Chlor wird wahrscheinlich zum Ende des Reaktionsweges eingebunden. In der stationären Phase erfolgte ein schneller Einbau von ^{36}Cl .

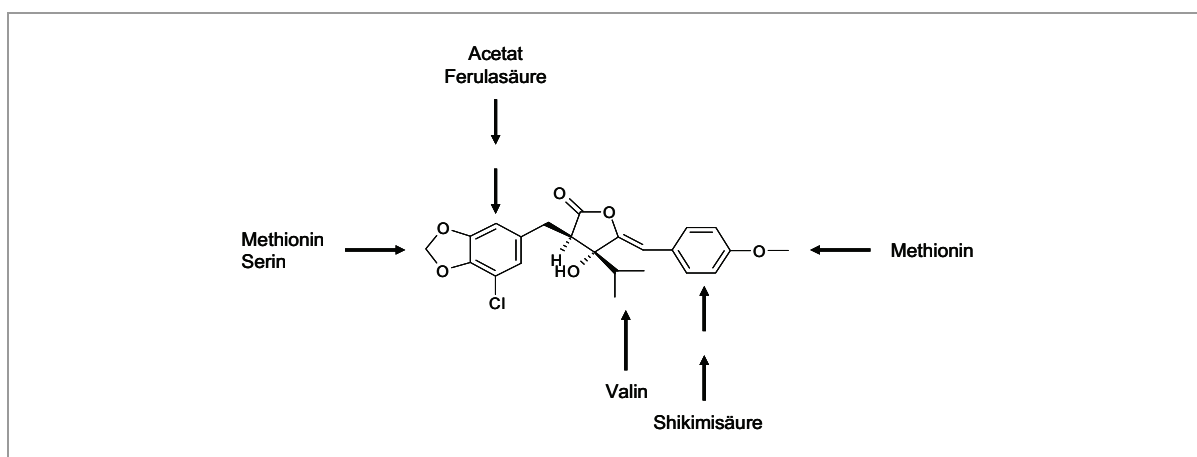


Abb. 49: Postulierte Beteiligung von Aminosäurederivaten im Cyanobacterinmolekül (nach KLAPES et al., 1987)

Cyanobakterien reichern in der stationären Phase, aber auch unter Stress, Cytophycin als Stickstoff- und Energiespeicher an (ALLEN, 1984; MACKERRAS et al., 1990). Cytophycin ist ein verzweigtes Polypeptid, welches aus L-Arginin und L-Asparaginsäure im molaren Verhältnis von 1:1 besteht (SUARES et al., 1999). In der exponentiellen Phase dient vermutlich das im Medium vorhandene Nitrat als N-Quelle, während beim Übergang zur stationären Phase auch in zunehmendem Maße die freien gelösten Aminosäuren verwertet werden. Sie können durch Transaminierung und den Ornithincyclus zu Arginin und letzten Endes in Cyanophycin umgewandelt werden. Endprodukte der Transaminierung sind häufig Glycin und Ammonium. Die Cyanobacterinkonzentration in der Biomasse korreliert mit der Abundanz von *S. hofmanni*. Selbst bei photosynthetisch aktiven Cyanobakterien kann es in der stationären Phase bei sehr dichten Kulturen auch zur Anaerobiose kommen (STAL & MOEZELAAR, 1997). Aminosäuren werden von Bakterien und Cyanobakterien unter anaeroben Bedingungen häufig zur Energiegewinnung genutzt (STANIER & COHAN, (1977)). So wird z.B. vom Bakterium *P. ae-*

ruginosa aus Arginin durch den Arginindesiminaseweg ATP gewonnen. Dabei entstehen aus einem Molekül Arginin ein Molekül Ornithin, zwei Moleküle Ammoniak, ein Molekül CO₂ und ein Molekül ATP. Die dafür notwendigen Enzyme sind Arginin-Deiminase, Ornithin-Transcarbamoylase und Carbamat-Kinase (VAN DER WAUVEN et al., 1984). In den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit erreichte die Ammoniumkonzentration nach 21 Tagen ein Minimum, während sie danach bis zum 42. Tag sogar über die Ausgangskonzentration anstieg. Unter strikt anaeroben Bedingungen erfolgt der Abbau von Cyanophycin zu Arginin und Aspartat (FLORES & HERERO 1994). Betrachtet man die Aggregate von *S. hofmanni* älterer Kulturen, so fällt auf, dass ihnen im Inneren Chlorophyll fehlt. Auf Grund der Dichte der Aggregate könnten die inneren Bereiche durchaus anaerob sein. Durch den Zusatz von Microcystin-RR zum Kulturmedium von *S. hofmanni* verdoppelte sich die Cyanobacterinkonzentration. Microcystine sind Inhibitoren von Phosphatasen (z.B. MCKINTOSH et al., 1990). Microcystin-LR verursachte durch die Hemmung der ATP-Synthase die Apoptose von Mitochondrien (MIKHAILOV et al., 2003). Cyanotoxine werden von vielen heterocystenbildenden stickstofffixierenden Cyanobakterien synthetisiert. Im nitratlimitierten Medium war die Cyanobacterinkonzentration minimal, obwohl viel Biomasse produziert wurde. Enthielt das Standardmedium Molybdän, so war die Cyanobacterinsynthese offensichtlich gehemmt. Molybdän ist wichtiger Co-Faktor von Enzymen wie Nitrogenase und Nitratreduktase, die beim Stickstoffmetabolismus von entscheidender Bedeutung sind (FLORES & HERERO, 1994). Co-Faktoren verändern die Substrataffinität oder aktivieren bzw. inaktivieren Enzyme. Denkbar wäre, wenn organischer Stickstoff z.B. in Form von Cyanophycin in größerem Umfang in der Zelle gespeichert ist, dass der Stickstoff unter anaeroben Bedingungen aus Arginin (und andern Aminosäuren) recycelt bzw. abgegeben wird. Das Cyanobacterinmolekül enthält keinen Stickstoff. Daher ist zu vermuten, dass sich die verbleibenden C-Körper des N-Recyclings anreichern bzw. ausgeschieden werden. Könnten z.B. durch Mangel an Nitrat-Stickstoff nur wenige Aminosäuren in Form von Cyanophycin gespeichert werden, so ist folglich der anaerobe Abbau der gespeicherten Aminosäuren ebenfalls limitiert. Das wäre neben dem hohen Energieaufwand der N₂-Assimilation eine weitere Erklärung dafür, dass bei Nitratlimitation nur sehr wenig Cyanobacterin synthetisiert wurde.

Somit sind möglicherweise die Enzyme des Stickstoffmetabolismus an der Regulation der Cyanobacterinsynthese mitbeteiligt.

5. Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der biotechnologischen Produktion des Cyanotoxins Cyanobacterin durch das Cyanobakterium *Scytonema hofmanni* (UTEX 1581) wurde der Einfluss der abiotischen Parameter Photonenflussdichte, pH-Wert, Temperatur, Zeit, der Nährstoffe Nitrat und Phosphat sowie von Spurenelementen untersucht. Darüber hinaus wurden aus diesen Ergebnissen Schlüsse hinsichtlich der Ökologie von *Scytonema hofmanni* als wesentlicher Bestandteil von Cyanobakteriengemeinschaften der Everglades gezogen.

Unter den folgenden erarbeiteten Kultivierungsbedingungen für *S. hofmanni* wurde die von MASON et al. (1982) erhaltene Cyanobacterinkonzentration von 2 auf 14 mg CB g TM⁻¹ erhöht. Im Vergleich zu den Arbeiten von ABARZUA et al. (1999; 2007) sind diese Konzentrationen reproduzierbar.

Um Cyanobacterin mit einer Konzentration von 14 mg CB g TM⁻¹ in *S. hofmanni* zu produzieren, erfolgte die Kultivierung im BG 11 Medium nach RIPPKA et al. (1979). Durch Pufferung des Mediums mittels Karbonatpuffer (1 g Na₂CO₃ l⁻¹; Belüftung mit 5% CO₂ (v/v), 5 ml min⁻¹) wurde der pH-Wert bei 8,5 konstant gehalten. *S. hofmanni* wurde bei 25 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ (H:D 12 h:12 h) und bei 25 °C kultiviert. Mit einem geringen Inokulum von 100 mg FM l⁻¹ erfolgt die Ernte nach 35 Tagen. Durch die Erhöhung des Inokulums auf 600 mg FM l⁻¹ kann die Kultivierungszeit auf drei bis vier Wochen gesenkt werden. Mit Hilfe des photometrischen Nachweises von Cyanobacterin im DMF-Extrakt wurden mit geringem Aufwand in nur etwa 24 h Aussagen über die Cyanobacterinkonzentration in der Biomasse von *S. hofmanni* gewonnen.

