

Charakterisierung und Monitoring des Phyto- und Bakterioplanktons der
Talsperre Saidenbach

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Bereich für Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

M. Sc. Anne Hartmann

geboren am 05.03.1984 in Dresden

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. I. Röske

Prof. Dr. rer. nat. habil. U. Szewzyk

Verteidigt am: 23.10.2018

*Was wir wissen, ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen, ein Ozean.*

Isaac Newton

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2013 bis September 2015 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Isolde Röske (TU Dresden) und Dr. Kerstin Röske (Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig) angefertigt.

Die Promotionsordnung in der Fassung vom 23.02.2011 wird anerkannt.

Dresden, 23.08.2018

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	II
II Veröffentlichungen.....	VI
III Abkürzungsverzeichnis	VIII
IV Abbildungsverzeichnis.....	X
V Tabellenverzeichnis	XVIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Untersuchungsgewässer Talsperre Saidenbach.....	1
1.2 Bakterioplankton in Talsperren und Seen	4
1.2.1 Die Rolle des Bakterioplanktons in limnischen Ökosystemen	4
1.2.2 Actinobacteria	6
1.2.3 Proteobacteria.....	9
1.2.4 Bacteroidetes	12
1.2.5 Verrucomicrobia und weitere Phyla.....	13
1.2.6 Cyanobacteria.....	14
1.3 Phytoplankton – Arteninventar und Dynamik in der Talsperre Saidenbach.....	19
1.4 Überblick über die angewendeten Methoden	20
1.5 Zielstellung der Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Probenahme	23
2.2 Chemische Analytik	24
2.3 Mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	24
2.4 Mikroskopische Quantifizierung des autotrophen Picoplanktons	25
2.5 Durchflusszytometrie	25
2.5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl	26

I Inhaltsverzeichnis

2.5.2 Quantifizierung und Differenzierung des autotrophen Picoplanktons	26
2.6 Spektrofluorometrische Erfassung von Phytoplanktongruppen.....	27
2.6.1 Grundlagen und Messprinzip	27
2.6.2 Datenaufnahme und Vergleich mit mikroskopisch ermittelter Phytoplanktonzusammensetzung	29
2.7 Molekularbiologische Methoden	31
2.7.1 DNA-Isolierung, Polymerase-Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.7.3 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)	33
2.7.4 Klonierung	36
2.7.5 Sequenzierung	37
2.7.6 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung	38
2.7.7 Catalyzed reporter deposition Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (CARD-FISH)	40
2.8 Sequenzanalyse und statistische Auswertung	44
3 Ergebnisse.....	45
3.1 Meteorologische, physikalische und chemische Parameter	45
3.1.1 Übersicht Probenahmen	45
3.1.2 Meteorologische Charakterisierung der Untersuchungsjahre	45
3.1.3 Hydrophysikalische Parameter.....	49
3.1.4 Chemische Parameter	55
3.2 Spektrofluorometrische Erfassung von Phytoplanktongruppen.....	61
3.2.1 Saisonale Entwicklung der Phytoplanktongruppen anhand der Sondenmessungen.....	61
3.2.2 Vergleich zwischen Sondenmessungen und mikroskopischer Analyse des Phytoplanktons.....	64
3.3 Quantifizierung und Differenzierung des autotrophen Picoplanktons anhand Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie	78
3.3.1 Mikroskopische Analyse der saisonalen Entwicklung des autotrophen Picoplanktons.....	78
3.3.2 Quantifizierung und Differenzierung des APP mittels Durchflusszytometrie	83
3.3.3 Einfluss von Umweltfaktoren auf die Abundanz des APP	88