Cyanobacterin ist ein Toxin, das die Photosynthese durch Unterbrechung der Elektronentransportkette des Photosystems II bei Cyanobakterien, Algen und höheren Pflanzen inhibiert. Konzentrationsabhängig können sich cyanobacteringeschädigte Organismen regenerieren. In sehr hohen Konzentrationen beeinflusst Cyanobacterin ebenfalls tierische Organismen, wie z.B. die Anheftung und Methamorphose von Cyaprislarven von *Balanus improvisus*. Die Halbwertszeit von Cyanobacterin im Flusswasser beträgt bei 20 °C 3,5 Tage und bei 10 °C fünf Tage. Somit kann Cyanobacterin als biogenes Herbizid und als Co-Antifoulant verwendet werden.

Hinsichtlich der Temperatur und der Phosphatkonzentration gehört *S. hofmanni* zu den stenöken Arten der „Floating mats“ und des Epiphytons der Everglades. Als Schutz gegen erhöhte Strahlenbelastung wird Scytonemin in die äußere Bündelscheide eingelagert. Wahrscheinlich kann *S. hofmanni* mit der Synthese des Cyanotoxins Cyanobacterin die Sukzession der photoautotrophen mikrobiellen Gemeinschaft beeinflussen. Cyanobacterin ermöglicht es *S. hofmanni* sich gegen schneller wachsende Cyanobakterien und Algen zu behaupten. Exsudate anderer photoautotropher Mikroorganismen stimulieren die Synthese von Cyanobacterin.

Das Cyanotoxin Microcystin-RR und die Aminosäure Arginin sind Promotoren der Cyanobacterinproduktion. Cyanobacterin ist eine Allelochemikalie, deren Synthese wiederum durch Allelopathie beeinflusst wird. Die Synthese von Cyanobacterin steht vermutlich mit dem anaeroben Aminosäure-Katabolismus in Verbindung.

6. Ausblick

Mit diesen Untersuchungen ist es gelungen, die Ausbeute an Cyanobacterin reproduzierbar auf 14 mg CB g TM⁻¹ zu steigern. In einem Replikat bei 125 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ (H:D 12 h:12 h) wurde jedoch die höchste jemals beschriebene Konzentration von 45 mg CB g TM⁻¹ erreicht. Bei ABARZUA et al., 2002 wurden in einer Charge von *S. hofmanni* 29 mg CB g TM⁻¹ produziert. Hier erfolgte die Kultivierung bei Dauerlicht. Mit einer schrittweisen Akklimatisation von *S. hofmanni* an hohe Photonenflussdichten sind offensichtlich noch weit höhere Cyanobacterinkonzentrationen möglich. Da Molybdän sich als Hauptinhibitor der Cyanobacterinsynthese herausstellte, lässt sich die Cyanobacterinausbeute eventuell durch eine veränderte Zusammensetzung der Spurenelemente z.B. nach MERZ et al. (1993) steigern.

In den „Floating mats“ und im Epiphyton der Everglades bildet *S. hofmanni* Gemeinschaften mit Diatomeen und anderen Cyanobakterien. Über die Interaktionen dieser einzelnen Organismen in diesem Mikrohabitat gibt es kaum Untersuchungen. Diese können weitere Erkenntnisse auch hinsichtlich der chemischen Ökologie in diesen Gemeinschaften bringen. Das Vorkommen von *S. hofmanni* wurde auch in terrestrischen Habitaten beschrieben. Da die terrestrische Ökologie dieser Art bisher kaum erforscht ist, vervollständigen Untersuchungen dahingehend das Wissen über *S. hofmanni*.

Zur Gewinnung von Cyanobacterin wurde die gesamte Biomasse verwendet. Über die Lokalisation von Cyanobacterin den Zellen und über Transportvorgänge gibt es bisher keine Erkenntnisse. So stellt sich die Frage, ob sich Cyanobacterin tatsächlich in den inneren, chlorophyllfreien Bereichen älterer Aggregate akkumuliert oder gar dort synthetisiert wird. Da für die Cyanobacterinbestimmung im DMF-Extrakt nur geringe Biomassen notwendig sind, könnten getrennte Untersuchungen der grünen und weißen Bereiche erste Hinweise hierauf geben.

Die vollständige Aufklärung des Stoffwechsels, letzten Endes auch auf molekularbiologischer Ebene, kann interessante Erkenntnisse hinsichtlich der Evolution der Toxinproduktion und der Interaktion von *S. hofmanni* bringen. Es gibt nur wenige Cyanobakterien, die gegen Herbizide wie das Cyanobacterin resistent sind. Ob *S. hofmanni* die Resistenz über einen Ausschluss des Toxins, über strukturelle Veränderungen am Photosystem II oder über andere Mechanismen erreicht ist nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können zu einem selektiven Einsatz von Herbiziden beitragen.

7. Literatur

- ABARZUA, S. AND JAKUBOWSKI, S. Verwendung biogener Wirkstoffe aus dem Cyanobacterium *Scytonema hofmanni* und de Gemeinen Seestern *Asterias rubens* als natürliche Antifouling-wirkstoffe. German Patent No. IP Hkl A01N63/02, DE 196 46 324 A1. 1996.
- ABARZUA, S., JAKUBOWSKI, S., ECKERT, S., AND FUCHS, P. Biotechnological investigation for the prevention of biofouling II. Blue-green algae as potential producers of biogenoc agents for the growth inhibition of microfouling organisms. *Botanica Marina* 42, 459-465. 1999.
- ABARZUA, S., KACAN S., GÖRS, S., PENTSCHEW, P., SCHACHT, B., SCHUMANN, R. & PIECHULLA B. Bewuchsverhinderung an meeresstechnischen Objekten durch biogene Antifoulinganstriche. Deutsche Bundesstiftung Umwelt Projekt Laufzeit: 01.10.1999 - 30.09.2001, Abschlussbericht, 29 pp. 2002.
- ABARZUA, S., KACAN S., GÖRS, S., PENTSCHEW, P., SCHACHT, B., SCHUMANN, R., AND PIECHULLA, B. The utilization of biogenic antifouling coatings for marine technical objects. Laboratory antifouling assays and field experiments with stationary and mobile test surfaces. *Biofouling*, submitted. 2007.
- ALLEN, M. M. Cyanobacterial cellinclusions. *Annu Rev Microbiol* 38, 1-25. 1984.
- ANTONOPOULPU, S., NOMIKOS, T., OIKONOMOU, A., KYRIACOU, A., ANDROITIS, M., FRAGOPOULOU, E., AND PANTAZIDOU, A. Characterization of bioactive glycolipids from *Scytonema julianum* (cyanobacteria). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 140 (2), 219-231. 2005.
- ARMSTRONG, E., YAN, L., BOYD, K. G., WRIGHT, P. C., AND BURGESS, J. G. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* 461 (1-3), 37-40. 2001.
- BARTRAM, J. AND CHORUS, I. Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E.& F.N.Spon . 1999. London & New York.
- BEATTIE, K. A., KAYA, K., AND CODD, G. A. The cyanobacterium *Nodularia* PCC 7804, of freshwater origin, produces [L-Har2]nodularin. *Phytochem* 54 (1), 57-61. 2000.
- BISCHOF, K., KRÄBS, G., WIENCKE, C., AND HANELT, D. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase of the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L.. *Planta* 215, 502-509. 2002.