I Inhaltsverzeichnis

3.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie	92
3.5 Differenzierung und Quantifizierung der bakteriellen Gemeinschaft mittels CARD-FISH	94
3.6 Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft mittels 16S-Amplikon Pyrosequenzierung.....	101
3.6.1 Überblick über den Datensatz.....	101
3.6.2 Überblick auf Phylumebene	105
3.6.3 Proteobacteria.....	106
3.6.4 Actinobacteria	110
3.6.5 Bacteroidetes	111
3.6.6 Cyanobacteria/Chloroplast.....	113
3.6.7 Verrucomicrobia.....	115
3.6.8 Clusteranalyse und Einfluss von Umweltparametern auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft	117
3.6.9 Einfluss von Umweltparametern auf einzelne Taxa.....	120
3.7 Die bakterielle Diversität anhand von DGGE und Klonierung.....	128
3.7.1 Klonierung und Zuordnung von DGGE-Banden.....	128
3.7.2 Bakterielle Diversität im Jahresverlauf an den verschiedenen Untersuchungsstellen	134
3.8 Die Diversität der Alphaproteobacteria anhand von DGGE und Klonierung	160
3.8.1 Untersuchung der Diversität der Alphaproteobacteria mittels Klonierung und DGGE	160
3.9 Untersuchung der Diversität der Betaproteobacteria mittels DGGE.....	175
3.10 Untersuchung der Diversität der Gruppe <i>Synechococcus</i> /GpIIa mittels DGGE	178
4 Diskussion.....	183
4.1 Phytoplankton und autotrophes Picoplankton	183
4.1.1 Fluoreszenzsondenbasierte Quantifizierung und Differenzierung des Phytoplanktons.....	183
4.1.2 Quantifizierung und Differenzierung des autotrophen Picoplanktons mittels Durchflussztometrie	185
4.1.3 Lokale und saisonale Entwicklung des APP	187
4.2 Bacteria.....	189

I Inhaltsverzeichnis

4.2.1 Quantifizierung und Differenzierung der <i>Bacteria</i> und ihrer Untergruppen anhand zellbasierter Verfahren.....	189
4.2.2 Diversität und raum-zeitliche Variation der bakteriellen Gemeinschaft anhand DNA-basierter Methoden.....	192
4.2.3 Phylogenetische Einordnung und ökologisches Verhalten abundanter Taxa.....	199
5 Zusammenfassung.....	221
6 Literaturverzeichnis.....	225
VI Anlagen.....	XXI
A 1: Hydrophysikalische Parameter	XXI
A2: Chemische Parameter	XXVIII
A3: Cluster DGGE-Profile der Stellen F, H, S.....	XXXI
Dank.....	XXXIV

II Veröffentlichungen

II Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits im Rahmen der folgenden Publikationen und Konferenzbeiträge veröffentlicht:

A. Hartmann, Röske, I., Röske, K. Diversity and seasonal variation of the Bacterioplankton community of a drinking water reservoir revealed by 16S rDNA based pyrosequencing.

Posterpräsentation, Tagung der VAAM/DGHM 2014

A. Hartmann, Röske, I., Röske, K. 16S rDNA Pyrosequenzierung der mikrobiellen Diversität in der Trinkwassertalsperre Saidenbach (Erzgebirge) im Jahresverlauf

Vortrag, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie 2015

Röske, K., Hartmann, A., Horn, H., Röske, I. Validierung der fluorometrischen Quantifizierung von Phytoplanktongruppen im Jahresverlauf in der Trinkwassertalsperre Saidenbach anhand mikroskopischer Zählungen

Vortrag, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie 2015

Hartmann, A., Röske, K., Horn, H., Röske, I. Comparison of fluorometric and microscopical quantification of phytoplankton in a drinking water reservoir by a one-season monitoring program.

Aquatic Sciences, accepted

II Veröffentlichungen

III Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
A. dest.	destilliertes Wasser
APP	autotrophes Picoplankton
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CARD FISH	Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
Chl	Chlorophyll
Chl _a /BV	Verhältnis von Chlorophyll a zu Biovolumen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DIC	gelöster anorganischer Kohlenstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
DTC	gelöster Gesamt-Kohlenstoff
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E	Probenahmestelle vor der Hauptstaumauer (Entnahmestelle) der Talsperre Saidenbach
Exo	Exonuklease I
F	Probenahmestelle Vorsperre Forchheim
FW	Freiwasser
G	Guanin