- BOKESCH, H. R., O'KEEFE, B. R., MCKEE, T. C., PANNELL, L. K., PATTERSON, G. M. L, GARDELLA, R. S., AND SOWDER, R. C. A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. *Biochemistry* 42 (9), 2578-2584. 2003.
- BOLD, H. C. AND WYNNE, M. J. *Introduction to the Algae*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 1985.
- BÖRNER, T. Neue bioaktive Verbindungen: die Toxine der Cyanobakterien. *Biologie unserer Zeit* 31 (2), 108-115. 2001.
- BÜDEL, B., KARSTEN, U., AND GARCIA-PICHEL, F. Ultraviolet-absorbing scytonemin and mycosporine-like amino acid derivatives in exposed, rock-inhabiting cyanobacterial lichens. *Oecologia* 112, 165-172. 1997.
- CARLSON, J. L., LEAF, T. A, AND GLEASON, F. K. Synthesis and Activity of Analogs of the Natural Herbicide Cyanobacterin. in: Baker, D. R., Fenyés, J. G., Moberg, W. K., and Cross, B. (eds.) *Synthesis and chemistry of agrochemicals*. Am Chem Soc. 355, 141-150. 1987.
- CARMELI, S., MOORE, R. E, AND PATTERSON, G. M. L. Tolytoxin and new Scytopycins from three species of *Scytonema*. *J Nat Prod* 53 (6), 1533-1542. 1990.
- CARMICHAEL, W. W, BIGGS, D. F., AND PATTERSON, M. A. Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicon* 17 (3), 229-236. 1979.
- CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J Appl Bact* 72, 445-459. 1992.
- CARMICHAEL, W. W. The cyanotoxins - bioactive metabolites of cyanobacteria: Occurrence, ecological role, taxonomic concerns and effects on humans. *J Phycol* 37 (s3), 9-10. 2001.
- CAVALLO, G. The role of antibiotics in the evolution of microorganisms. *Giornale di Bacteriologia, Virologia ed Immunologia* 85, 3-11. 1993.
- CHETSUMON, A., FUJIEDA, K., HIRATA, K, YAGI, K, AND MIURA, Y. Optimization of antibiotic production by the cyanobacterium *Scytonema* sp. TISTR 8208 immobilized on polyurethane foam. *J. Appl. Phycol.* 5 (6), 615-622. 2005.
- COSTERON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R., AND LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 711-745. 1995.
- CUNIN, R., GLANSDORFF, N., PIERARD, A., AND STALON, V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* 50, 314-352. 1986.

- DRAISCI, R., FERRETTI, E., PALLESCHI, L., AND MARCHIAFAVA, C. Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Additives & Contaminants* 18 (6), 525-531. 2001.
- FLORES, E. AND HERERO, A. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. in: Bryant, D. A. *The molecular biology of cyanobacteria*, 487-517. 1994. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic publishers.
- FRANKMOELE, W. P., LARSON, L. K., CAPLAN, F. R., PATTERSON, G. M. L, KNUBEL, G., LEVINE, I. A., AND MOORE, R. E. Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. I. Isolation and biological properties. *J Antibiotics* 45 (9), 1451-1457. 2007.
- GARCIA-PICHEL, F. AND CASTENHOLZ, R. W. Characterisation and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J Phycol* 27 (3), 395-409. 1991.
- GARCIA-PICHEL, F., NUBEL, U., AND MUYZER, G. The phylogeny of unicellular extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 169, 469-482. 1998.
- GARCIA-PICHEL, F., LÓPEZ-CORTÉS, A., AND NÜBEL, U. Phylogenetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau. *App Environ Microbiol* 67 (4), 1902-1910. 2001.
- GENTILE, J. H. AND MALONEY, T. E. Toxicity and environmental requirements of strain of *Aphanizomenon flos-aquae* (L.). *Can J Microbiol* 15, 165-173. 1969.
- GLEASON, F. K, MICHURSKI, S., AND WOODT, J. M. Biosynthesis of the antibiotic cyanobacterin. *Fed Proc.* 42, 2640. 1983.
- GLEASON, F. K. Cyanobacterin herbicide. United States Patent Patent number: 4626271. 1986.
- GLEASON, F. K AND CASE, D. E. Activity of natural Algicide, Cyanobacterin, on Angiosperms. *Plant Physiol* 80, 834-837. 1986.
- GLEASON, F. K. Structure and activity of an herbicidal natural product isolated from the cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. in: Thomson, M. F., Saorojini, R., Nagabushanam, R., and (eds.). *Bioactive compounds from marine organisms: with emphasis on the Indian Ocean. Indo-United States Symposium, Goa, India XVII+410P.* 37-42. A. A. Balkema. Rotterdam, Netherlands, 1991.
- GLEASON, F.K. AND PAULSON, J.L. Site of action of the natural algicide, cyanobacterin, in the blue-green alga, *Synechococcus* sp. *Arch Microbiol* 138, 273-277. 1984.

- GLEASON, P. J. AND SPACKMAN, W. Calcerous periphyton and water chemistry in the Everglades. in: Gleason, P. J. ed. Environments of South Florida: Past and Present. Miami Geological Society 2, 225-248. 1974.
- GOLUBIC, S. Einführung in die Evolution von Ökosystemen am Beispiel der Cyanophyten. in: Krumbein, W. E. and (eds.). Cyanobakterien - Bakterien oder Algen? 85-90. 1977.
- GREVE, J. C. Cyanopeptoline und Scytocyclamide: Zyklische Peptide aus *Scytonema hofmanni* PCC 7110 Struktur und biologische Aktivität. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau . 2005.
- GROSS E.M., WOLK C.P., AND JÜTTNER, F. Fischerellin, a new allelochemical from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*. J Phycol 27 (6), 686-692. 1991.
- GROSS E.M. Allelopathy of Aquatic Autotrophs. Critical Reviews in Plant Sciences 22 (3-4), 313-339. 2003.
- GUILLARD, R. R. L. Cultures of phytoplankton for feeding of marine invertebrates. in: Smith, W. L., Chanley, M. H., and (eds.). Culture of marine invertebrates animales , 29-60. 1975. New York, Plenum.
- GUPTA, A. B. Algal flora and its importance in the economy of rice fields. Hydrobiologia 28 (2), 213-222. 1966.
- GUPTA, N., BHASKAR, A. S. B., AND LAKSHMANA RAO, P. V. Growth characteristics and toxin production in batch cultures of *Anabaena flos-aquae*: effects of culture media and duration. World J Microbiol Biotech 18 (1), 29-35. 2007.
- GUSTAVS, L., SCHUMANN, R., EGGERT, A., AND KARSTEN, U. In vivo growth fluorometry: A non-invasive, easy and rapid method to measure growth of adhering, colony forming and solitary microalgae and cyanobacteria. J Phycol submitted. 2007.
- HANSEN, H. P. AND KOROLEFF, F. Methods of Seawater Analysis. Wiley-VCH Press. Weinheim, 1999.
- HAWES, I. AND SMITH, R. Seasonal dynamics of epilithic periphyton in oligotrophic Lake Taupo, New Zealand. New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research 28 (1), 1-12. 1994.
- HÄDER, D. P. Photomovement. in: Fay, P., Van Baalen, C., (eds.). The Cyanobacteria. 325-345. 1987.
- HILLER, S. AND LUCKAS, B. Zur Belastung von Gewässern mit Toxinen cyanobakteriellen Ursprungs. Aktuelle Wochenschau der GDCh - FG Analyt Chem 49, 1-7. 2005.

- HIROSAWA, T. AND MIYACHI, S. Effects of long-wavelength ultraviolet (UV-A) radiation on the growth of *Anacystis nidulans*. *Plant Sci Lett* 28, 291-298. 1983.
- HUBBERTEN, U., LARA, R. J., AND KATTNER, G. Amino-acid-composition of seawater and dissolved humic substances in the Greenland Sea. *Mar Chem* 45 (1-2), 121-128. 1994.
- ISHIBASHI, M., MOORE, R. E., AND PATTERSON, G. M. L. Scytophycins, Cytotoxic and Antimycotic Agents from the Cyanophyte *Scytonema pseudohofmanni*. *J Org Chem* 51, 5300-5306. 1986.
- KACAN, S. Biogene Wirkstoffe aus dem Seestern *C. novaeguineae* und der Seegurke *H. leucospilota* zur Inhibition von Foulingprozessen. Diplomarbeit Universität Rostock, Burapha Universität Chonburi (Thailand), 53 pp. 1997.
- KAEBERNICK, M AND NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol Ecol* 35 (1), 1-9. 2001.
- KARSTEN, U., I. KLIMANT, AND HOLST G., 1996. A new in vivo fluorimetric technique to measure growth of adhering phototrophic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 62: 237-243.
- KARSTEN, U., MAIER, J., AND GARCIA-PICHEL, F. Seasonality in UV-absorbing compounds of cyanobacterial mat communities from an intertidal mangrove flat. *Aquat Microb Ecol* 16, 37-44. 1998.
- Klapes, N. A. Studies of the potential use of the algicide cyanobacterin for the control of toxic, bloom-forming cyanobacteria (blue-green algae). Thesis at Graduate School of the University of Minnesota. 1987.
- KLAPES, N. A. Acute toxicity of the natural algicide, Cyanobacterin, to *Daphnia magna*. *Ecotox Environ Safety* 20 (2), 167-174. 1990.
- KLUG, P. Vitalität und Entwicklungsphasen bei Bäumen. *ProBaum* 1, 1-4. 2005.
- KOMAREK, J. AND ANAGNOSTIDES, K. Modern Approach to the Classification System of Cyanophytes 4. *Nostocales*. *Algol Stud* 82 (3), 247-345. 1989.
- KROMKAMP J.C. AND FORSTER R.M. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *Europ J Phycol* 38, 103-112. 2003.
- LAWTON, L. A., EDWARDS, C., AND CODD, G. A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119 (7), 1525-1530. 1994.