III Abkürzungsverzeichnis

H	Probenahmestelle stromabwärts der Unterwasserstaumauer im Haselbacharm der Talsperre Saidenbach
LB-Medium	Luria Bertani Medium
µm	Mikrometer
NMDS	Nichtmetrische multidimensionale Skalierung
OTU	Operational taxonomic unit, operative taxonomische Einheit
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PC	Phycocyanin
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
S	Probenahmestelle stromaufwärts der Unterwasserstaumauer im Haselbacharm der Talsperre Saidenbach
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
SRP	<i>soluble reactive phosphorus</i> , Ortho-Phosphat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T	Thymin
TP	Gesamt-Phosphat
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
Vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: (A) Schematische Darstellung der Talsperre Saidenbach und der Vorsperre Forchheim mit den vier Probenahmestellen, (B) longitudinaler Schnitt durch die Talsperre (nicht maßstabsgerecht), verändert nach [7]; (C) Luftbildaufnahme der Talsperre Saidenbach mit den drei Probenahmestellen in der Hauptsperre.....	2
Abbildung 2: Auswahl biotischer und abiotischer Einflussfaktoren auf das Bakterioplankton, aus [12]	4
Abbildung 3: (A) bakterielle Strategien zur Fraßvermeidung durch unterschiedliche Predatoren; (B) Auswirkungen größenselektiver bakteriovorer Organismen auf die Zellgrößenstruktur	5
Abbildung 4: Taxonomische Einordnung des hgcl-clusters (Actinobacteria).....	7
Abbildung 5: vorgeschlagene Unterklassen der Alphaproteobacteria basierend auf 16S- und 23S rDNA Sequenzen nach [40]	10
Abbildung 6: Übersicht über Gruppen und taxonomische Einheiten der <i>Betaproteobacteria</i>	11
Abbildung 7: Absorptionsspektren der Phycobiline Phycocyanin und Phycoerythrin im Vergleich mit Chlorophyll	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 8: Schematische Darstellung der 16S rDNA mit hypervariablen Regionen V1-V9.....	20
Abbildung 9: Fluoreszenzspektra verschiedener Algenklassen nach Anregung in fünf Wellenlängenbereichen	28
Abbildung 10: Darstellung des bbe-Messprinzips (bbe moldaenke GmbH, 2016)	28
Abbildung 11:Prinzip der 454-Amplikon-Sequenzierung	40
Abbildung 12: Prinzip der HRP-vermittelten Signalamplifikation (CARD).....	41
Abbildung 13: Monatsmittel der Lufttemperaturen in 2 m Höhe an der Station Forchheim (50.71 °N 13.27 °E; 600 m ü. NN)	46
Abbildung 14: Zirkulations- und Schichtungsverhältnisse an der Entnahmestelle der Talsperre Saidenbach von 2013 bis 2015; Datengrundlagen (Temperaturprofile, Grad der Eisbedeckung).....	46
Abbildung 15: Monatssummen Niederschläge 2013 bis 2015 an der Wetterstation Forchheim (50.71°N 13.27°E; 600 m ü. NN)	47
Abbildung 16: Verlauf der Trübung an der Entnahmestelle der Talsperre Saidenbach 2013 mit Kennzeichnung der monatlichen Probenahme.....	48
Abbildung 17: Gesamtphosphat (total phosphorus TP) und lösliches Phosphat (soluble reactive phosphate SRP) und an der Entnahmestelle der Talsperre Saidenbach 2013	48
Abbildung 18: Monatsmittel der Globalstrahlung 2013 bis 2015 an der Wetterstation Forchheim (50.71°N 13.27°E; 600 m ü. NN)	49