- LIBBERT, E. Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Gustav Fischer Jena. 1993.
- MACKERRAS, A. H., DE CHAZAL, N. M. AND SMITH, G. D. Transient accumulations of Cyanophycin in *Anabena cylindrica* and *Synechocystis* sp. PCC6803. J Gen Microbiol 136, 2057-2065. 1990.
- MACKINTOSH, C., BEATTIE, K. A., KLUMPP, S., COHEN, P., AND CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Lett 264 (2), 187-192. 1990.
- MAHMOOD, N. A. AND CARMICHAEL, W. W. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. Toxicon 24 (2), 175-186. 1986.
- MARGULIS, L., BARGHOORN, E. S., ASHENDORF, D., BANERJEE, S., CHASE, D., FRANCIS, S., GIOVANNONI, S., AND STOLZ, J. The microbial community in the layered sediments of laguna Figueroa, Baja California, Mexico: does it have Precambrian analogues. Precambrian Research 11, 93-123. 2007.
- MASON, C. P., EDWARDS, K. R., CARLSON R. E., PIGNATELLO J., GLEASON F. K. AND WOOD J. M. Isolation of chlorine-containing antibiotic from the cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. Science 215(4531), 400-402. 1982.
- MCCORMICK, P. V., SHUFORD III., R. B. E., BACKUS, J. G, AND KENNEDY, W. C. Spatial and seasonal patterns of periphyton biomass and productivity in the northern Everglades, Florida, USA. Hydrobiologia 362, 185-208. 1997.
- MERZ, M. U. E. AND ZANKL, H. The influence of culture conditions on growth and sheath development of calcifying cyanobacteria. Facies 29, 75-80. 1993.
- MIKHAILOV, A., HÄRMÄLÄ-BRASKÉN, A.S., HELLMAN, J., MERILUOTO, J. AND ERIKSSON, J.E. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. Chem Biol Interact 142 (3), 223-237. 2003.
- MOLISCH, H. Der Einfluss einer Pflanze auf die Andere—Allelopathie. 1937. Gustav Fischer Verlag Jena.
- MOORE, R. E., OHATANI, I, MOORE, B. S., DE KONIG, C. B., YOSHIDA, W. Y, RUNNEGAR, M. T., AND CARMICHAEL, W. W. Cyanobacterial Toxins. Gazzetta Chimica Italiana , 329-326. 2007.
- MURPHY, J. AND RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal Chim Acta. 27, 31-36. 1962.

- NADEAU, T. L. AND CASTENHOLZ, R. W. Charakterization of psychrophilic Oscillatorians (Cyanobacteria) from Antarctic meltwater ponds. *J. Phycol.* 36 (5), 914-923. 2000.
- OBEYSEKERA, J., BROWDER, J., HORNUNG, L., AND HARWELL, M. A. The natural South Florida system I: Climate, geology, and hydrology. *Urban Ecosystems* 3, 223-244. 2000.
- PAPKE, R. T., RAMSING, N. B., BATESON, M. M., AND WARD, D. M. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ Microbiol* 5 (8), 650-659. 2003.
- PAPKE, U., GROSS, E. M., AND FRANCKE, W. Isolation, Identification and Determination of the Absolute Configuration of Fischerellin B. A New Algicide from the Freshwater Cyanobacterium *Fischerella muscicola* (Thuret). *Tetrahedron Lett* 38 (3), 379-382. 1997.
- PATTERSON G.M.L AND BOLIS C.M. Regulation of Scytonycin accumulation in cultures of *Scytonema ocellatum* I. Physical factors. *Appl Microbiol Biotechnol* 40, 375-381. 1993.
- PATTERSON G.M.L AND BOLIS C.M. Regulation of Scytonycin accumulation in cultures of *Scytonema ocellatum*. II. Nutrient requirements. *Appl Microbiol Biotechnol* 43, 692-700. 1995.
- PAUL, E. A. AND CLARK, F. E. *Soil Microbiology and Biochemistry*. pp. 340. Academic Press Inc. San Diego, 1996.
- PIGNATELLO, J., PORWOLL, J., CARLSON, R. E., XAVIER, A., GLEASON, F. K., AND WOOD, J. M. Structure of the Antibiotic Cyanobacterin, a Chlorine-Containing γ -Lactone from the Freshwater Cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. *J Org Chem.* 48, 4035-4038. American Chemical Society. 1983.
- PORRA, R.J., THOMPSON, W.A., AND KRIEDEMANN, P.E., Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975: 384-394. 1989.
- RAVEN, J. A., EVANS, M. C. W. AND KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosyntheses Research* 60, 111-149. 1999.
- RICE, E. L. *Allelopathy*. 2nd ed. Academic Press. Orlando, Florida, 1984.
- RIPPKA, R., DERUELLES J., WATERBURY J.B., HERDMAN M. AND STANIER R.Y., Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61. 1979.
- RITTSCHOF, D., BRANSCOMB, E. S. AND COSTLOW J. D. Settlement and behavior in relation to flow and surface in larval barnacles *B. amphitrite*. *J Exp Mar Biol Ecol.* 82, 131-146. 1987.

- ROBINSON, N. J. Algal metallothioneins: secondary metabolites and proteins. *J Appl Phycol* 1, 5-18. 1989.
- SAGI, T. Determination of ammonia in sea water by the indophenol method and its application to the coastal and off-shore waters. *Oceanogr Mag* 18 (1-2), 43-51. 1966.
- SCHERER, S. Mikroorganismen in extremen Lebensräumen - Cyanobakterien in Wüstengebieten. *Biologie unserer Zeit* 21 (4), 220-222. 1991.
- SCHLEGEL, H. G. *Allgemeine Mikrobiologie*. 6. überarb. Auflage. Thime Verlag Stuttgart, New York, 1995.
- SCHUBERT, H., GERBERSDORF, S., TITLYANOV, E., TITLYANOVA, T, GRANBOM, M, PAPE, C., AND LUNING, K. Circadian rhythm of photosynthesis in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): independence of the cell cycle and possible photosynthetic clock targets. *European J Phycol* 39 (4), 423-430. 2004.
- SERGEEVA, E., LIAIMER, A., AND BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215 (2), 229-238. 2002.
- SHAPIRO, J. Current beliefs regarding dominance by blue greens: the case for the importance of CO₂ and pH. *Verhandlungen Internationale Verein Limnologie* 24, 38-54. 1990.
- SHIRAI, M., OHATAKE, A., SANO, T., MATSUMOTO, T., SAKAMOTO, T., SATO, A., AIDA, T, HARADA, K., SHIMADA, T., AND SUSUKI, M. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. *Appl Environ Microbiol* 57 (4), 1241-1245. 1991.
- SMITH, G. D. AND DOAN, N. T. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. *J Appl Phycol* 11, 337-344. 1999.
- STAL, L. J. AND MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. *Microbiol Rev* 21(2), 179-211. 1997.
- STANIER, R. Y. AND COHAN, P. Phototrophic prokaryote: The cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* 31, 225-274. 1977.
- SUARESZ, C., KOHLER, S. I., ALLEN, M. M, AND KOLODNY, N. H. NMR-study of the metabolic ¹⁵N isotopic enrichment of Cyanophycin synthesized by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426, 429-438. 1999.

- SUKENIK, A., ESHKOL, R., LIVNE, A., HADAS, O., ROM, M., TCHERNOV, D., VARDI, A., AND KAPLAN, A. Inhibition of Growth and Photosynthesis of the Dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): A novel Allelopathic Mechanism. *Limnol Oceanogr* 47 (6), 1656-1663. 2002.
- SWIFT, S., BAINTON, N. J., AND WINSON, M. K. Gram-negative bacterial communication by N-acyl homoserine lactones: a universal language? *Trends Microbiol* 2, 193-198. 1994.
- TANDEAU DE MARSAC, N. AND HOUMARD, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microb Lett* 104 (1-2), 119-189. 1993.
- VAN DER GRINTEN, E., JANSSEN, A. P. H. M., DE MUTSERT, K., BARRANGUET, C., AND ADMIRAAL, W. Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngba foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia* 548, 267-278. 2005.
- VAN DER WAUVEN, C. C., PIERARD, M., KLEY-RAYMANN, M., AND HAAS, D. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* 160, 928-934. 1984.
- VOLK, R. B. Studies on culture age versus exometabolite production in batch cultures of the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-007-9161-z, pp. 5. 2007.
- VON ELERT, E. AND JÜTTNER, F. Phosphorus limitation and not light controls the extracellular release of allelopathic compounds by *Trichormus doliolum* (Cyanobacteria). *Limnol Oceanogr* 42 (8), 1796-1802. 1997.
- WALSBY, A. E. Mucilage secretion and the movement of blue-green algae. *Protoplasma* 65(1-2), 223-238. 1968.
- WATERMAN, F., HILLEBRAND, H., GERDES, G., KRUMBEIN, W. E., AND SOMMER, U. Competition between benthic cyanobacteria and diatoms as influenced by different grain sizes and temperatures. *Mar Ecol Prog Ser* 187, 77-87. 1999.
- WITTE, K. Untersuchungen zur Entwicklung von Ökotypen in dem Cyanobakterium *Microcoleus chthonoplastes* entlang des Salinitätsgradienten der Ostsee. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doktor rerum naturalium, Universität Rostock. 2005.
- WYMAN, M AND FAY, P. Acclimation to the natural light climate. in: Fay, P., Van Baalen, C., and (eds.). *The cyanobacteria*. 347-376. 1987.
- YEBRA, D. M., KIIL, S., AND DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Organic Coatings* 50, 75-104. 2004.

Anhang

I Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACB	Anhydrocyanobacterin
BW	Blindwert
c	Konzentration
CB	Cyanobacterin
Car	Carotenoide
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>b</i>
d	Tage
DMF	N,N - Dimethylformamid
E	Extinktion
EC ₅₀	50% der effektiven Konzentration
F _{Kalib}	Faktor der Kalibrierung
FL	Fluoreszenz
FM	Frischmasse
H:D 12:12	Hell / Dunkel Rhythmus von 12:12 Stunden
HWZ	Halbwertszeit
K	Kapazität (maximal erreichter/erreichbarer Wert), Fußnote gibt den Parameter an
<i>k</i>	Abbaurrate
Log-Phase	Logarithmische Phase
Max	Maximum
MC	Microcystin
Med	Median
mg CB g TM ⁻¹	Milligramm Cyanobacterin je Gramm Trockenmasse
mg FM l ⁻¹	Milligramm Frischmasse pro Liter Kultur
mg TM	Milligramm Trockenmasse
mg TM l ⁻¹	Milligramm Trockenmasse pro Liter Kultur, Abundanz-Äquivalente
Min	Minimum
μ	Wachstumsrate [d ⁻¹]
MW _{UP}	Mittelwert Unterproben

n	Anzahl
N_t	Parameter zum Zeitpunkt t
n.d.	keine Messwerte (not detected)
OPA	Pierce-o-Phthalaldehyd-Reagenz
PFD	Photonenflussdichte [$\mu\text{mol Photonen m}^2 \text{s}^{-1}$]
Phosphat	siehe SRP
PR	Probe
RE	Rohextrakt
Sc.	<i>Synechocystis</i> sp. 6803
SRP	freies gelöstes Phosphat (soluble reactive phosphate), ortho Phosphat, o Phosphat
t	Zeitpunkt t (Anzahl der Messtage)
Tab	Tabelle
TBE	tert-Butylmethylether
TR	Trübung

I.1 Variation des BG11 - Mediums

+N+P	Konzentrationen an Nitrat und Phosphat wie im Originalmedium
+N+10P	zehnfache Konzentration an Phosphat
+N-P	kein Phosphat
-N+P	kein Nitrat
+10N+P	zehnfache Konzentration an Nitrat

I.2 Variation der Spurenelemente nach STANIER et al. (1971)

-	nicht im Medium vorhanden
+	im Medium vorhanden
B	Borsäure, H_3BO_3
Mn	Manganchlorid, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
Zn	Zinksulfat, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
Mo	Natriummolybdat, $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$
Cu	Kupfersulfat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
Co	Kobaltnitrat, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$
all	alle Spurenelemente

I.3 Einbuchstaben-Codierung der Aminosäuren

Alanin	A	Histidin	H	Serin	S
Arginin	R	Isoleucin	I	Taurin	X
Asparagin	N	Leucin	L	Threonin	T
Asparaginsäure	D	Lysin	K	Tryptophan	W
Glutamin	Q	Methionin	M	Tyrosin	Y
Glutaminsäure	E	Ornithin	O	Valin	V
Glycin	G	Phenylalanin	F		

I.4 Toxikologie

C.v.	<i>Chlorella vulgaris</i>
DCMU	Dichlormethylurea
ED ₅₀	Effektive Konzentration 50%
ED _{DCMU}	Effektive Konzentration, die 0,01 µM DCMU
F ₀	Grundfluoreszenz
F _m	maximale Fluoreszenz
F _v	variable Fluoreszenz, F _m -F ₀
F _v /F _m	maximale Quantenausbeute der Photosynthese
Φ _{max}	maximale Quantenausbeute der Photosynthese
M.f.	<i>Microcystis firma</i>
µM CB	Mikromol Cyanobacterin pro Liter
N.p.	<i>Nitzschia pusilla</i>
Z	Zellen

II Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 1: Cyanobacterinkonzentration in *S. hofmanni* [mg CB g TM^{-1}] in verschiedenen Chargen von *S. hofmanni*. FKG: Kultivierung, Prof. Gleason (University of Minnesota, USA), BCH: Kultivierung, Biochemie (Universität Rostock, Deutschland), ÖKO: Kultivierung, Angew. Ökologie (Universität Rostock, Deutschland), IGV: Kultivierung in Platten-Fotobioreaktor, Inst. f. Getreideverarbeitung, Abteilung Biotechnologie der Algen (Bergholz-Rehbrücke, Deutschland) Med: Kultivierung in MEDUSA-Fotobioreaktoren, Institut für Biotechnologie (TU Berlin, Deutschland)

Tab. 2: Vergleich der Kultivierungsbedingungen von *Scytonema hofmanni* in den Arbeitsgruppen Abarzua (Rostock) und Mason / Gleason (St. Pauls). *¹ mit $0,4 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ statt mit 0,04; *² nach STANIER et al. (1971)

Tab. 3: Untersuchte freie gelöste Aminosäuren im Kulturmedium von *S. hofmanni* und deren Kodierung (Einbuchstaben-Code)

Tab. 4: Variation des BG11-Mediums modifiziert nach RIPPKA et al. (1979) nach 14 Tagen Kultivierung von *S. hofmanni* für die Untersuchungen zur Nährstoffverfügbarkeit

Tab. 5: Variation der Spurenelemente; + : im Medium vorhanden, - : nicht im Medium vorhanden, all: alle Spurenelemente

Tab. 6: Konzentrationen von Exsudaten, Cyanotoxinen und Arginin nach Applikation in *S. hofmanni* –Kulturen mit 14tägiger Vorinkubation

Abb. 1: *Scytonema hofmanni* (UTEX 1581); 40fache Vergrößerung, Mikroskop IX70, Olympus Ltd, Durchlicht

Abb. 2: Strukturformel von Cyanobacterin (nach PIGNATELLO et al., 1983)

Abb. 3: Grundlegendes Schema der Parametrisierung von Untersuchungen zur Optimierung der *S. hofmanni*-Kultur und der Cyanobacterin (CB) -Ausbeute. Chl *a*: Chlorophyll *a*, TBE: tert-Butylmethylether, DMF: N,N-Dimethylformamid

Abb. 4: Übersicht über das Experimentdesign und die variierten Parameter zur Optimierung der Wachstumsbedingungen und der Cyanobacterinkonzentration in *S. hofmanni*-Kulturen bei 25 °C. Schraffierte Felder: Untersuchungen zusätzlich bei weiteren Temperaturen, matte Felder: Untersuchung nach einem Test nicht weiter verfolgt