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Tiefe der euphotischen Zone abgeleitet aus der Sichttiefe an den vier Untersuchungsstellen	50
Abbildung 20: Elektrische Leitfähigkeit 2013 bis 2015 für 2 m und 4 m Wassertiefe aller Untersuchungsstellen sowie 6 m, Metalimnion und 20 m der Entnahmestelle	50
Abbildung 21: Sauerstoffkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung.....	52
Abbildung 22: pH-Werte 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung.....	53
Abbildung 23: Chlorophyll-a-Konzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung	53
Abbildung 24: Ammoniumkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung	56
Abbildung 25: Nitratkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung.....	57
Abbildung 26: Sulfatkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung.....	58
Abbildung 27: Chloridkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung.....	58
Abbildung 28: Konzentrationen von DIC, DOC und DTC 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung	60
Abbildung 29: Tiefenprofile der mit der FluoroProbe-Sonde quantifizierten Algengruppen für die vier Untersuchungsstellen in Fließrichtung.....	62
Abbildung 30: Auswahl der FluoroProbe-Tiefenprofile an den Untersuchungspunkten in Fließrichtung.	63
Abbildung 31: Jahresgang der Gesamtbiovolumina (Mikroskopie) und Gesamt-Chlorophyll a-Konzentrationen (Sondenmessungen FluoroProbe) für die vier Probenahmestellen sowie das Verhältnis von Chlorophyll a zu Biovolumen (Chl a/BV).....	64
Abbildung 32: Gruppenweise Phytoplanktonzusammensetzung je Probenahmestelle nach mikroskopischer Analyse und nach FP- Sondenmessungen im Vergleich	66
Abbildung 33: Verhältnisse aus Chlorophyll a-Konzentration und Biovolumen im Vergleich nach Probenahmestellen (A) und –zeitpunkt (B).....	67
Abbildung 34: Relative Anteile der Phytoplanktongruppen am Gesamtbiovolumen bzw. Gesamt-Chla...	69
Abbildung 35: Zusammensetzung des Phytoplanktons im Jahresverlauf 2014 nach mikroskopischer Analyse (A) und fluorometrischer Messung (B und C).....	70

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 36: Artenzusammensetzung für die spektrale Gruppe der Diatomeen mit entsprechenden Biovolumina, Chlorophyll a-Konzentrationen dieser Gruppe und Verhältnisse aus Chl a/BV	72
Abbildung 37: Artenzusammensetzung der Grünalgen mit entsprechenden Biovolumina, Chlorophyll a-Konzentrationen und Verhältnisse aus Chl a/BV	73
Abbildung 38: Artenzusammensetzung der <i>Cryptophyta</i> mit entsprechenden Biovolumina, Chlorophyll a-Konzentrationen und Verhältnisse aus Chl a/BV	74
Abbildung 39: Artenzusammensetzung der Cyanobakterien mit entsprechenden Biovolumina, Chlorophyll a-Konzentrationen und Verhältnisse aus Chl a/BV	76
Abbildung 40: Zellzahlen von APP, PE-haltigen und PC-haltigen Picoplanktern an den Untersuchungsstellen- und tiefen 2013 bis September 2015.....	78
Abbildung 41: Saisonale Entwicklung des autotrophen Picoplanktons [Zellen/ml] an den vier Untersuchungsstellen in 2 m (A) und 4 m (B) Wassertiefe	80
Abbildung 42: Saisonale Entwicklung des autotrophen Picoplanktons [Zellen / ml] an der Entnahmestelle in 2, 4, 6 und 20 m Wassertiefe sowie im Metalimnion.....	80
Abbildung 43: Zellzahlen des autotrophen Picoplanktons unterschieden in PE-haltige und PC-haltige Zellen für 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen F, H und S	81
Abbildung 44: Zellzahlen des APP unterschieden in PE-haltige und PC-haltige Zellen an der Entnahmestelle in 2, 4 und 20m (A) Wassertiefe bzw. in 6 m Wassertiefe und im Metalimnion (B).....	82
Abbildung 45: Plots für Proben von Juli 2015 aus 2m Wassertiefe der vier Probenahmestellen in Fließrichtung; Reihe A: Auftragung von Signalanzahl gegen Signalgröße zur Abgrenzung picoplanktischer Zellen; Reihe B: Auftragung der Chlorophyll-Fluoreszenz (FL3-H) gegen die Phycocyanin-Fluoreszenz (FL4-H) zur Unterscheidung PC-haltiger und PE-haltiger picoplanktischer Zellen	83
Abbildung 46: Mikroskopisch und durchflusszytometrisch ermittelte Zellzahlen für das APP 2014 und 2015	85
Abbildung 47: Mikroskopisch und durchflusszytometrisch ermittelte Zellzahlen für das PE-haltige und PC-haltige APP 2014.....	86
Abbildung 48: Mikroskopisch und durchflusszytometrisch ermittelte Zellzahlen für das PE-haltige und PC-haltige APP 2015.....	87
Abbildung 49: Darstellung signifikanter Zusammenhänge ($p < 0,005$, Korrelationskoeffizienten nach Pearson) von Umweltparametern mit den Zellzahlen von APP, PC-APP und PE-APP im Epilimnion (2m, 4m), sowie Metalimnion bzw. 6m Wassertiefe der Entnahmestelle	88
Abbildung 50: 10-Tagesmittel der Globalstrahlung im Vorfeld der Probenahme in Zusammenhang mit den Zellzahlen von PE-APP (A) und PC-APP (B) der Entnahmestelle in 2 und 4 m Wassertiefe	89