Abb. 5: Dauer der exponentiellen Phase [d] von *Scytonema hofmanni*-Kulturen in Abhängigkeit von der PFD; H:D 12:12, unbelüftet (Med, Max, Min, H:D $n = 3$)

Abb. 6: Wachstumsraten von unbelüfteten *Scytonema hofmanni*-Kulturen in Abhängigkeit von der PFD basierend auf der Chlorophyll *a* Fluoreszenz [mV], H:D 12:12 (a) und Dauerlicht (b), (H:D 12:12 Med, Max, Min, $n = 3$; Dauerlicht: $n = 1$)

- Abb. 7:** Maximal erreichte Chlorophyll *a* Fluoreszenz K_{FL} [mV] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von PFD, H:D 12:12 (a) und Dauerlicht (b), unbelüftet, (a: Med, Max, Min, $n = 3$; b: $n = 1$, weiße Punkte: K_{FL} geschätzt)
- Abb. 8:** Abundanz [mg TM l^{-1}] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, nach 25 Tagen, unbelüftet (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 9:** Chlorophyll *a*-Carotenoid-Verhältnis (Chl *a*/ Car) von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, nach 25 Tagen, unbelüftet (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 10:** Wachstumsraten (μ) von *Scytonema hofmanni*-Kulturen bei Belüftung ohne Anreicherung von CO_2 in Abhängigkeit von der PFD und basierend auf der Abundanz [mg TM l^{-1}], H:D 12:12, über 35 Tage, (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 11:** Abundanz [mg TM l^{-1}] von *Scytonema hofmanni* -Kulturen bei Belüftung ohne Anreicherung von CO_2 in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, über 35 Tage, (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 12:** pH – Wert des Kulturmediums bei Belüftung ohne Anreicherung von CO_2 über 35 Tage, $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12 (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 13:** Abundanz [mg TM l^{-1}] von *Scytonema hofmanni* bei Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 , in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12 h : 12 h, nach 35 Tagen, (Med, Max, Min, $n = 3$; $n = 6$ bei $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$))
- Abb. 14:** Chlorophyll *a* - Carotenoid-Verhältnis (Chl *a*/ Car) in *Scytonema hofmanni* bei Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12 h : 12 h, nach 35 Tagen (Med, Max, Min, $n = 3$; bei $75 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$: $n = 1$)
- Abb. 15:** pH – Wert des Kulturmediums bei Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 über 35 Tage, $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12 (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 16:** Spezifische Wachstumsraten von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur basierend auf der Abundanz [mg TM l^{-1}] über 35 Tage, $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 . (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 17:** Abundanz [mg TM l^{-1}] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur nach 35 Tagen, $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 . (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 18a-b:** Chlorophyll *a* – Carotenoid-Verhältnis (Chl *a*/ Car) in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur über 42 Tage, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (a), $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (b), $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12 Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 18c:** Chlorophyll *a* – Carotenoid-Verhältnis (Chl *a*/ Car) in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur über 42 Tage, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (c), $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12 Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$)

- Abb. 19:** Verlauf der SRP-Konzentration im Kulturmedium von *Scytonema hofmanni*, 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12, 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3, R² = 0,8827)
- Abb. 20:** Verlauf der Nitrat- (a) und Ammoniumkonzentration (b) im Kulturmedium von *Scytonema hofmanni*, 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12, 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)
- Abb. 21:** Abundanz [mg TM l^{-1}] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Nährstoffe Phosphat und Nitrat nach 28 Tagen, 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ H:D 12 h:12 h, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3) (vgl. 2.3.1.3 zu Nährstoffkonzentrationen)
- Abb. 22:** Abundanz [mg TM l^{-1}] von *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Spurenelementen (+ mit, - ohne) bei 20 °C (a) und 25 °C (b), 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ H:D 12:12, 35 Tage, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)
- Abb. 23:** Korrelation von Abundanz [mg TM l^{-1}] und Chlorophyll *a* Fluoreszenz von *Scytonema hofmanni* bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unabhängig von Temperatur und Zeit; $y = 0,0494x$; n = 42 (R² = 0,8932)
- Abb. 24:** Korrelation der Abundanz von *Scytonema hofmanni* [mg TM l^{-1}] mit dem pH-Wert nach 35 Tagen, gepoolte Daten unabhängig von PFD, Temperatur, Spurenelementen und zusätzlicher CO₂-Belüftung; (n = 89, R² = 0,2426)
- Abb. 25:** CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* aus unbelüfteten Kulturen in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, nach 20 Tagen, DMF-Extrakt (Med, Max, Min, n = 3)
- Abb. 26:** CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* bei Belüftung ohne Anreicherung von CO₂ in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12:12, über 35 Tage, (Med, Max, Min, n = 3)
- Abb. 27:** CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* bei Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ in Abhängigkeit von der PFD, H:D 12 h : 12 h, nach 35 Tagen, (Med, Max, Min, n = 3; n = 5 bei 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
- Abb. 28:** CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Temperatur über 42 Tage, 20 °C (a), 25 °C (b – mit abweichender Skalierung), 30 °C (c), 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)
- Abb. 29:** Konzentration freier gelöster Aminosäuren [μM] im Medium von *Scytonema hofmanni* über 42 Tage; 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12; 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)
- Abb. 30:** Konzentration freier gelöster Aminosäuren [μM] im Medium von *Scytonema hofmanni* über 42 Tage; 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, H:D 12:12; 25 °C, Belüftung mit 5% (v/v) CO₂ (Med, Max, Min, n = 3)

- Abb. 31:** CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Nährstoffe Phosphat und Nitrat nach 28 Tagen, $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ H:D 12 h:12 h, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$) (vgl. 2.3.1.3 zu Nährstoffkonzentrationen)
- Abb. 32:** CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Spurenelementen (+ mit, - ohne) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (a) und $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (b), $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, 35 Tage, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 33:** Korrelation der CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* mit dem pH-Wert bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach 35 Tagen, gepoolte Daten unabhängig von PFD, Spurenelementen und zusätzlicher CO_2 -Belüftung ($n = 59$, $R^2 = 0,1586$)
- Abb. 34:** Korrelation der CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* mit der Abundanz [mg TM l^{-1}], gepoolte Daten unabhängig von PFD, Temperatur, Zeit, Spurenelementen und CO_2 -Belüftung; $a \leq 0,5$ und $b \leq 5,0 \text{ mg CB g TM}^{-1}$ ($n = 208$, $r^2 = 0,5054$)
- Abb. 35:** Korrelation der Cyanobacterinkonzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* ermittelt durch TBE- und DMF-Extraktion; unabhängig von PFD, Temperatur und Zeit; $y = x$; $n = 52$ ($R^2 = 0,7204$)
- Abb. 36:** Plaquesdurchmesser [mm] um *Scytonema hofmanni* auf Agarkulturen von *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma* nach 7 und 21 Tagen. $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (med, max, min, $n = 3$)
- Abb. 37:** Plaquesdurchmesser [mm] um *Scytonema hofmanni* auf Agarkulturen von *Chlorella vulgaris* (a, b) und *Microcystis firma* (c, d) nach 7 (a, c) und 21 Tagen (b, d). $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (med, max, min, $n = 3$)
- Abb. 38:** CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von den Exsudaten von *Synechocystis* sp., *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma* nach 28 Tagen; $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 39:** Konzentration freier gelöster Aminosäuren [μM] im Medium von *Synechocystis* sp., *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma* nach 14 Tagen, $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ H:D 12:12, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 ($n = 1$)
- Abb. 40:** Konzentration der einzelnen freien gelösten Aminosäuren [μM] im Medium von *Synechocystis* sp., *Chlorella vulgaris* und *Microcystis firma* nach 14 Tagen, $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ H:D 12:12, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 ($n = 1$)
- Abb. 41:** CB-Konzentration [mg CB g TM^{-1}] in *Scytonema hofmanni* in Abhängigkeit von Cyanotoxinen und Argenin nach 28 Tagen; $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, H:D 12:12, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Belüftung mit 5% (v/v) CO_2 (Med, Max, Min, $n = 3$)
- Abb. 42:** ED_{50} (a) und ED_{DCMU} (b) [$\mu\text{M CB}$] auf die Photosyntheseaktivität (Φ_{max}) von *Nitzschia pusilla*, *Microcystis firma* und *Chlorella vulgaris* (Med, Max, Min, $n = 4$)