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 51: 10-Tagesmittel der Lufttemperaturen im Vorfeld der Probenahme in Zusammenhang mit den Zellzahlen von APP (A), PE-APP (B) und PC-APP (C) aller Untersuchungsstellen in 2 und 4 m Wassertiefe	90
Abbildung 52: Wassertemperaturen in Zusammenhang mit den Zellzahlen von APP (A), PC-APP (B und PE-APP (C) aller Untersuchungsstellen in 2 und 4 m Wassertiefe.....	90
Abbildung 53: pH-Wert in Zusammenhang mit den Zellzahlen von APP (A) und PE-APP (B) aller Untersuchungsstellen in 2 und 4 m Wassertiefe	91
Abbildung 54: Vergleich fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch ermittelter Gesamtzellzahlen 2013 bis 2015	92
Abbildung 55: Anteile der Hybridisierungssignale der <i>Eubacteria</i> nach Markierung mit den Sonden EUB338 I, II und III an der Gesamtzellzahl nach Propidiumiodidfärbung	95
Abbildung 56: Anteile der Hybridisierungssignale von <i>Alphaproteobacteria</i> (Sonde A968) und SAR 11/LD12 clade/ <i>C. Pelagibacter</i> (Sonde LD12-121) an der Gesamtzellzahl (PI-Färbung).....	97
Abbildung 57: Anteile der Hybridisierungssignale von <i>Alphaproteobacteria</i> nach Markierung mit Sonde A968, LD12-121 und Alpha688 an der Gesamtzellzahl (PI-Färbung).....	98
Abbildung 58: Bindestellen der Sonden A688, LD12-121 und A 968 in der räumlichen Struktur der 16S rDNA von <i>C. Pelagibacter ubique</i> strain HTCC1062 (Accession-Nr. NR_074224.1).....	99
Abbildung 59: Anteil Hybridisierungssignale für <i>Betaproteobacteria</i> nach Sondenmarkierung mit Bet42a an Gesamtzellzahl (PI-Färbung).....	100
Abbildung 60: Relative Sequenzanteile der häufigsten Phyla in Proben der Vorsperre Forchheim und verschiedener Stellen der der Talsperre Saidenbach in zwei Größenfraktionen des Freiwassers (Partikel > 5µm und < 5µm).....	105
Abbildung 61: Zusammensetzung der <i>Proteobacteria</i> , dargestellt als Anteile der Klassen an <i>Bacteria</i> ..	106
Abbildung 62: Zusammensetzung der <i>Alphaproteobacteria</i> nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; 100% entsprechen den <i>Alphaproteobacteria</i> zugeordneten Sequenzen Taxonomische Zuordnung nach Silva reference files (release 128).....	108
Abbildung 63: Zusammensetzung der <i>Betaproteobacteria</i> nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; 100% entsprechen der Klasse <i>Betaproteobacteria</i> zugeordneten Sequenzen; taxonomische Zuordnung nach Silva reference files (release 128).....	110
Abbildung 64: Zusammensetzung der <i>Actinobacteria</i> nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; taxonomische Zuordnung nach Silva reference files (release 128).....	111

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 65: Zusammensetzung der Bacteroidetes nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; 100% entsprechen dem Phylum Bacteroidetes zugeordneten Sequenzen; Taxonomische Zuordnung nach Silva reference files (release 128).....	112
Abbildung 66: Zusammensetzung der <i>Sphingobacteriales</i> nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; 100% entsprechen der Ordnung <i>Sphingobacteriales</i> zugeordneten Sequenzen; taxonomische Zuordnung nach Silva reference files (release 128)	113
Abbildung 67: Zusammensetzung des Phylums Cyanobacteria nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; 100% entsprechen dem Phylum Cyanobacteria zugeordneten Sequenzen	114
Abbildung 68: Zusammensetzung der Klasse <i>Cyanobacteria</i> nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; 100% entsprechen der Klasse <i>Cyanobacteria</i> zugeordneten Sequenzen	115
Abbildung 69: Zusammensetzung des Phylums <i>Verrucomicrobia</i> nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; 100% entsprechen den <i>Verrucomicrobia</i> zugeordneten Sequenzen; taxonomische Zuordnung nach Silva reference files (release 128).....	116
Abbildung 70: Dendrogrammdarstellung der hierarchischen Clusteranalyse für normalisierte Häufigkeiten von OTUs	117
Abbildung 71: Darstellung signifikanter Korrelationen ($p < 0,01$, Korrelationskoeffizienten nach Pearson) von Umweltparametern mit relativen Häufigkeiten ausgewählter Taxa in der Größenfraktion $<5\mu\text{m}$...	121
Abbildung 72: Darstellung signifikanter Korrelationen ($p < 0,01$, Korrelationskoeffizienten nach Pearson) von Umweltparametern mit relativen Häufigkeiten ausgewählter Taxa in der Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$..	125
Abbildung 73: Darstellung signifikanter Korrelationen ($p < 0,01$, Korrelationskoeffizienten nach Pearson) zwischen relativen Häufigkeiten ausgewählter Taxa in der Größenfraktion $<5\mu\text{m}$	127
Abbildung 74: Schematische Darstellung der für DGGE und Klonierung verwendeten Primerkombinationen und resultierender DNA-Fragmente.....	128
Abbildung 75: DGGE-Signale von Klonen der <i>Bacteroidetes</i> (<i>Arcicella</i> , <i>Flavobacterium</i>)	130
Abbildung 76: DGGE-Signale von Klonen der <i>Bacteroidetes</i> , <i>Betaproteobacteria</i> und <i>Alphaproteobacteria</i>	131
Abbildung 77: DGGE-Signale von Klonen der <i>Verrucomicrobia</i> und <i>Actinobacteria</i> ; X=klonierte Probe E $<5\mu\text{m}$, April 2013; Ausschnitt aus dem Maximum-Likelihood-tree auf Grundlage der Sequenzdaten des DGGE-Fragments der als <i>hgcl-clade</i> identifizierten Klone	133
Abbildung 78: Normalisierte DGGE-Profile der bakteriellen Diversität Größenfraktion $>5\mu\text{m}$ an den Probenahmestellen in Fließrichtung	136
Abbildung 79: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion $>5\mu\text{m}$ der Proben von 2013	139

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 80: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion >5µm der Proben von 2014	140
Abbildung 81: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion >5µm der Proben von 2015	141
Abbildung 82: Normalisierte DGGE-Profile der bakteriellen Diversität der Größenfraktion < 5µm an den Probenahmestellen in Fließrichtung	143
Abbildung 83: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion <5µm der Proben von 2013	146
Abbildung 84: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion <5µm der Proben von 2014	147
Abbildung 85: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion <5µm der Proben von 2015	148
Abbildung 86: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Proben aus 2 m Wassertiefe der Entnahmestelle von April 2013 bis September 2015.....	151
Abbildung 87: DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaft an der Entnahmestelle im Jahr 2015	152
Abbildung 88: NMDS auf Grundlage der normalisierten DGGE-Profile der bakteriellen Diversität der Proben 2013 bis 2015, Größenklasse >5µm	154
Abbildung 89: Projektion der Umweltparameter (vector fitting) in die Plots der NMDS der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität.....	157
Abbildung 90: NMDS auf Grundlage der DGGE-Profile der Proben 2013 bis 2015, Größenklasse <5µm	158
Abbildung 91: Vergleich der DGGE-Profile von PCR-Produkten aus vier Primerkombinationen zur Abbildung der Diversität der <i>Alphaproteobacteria</i> ;	160
Abbildung 92: Schematische Darstellung der für DGGE und Klonierung der <i>Alphaproteobacteria</i> verwendeten Primerkombinationen und resultierender DNA-Fragmente.....	162
Abbildung 93: DGGE-Profil und klonierte DNA-Fragmente für <i>Alpha</i> - und <i>Deltaproteobacteria</i> der Probe E 08/14 < 5 µm	163
Abbildung 94: DGGE-Profile und klonierte DNA-Fragmente für <i>Alpha</i> - und <i>Deltaproteobacteria</i> der Probe E 08/14 >5 µm	166
Abbildung 95: Normalisierte DGGE-Profile der <i>Alpha</i> - und <i>Deltaproteobacteria</i> für Proben der Entnahmestelle (2 m Wassertiefe, Größenfraktion >5µm)	170
Abbildung 96: DGGE-Profile der <i>Alpha</i> - und <i>Deltaproteobacteria</i> für Proben der Entnahmestelle sowie der Vorsperre Forchheim der Größenfraktion < 5µm (A) und > 5 µm (B).....	173