- Abb. 43:** Φ_{\max} [%] unter Einfluss von Cyanobacterin und DCMU auf *Scytonema hofmanni* (Med, Max, Min, n = 4; DCMU: [0,01 μM], n = 8)
- Abb. 44:** Zeitlicher Verlauf von Φ_{\max} [%] für *Nitzschia pusilla* in Abhängigkeit von der applizierten CB-Konzentration [μM] im Medium (Med, Max, Min, n = 3)
- Abb. 45:** Wachstumsraten von *Nitzschia pusilla* in Abhängigkeit von der CB-Konzentration [μM] über 4 Tage basierend auf der Abundanz [$Z \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$] (Med, Max, Min, n = 3)
- Abb. 46:** Zu jungen Adulti metamorphosierte Cyprislarven von *Balanus improvisus* [%] in Abhängigkeit von der CB-Konzentration [μM] über 3 Tage (Med, Max, Min, n = 3 x 50)
- Abb. 47:** Halbwertszeit von Cyanobacterin im natürlichen Medium Flusswasser der Warnow in Abhängigkeit von der Temperatur (Med, Max, Min, n = 3)
- Abb. 48:** Postulierte allelopathische Interaktion von *S. hofmanni* in einer Cyanobakteriengemeinschaft, 1: Abgabe von Substanzen cyanobakterieller Herkunft an die Umgebung. 2: Direkte Stimulation von *S. hofmanni* oder Einfluss auf die Verfügbarkeit von Spurenelementen. 3: Hemmung des Wachstums anderer Arten durch Cyanobacterin. gestrichelt: in dieser Arbeit nicht untersucht
- Abb. 49:** Postulierte Beteiligung von Aminosäurederivaten im Cyanobacterinmolekül (nach KLAPES et al., 1987)

III Medien

III.1 Zusammensetzung des BG11-Mediums (RIPPKA et al., 1979)

Komponenten	Konzentrationen	Konzentrationen
	[g l ⁻¹]	[mM]
NaNO ₃	1,50	17,70
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	0,04	0,18
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,075	0,30
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,036	0,25
Citronensäure	0,006	0,03
Ammoniumeisen-(III)-citrat	0,006	0,03
Na ₂ -EDTA*2H ₂ O	0,001	0,0027
Na ₂ CO ₃	1,000	19,00

III.2 Stammlösungen der Spurenelemente nach STANIER et al. (1971)

Komponenten	Konzentrationen [g l ⁻¹]
	(Stammlösungen)
H ₃ BO ₃	28,60
MnCl ₂ *4H ₂ O	18,10
ZnSO ₄ *7H ₂ O	2,22
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	3,90
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,79
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0,49

- separat autoklavieren
- von den Stammlösungen jeweils 100 µl zu einem Liter BG11-Medium geben

III.3 f/2 +Si – Medium nach GUILLARD et al. (1975)

- 20 ml f/2-Medium-Stammlösung Guillard's Marine water enrichment solution 50 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit autoklaviertem Ostseewasser (12 PSU) zu einem Liter auffüllen
- Zugabe von jeweils 1 ml Spurenelemente-Stammlösung I und II
- vor Zugabe von 1 ml Metasilikat-Stammlösung, pH-Wert mit 1 M HCl auf 4 und anschließend mit 1 M NaOH oder HCl auf 8.0 einstellen
- Zugabe von 1 ml Vitamine-Stammlösung

Komponenten	Konzentrationen [g l ⁻¹]
NaNO ₃	0,075
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,005

Spurenelemente-Stammlösung I für das f/2-Medium:

Komponenten	Konzentrationen [g l ⁻¹] (Stammlösung)
FeCl ₃ *6H ₂ O	3,15
Na ₂ -EDTA*2H ₂ O	4,36

Spurenelemente-Stammlösung II für das f/2-Medium:

Komponenten	Konzentrationen [g l ⁻¹] (Stammlösung)
CuSO ₄ *5H ₂ O	9,8
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	6,3
ZnSO ₄ *7H ₂ O	22,0
CoCl ₂ *6H ₂ O	10,0
MnCl ₂ *4H ₂ O	180,0

Metasilikat-Stammlösung für das f/2-Medium:

Komponenten	Konzentrationen [g l ⁻¹] (Stammlösung)
Na ₂ SiO ₃ *5H ₂ O	100,0

Vitamine-Stammlösung für das f/2-Medium:

Komponenten	Konzentrationen [g l ⁻¹] (Stammlösung)
Vitamin B ₁₂	1,00
Biotin	0,01
Thiamin HCl	0,20

IV Reagenzien

IV.1 Reagenzien zur Phosphatbestimmung

Molybdat-Reagenz:

- Lösung von 100 g Ammoniummolybdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot\text{H}_2\text{O}$) in 1000 ml Bidest. Wasser

Antimon-Reagenz:

- Lösung von 1,9 g Antimonchlorid (SbCl_3) in 200 ml 50%iger Schwefelsäure

Mischreagenz:

- 250 ml Molybdat-Reagenz mit 710 ml kalter Schwefelsäure vermischen, anschließend Zugabe von 40 ml Antimon-Reagenz

Ascorbinsäure-Reagenz:

- Lösung von 8 g Ascorbinsäure in 100 ml Bidest. Wasser

IV.2 Reagenzien zur Ammoniumbestimmung

Phenol-Reagenz:

- Lösung von 3,5 g Phenol und 0,04 g Nitroprussidnatrium ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in ammoniumfreiem dest. Wasser

Alkalischer Citratpuffer:

- Lösung von 280 g Natriumcitrat und 22 g Natriumhydroxid (NaOH) in 800 ml ammoniumfreiem dest. Wasser

Mischreagenz:

- 5 ml Natriumhypochloridlösung mit alkalischem Citratpuffer auf 100 ml auffüllen

V Futterkulturen für die Adulti und Nauplien von *B. improvisus*

V.1 Kultivierung von *Skeletonema costatum*

- Kultivierung im Diatomeenmedium f/2 (nach GUILLARD 1975), 12 PSU, 75 μmol Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (H:D 12:12), 20°
- Gewinnung der Biomasse nach 3-4 Tagen, Aufkonzentration durch Zentrifugation

V.2 Kultivierung von *Artemia spec.*

- 150 ml autoklaviertes natürliches Ostseewasser (durch 50 μm Gaze gefiltert, mit Meersalz (H.Wiegand, GmbH) auf 25 PSU eingestellt) gut belüften
- 1,5 g *Artemia spec.*- Eier hinzufügen ("Red Dragon™"; Western Brine Shrimp International, Inc.) und über 24 h-48 h bei 25 °C inkubieren
- zur Gewinnung der *Artemia*-Nauplien Belüftung einstellen, Becherglas von einer Seite beleuchten und nach ca. 10 Min abpipettieren

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich bei allen meinen Arbeitskollegen, Freunden und bei meiner Familie, die auf verschiedene Weise zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, **herzlichst zu bedanken!**

Ich danke Prof. Dr. Ulf Karsten für die Annahme des Themas und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Arne Schoor, Dr. Anja Bretschneider und Dr. Uwe Selig für die jederzeit gewährte Hilfe und die intensive Betreuung. Mit konstruktiven Diskussionen und letzten Endes der Durchsicht des Manuskriptes haben sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Den Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden der Arbeitsgruppe Angewandte Ökologie möchte ich für die vielen Gespräche, die fruchtbare Zusammenarbeit und die gewährte Hilfe danken. Bei Dr. Solvig Görs und bei Sebastian Lembke bedanke ich mich herzlich für Einführung in die Geheimnisse der HPLC und für die Messung von Proben. Ebenfalls möchte ich mich bei Anja Hansen für die im Rahmen einer Semesterarbeit durchgeführten Untersuchungen bedanken. Frau Rita Wulf und Frau Juliane Buß seien für die Hilfe bei Analysen gedankt.

Ein großes Dankeschön an Prof. Dr. Florence K. Gleason von der University of Minnesota für die sehr interessanten und gewinnbringenden Wochen in ihrer Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die Bereitstellung des aufgereinigten Cyanobacterins als Standard für die HPLC.