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 97: DGGE-Profile der <i>Betaproteobacteria</i> ausgewählter Untersuchungsstellen (F, H, E) und – zeitpunkte in der Talsperre Saidenbach von 2013 bis 2015	176
Abbildung 98: Schema-tische Darstellung der Bindestellen der Primer mit Angabe der Bindestellen in <i>Cyanobium gracile</i> PCC 6307 (gi 485099050).....	178
Abbildung 99: DGGE-Profile für die Gattung <i>Synechococcus</i> Mai bis September 2015 mit Markierung sequenzierter Banden	179
Abbildung 100: Ausschnitt aus dem Alignment sequenzierter Banden aus Abbildung 99	180
Abbildung 101: Potentielle Sekundärstrukturen des DNA-Fragmentes von Bande 73/14, erstellt durch mfold (http://unafold.rna.albany.edu)	180
Abbildung 102: DGGE-Analyse des 16S rDNA-Fragmentes (<i>E.coli</i> -Pos. 359-518) aus Cyanobakterien-Reinkulturen	181
Abbildung 103: DotPlots der durchflusszytometrischen Analyse von Proben aller Untersuchungsstellen aus Juli und August 2015	186
Abbildung 104: Korrelationen des PC/PE-Verhältnisses mit Umweltfaktoren in 2 und 4m Wassertiefe der Untersuchungsstellen.....	188
Abbildung 105: Korrelationen der bakteriellen Gesamtzellzahl (PI-Färbung) mit den untersuchten Umweltfaktoren für Proben aus 2 m Wassertiefe aller Untersuchungsstellen und 20 m Wassertiefe der Stelle E	189
Abbildung 106: Vergleich der mittels CARD-FISH bestimmten Zellzahlanteile der <i>Betaproteobacteria</i> mit den entsprechenden Sequenzanteilen anhand der 16S Amplikosequenzierungsdaten	190
Abbildung 107: Korrelationen der Anteile der Hybridisierungssignale der <i>Betaproteobacteria</i> (Bet42a) an der Gesamtzellzahl mit den untersuchten Umweltfaktoren für Proben aus 2 m und 20 m Wassertiefe	191
Abbildung 108: Vergleich der mittels CARD-FISH bestimmten Zellzahlanteile der <i>Alphaproteobacteria</i> bzw. der LD12-clade mit den entsprechenden Sequenzanteilen anhand der 16S- Amplikosequenzierungsdaten	191
Abbildung 109: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S–Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der hgcl-clade innerhalb der Actinobacteria	200
Abbildung 110: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile abundanter OTUs der hgcl-clade (A) sowie Korrelationen der relativen Abundanzen mit Umweltfaktoren ($p < 0,05$) (B).....	201
Abbildung 111: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S–Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der <i>Chitinophagaceae</i> und unklassifizierter <i>Bacteroidetes</i>	203
Abbildung 112: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S–Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der <i>Sphingobacteriaceae</i>	204