Bei der Hans-Böckler-Stiftung möchte ich mich nicht nur für die dreijährige Finanzierung herzlich bedanken, sondern auch für die vielen spannenden Seminare zu verschiedenen Themen aus (Wissenschafts-)Politik und Gesellschaft. Darüber hinaus bin ich sehr dankbar für die mir ermöglichten Sprachkurse in Québec und Paris und den Aufenthalt an der University of Minnesota. Recht herzlichen Dank an meinen Vertrauensdozenten Prof. em. Dr. Thomas Höpner für die sensible Auseinandersetzung mit verzwickten wissenschaftlichen und anderen Problemen.

An dieser Stelle möchte ich meine Familie, insbesondere meine Eltern Anja und Wolfgang Kacan, meinen Bruder Andreas Kacan, meine Großeltern Edward und Hedwig Kacan sowie alle meine Freunde nicht vergessen. Sie standen immer hinter mir und haben mich mit allen Kräften unterstützt. Bei ihnen habe ich viel Verständnis, Geduld und Aufmunterung gefunden. Mit ihnen konnten Brücken und Leitern gebaut werden, um kleinere und größere Hindernisse zu überwinden. Und wie so oft war ein herzhaftes Lachen und eine kleine liebe Geste die beste Medizin. Ich danke euch allen von ganzem Herzen dafür!

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 11. September 2007

Stefan Kacan

Lebenslauf

AUSBILDUNG

- 1997 – 1999 Kurse für Lehramt Biologie/ Chemie Sec. II an der Universität Rostock
- 1991 - 1997 Biologiestudium an der Universität Rostock und dem Institute of Marine Science, Burapha Universität Chonburi, Thailand
- Titel der Diplomarbeit: Biogenic active agents from starfish *C. novaeguineae* and holothurian *H. leucospilota* to inhibit fouling processes
- Betreuung: PD Dr. Sybille Abarzua, Prof. Dr. Ernst A. Arndt, Dr. Chutiwan Dechsakulwatana

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

- 2002 - 2007 Promotion an der Universität Rostock
- Titel der Arbeit: Untersuchungen zur Produktion von Cyanobacterin, einem Toxin aus dem Cyanobakterium *Scytonema hofmanni* Ag. (UTEX 1581) – anwendungsbezogene und ökologische Aspekte
- Betreuung: Prof. Dr. Ulf Karsten
- 2002 - 2005 wissenschaftliche Mitarbeit, NORDUM GmbH, Kessin
- Ermittlung und Bewertung von Geruchsemissionen
- 1999 - 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im interdisziplinären Forschungsprojekt "Bewuchsverhinderung an meerestechnischen Objekten durch biogene Antifoulinganstriche" an der Universität Rostock
- Untersuchung biologisch aktiver Substanzen zur Verhinderung von Biofouling, Entwicklung von Unterwasseranstrichen
- 1997 - 1999 Projektleiter und Koordinator im Abfallmanagementprojekt, Ökohaus e.V., Rostock
- "Nachweis der Genehmigungsfähigkeit einer großdimensionierten Komposttoiletten- Anlage im städtisch-öffentlichen Raum am Modellprojekt Ökohaus Rostock unter Berücksichtigung baurechtlicher, hygienischer, epidemiologischer und siedlungswasserwirtschaftlicher Aspekte und der Gesamtökobilanz"
-

Publikationen und Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen

Veröffentlichungen

- ABARZUA, S.; KACAN S.; GÖRS, S.; PENTSCHEW, P.; SCHACHT, B.; SCHUMANN, R. & PIECHULLA, B. (2007): The utilization of biogenic antifouling coatings for marine technical objects. Laboratory antifouling assays and field experiments with stationary and mobile test surfaces, Biofouling, submitted
- ABARZUA, S., KACAN S., GÖRS, S., PENTSCHEW, P., SCHACHT, B., SCHUMANN, R. AND PIECHULLA B. (2002): Bewuchsverhinderung an meeresstechnischen Objekten durch biogene Antifoulinganstriche. Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Abschlussbericht, 29 pp.
- ABARZUA, S.; KACAN S.; GÖRS, S.; PENTSCHEW, P.; SCHACHT, B.; SCHUMANN, R. & PIECHULLA, B. (2002): The utilization of biogenic antifouling coatings for marine technical objects. In: PASCHEN, M. (Ed., 2002): Contributions on the theory of fishing gears and related marine Systems. (Proceedings DEMAT, 07.-10.11.2001, Rostock) Vol. 2, 331-346
- PENTSCHEW, P., SCHACHT, B., SCHUMANN, R., GÖRS, S., KACAN S., ABARZUA, S. (2001) Biogene Antifoulinganstriche – Vorbereitung und Durchführung der Versuche (Biogenic antifouling coatings – Preparation and carrying out of experiments), in BRÖKEL, K.; SCHLOTTMANN, D.; SCHARR, G., 3. Workshop Konstruktionstechnik, Innovation – Konstruktion – Berechnung, 20./21. September, University of Rostock, proceedings, Shaker Verlag Aachen, pp. 481-488
- KACAN, S., S. GÖRS, R. SCHUMANN, B. SCHACHT, P. PENTSCHEW, B. PIECHULLA & S. ABARZUA (2001) Antifouling effects of biogenic on marine technical objects in a flow through system. International Conference on Biofouling and Materials, Conference Proceedings, 107, June 10-13, 2001, Frankfurt/Main
- SCHUMANN, R., KACAN, S., GÖRS, S., ABARZUA, S. (2000): Isolation, Analysis and effectiveness of biogenic antifoulants from algae, Fifth International Conference on Marine Science and Technology, Black Sea2000, Conference Proceedings, Vol. 2, 128-132, November 9-10, Varna, Bulgaria
- ABARZUA, S., S. KACAN & P. FUCHS (1999) Status and potential of natural product antifoulants, pp. 37-45, in: Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 3, Biofilms, Bioadhesion, Corrosion, and Biofouling, M. Fingerman, R. Nagabhushanam & M.-F. Thompson (eds), Science Publishers, New Hampshire, USA
- KACAN, S., (1999): Nachweis der Genehmigungsfähigkeit einer großdimensionierten Komposttoiletten- Anlage im städtisch-öffentlichen Raum am Modellprojekt Ökohaus Rostock unter Berücksichtigung baurechtlicher, hygienischer, epidemiologischer und siedlungswasserwirtschaftlicher Aspekte und der Gesamtökobilanz, Abschlussbericht, Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Osna-brück

Präsentationen

- KACAN, S., GÖRS, S., SCHUMANN, R., SCHACHT, B., PENTSCHEW, P., PIECHULLA, B., ABARZUA, S. (2001): Biogenic active agents to prevent Marine Biofouling, Universität Rostock, Internationale Bootsmesse "Hanseboot", 27.10.–4. 11. 2001, Hamburg, Standbetreuung, Präsentation
 - KACAN, S., GÖRS, S., SCHUMANN, R., SCHACHT, B., PENTSCHEW, P., PIECHULLA, B., ABARZUA, S. (2001): Antifouling effects of biogenic compounds on marine technical objects in a flow-through system, University of Rostock, International Conference on Biofouling and Materials, June 10–13, 2001, Frankfurt/Main, Poster
 - KACAN, S. (1998): Mit dem Plumpsklo ins neue Jahrtausend?!, Ökohaus e.V. Rostock, Abfallwirtschaftliche Tagung der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, November 24-25, Osnabrück, Poster
 - KACAN, S., ABARZUA, S., FUCHS, P. (1997): Biogenic active agents from marine organisms, University of Rostock, days of sciences, November, Rostock, Poster
 - KACAN, S., PUTCHARKAN, S. (1996): Chemical compounds in Echinoderms, Bangsaen Institute of Marine Science, Scientific student days, April, Bangsaen, Thailand, Poster und Vortrag
-

Investigation of Cyanobacterin production, a toxin
from the cyanobacterium *Scytonema hofmanni* Ag. (UTEX 1581)
– use-oriented and ecological considerations

Summary

The aim of the study was to investigate the biotechnical production of the cyanotoxin cyanobacterin by the cyanobacterium *Scytonema hofmanni* (UTEX 1581) under the influence of the following abiotic parameters: photon flux rate, pH, temperature, different nutrient concentrations nitrate and phosphate as well as of trace elements.

Based on these data, the ecology of *Scytonema hofmanni* as part of a cyanobacterial community in the Everglades (Florida, USA) was concluded.

A new rapid method was developed to quantify cyanobacterin in the biomass by photometric analysis of DMF-extracts within 24 h.

Cyanobacterin exhibited allelochemical effects and its biosynthesis again is influenced by allelopathy.

Cyanobacterin can be used as a natural herbicide and as a co-antifoulant.