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 113: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile der mit <i>Algoriphagus aquatilis</i> verwandten OTUs 38A und 24B (A) sowie Korrelationen der relativen Abundanzen mit Umweltfaktoren ($p < 0,05$) (B)	206
Abbildung 114: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S–Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der Gattung <i>Polynucleobacter</i>	208
Abbildung 115: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile von OTUs der Gattung <i>Polynucleobacter</i>	209
Abbildung 116: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile von Gattungen der <i>Comamonadaceae</i>	210
Abbildung 117: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S–Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der <i>Comamonadaceae</i>	212
Abbildung 118: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S–Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der <i>Methylophilaceae</i>	213
Abbildung 119: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile von <i>C. Methylopumilus planctonicus</i> und <i>C. Methylopumilus turicensis</i> (A) sowie Korrelationen mit Umweltfaktoren ($p < 0,05$) (B).....	214
Abbildung 120: Saisonale und lokale Variationen der Sequenzanteile von <i>C. Pelagibacter</i>	215
Abbildung 121: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S –Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der Verrucomicrobia	217
Abbildung 122: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile abundanter OTUs der Verrucomicrobia (A) sowie Korrelationen mit Umweltfaktoren ($p < 0,05$) (B)	218

V Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Cyanobakterien nach [82]; hervorgehoben Gattungen mit Relevanz für die Talsperre Saidenbach	17
Tabelle 2: Verwendung und Entnahmebedingungen für Wasserproben	23
Tabelle 3: Übersicht Chemische Analysen der Wasserproben.....	24
Tabelle 4: Optische Konfiguration des BD Accuri C6 Durchflusszytometers und detektierte Photopigmente bzw. verwendete DNA-Farbstoffe.....	25
Tabelle 5: Algengruppen und Photopigmente	27
Tabelle 6: Spektrale Gruppen von Organismen nach den vorherrschenden Photopigmenten, nach [98].	28
Tabelle 7: PCR-Ansätze	31
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten PCR-Programme	32
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Primer	33
Tabelle 10: Acrylamid-Stammlösungen für DGGE.....	35
Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele aus Acrylamid-Stammlösungen	35
Tabelle 12: PCR-Ansätze und -Programme zur Herstellung des DGGE-Standards.....	36
Tabelle 13: Ansatz und PCR-Bedingungen der Sequenzier-PCR.....	38
Tabelle 14: Für die Pyrosequenzierung verwendete Primer	39
Tabelle 15: Lösungen für CARD FISH	43
Tabelle 16: Verwendete Sonden und Spezifität	43
Tabelle 17: Thermische Schichtungsverhältnisse an den vier Untersuchungsstellen sowie die Tiefe des Metalimnions an der Entnahmestelle (E_M [m]) der Probenahmezeitpunkte.....	45
Tabelle 18: Mittel- und Extremwerte des Verhältnisses von Chlorophyll a-Konzentration zu Biovolumen für die spektralen Gruppen, unterschieden nach Probenahmestellen bzw. -monaten	68
Tabelle 19: Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman für gruppenspezifische und Gesamt-biovolumina und Chlorophyll a- Konzentrationen	71
Tabelle 20: Mittel- und Extremwertde der Zellzahlen von APP, PE-haltigen und PC-haltigen Picoplanktern an den Untersuchungsstellen- und tiefen 2013 bis September 2015.....	78
Tabelle 21: Korrelationskoeffizienten der Zellzahlen (Mikroskopie) und Eventzahlen (Durchflusszytometrie) für das APP	84
Tabelle 22: Übersicht über die mit GS FLX Titanium-Technologie sequenzierten Proben des Jahres 2013 (Anzahl Sequenzen, OTUs, coverage und Diversitätsindices)	102

V Tabellenverzeichnis

Tabelle 23: Übersicht über die mit GS FLX++ Titanium-Technologie sequenzierten Proben des Jahres 2012 und 2014 (Anzahl Sequenzen, OTUs, coverage und Diversitätsindices)	103
Tabelle 24: Erfassung phylogenetischer Gruppen durch die für die Pyrosequenzierung verwendeten Primer	104
Tabelle 25: Einfluss von Umweltfaktoren auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft auf Grundlage relativer Abundanzen von OTUs mit mindestens 2 Sequenzen	119
Tabelle 26: Taxonomische Identifikation von DGGE-Banden der Probe E 04/2013 <5µm nach Klonierung, Sequenzierung und Vergleich der Laufhöhen von Banden der Klone und Banden der Probe	129
Tabelle 27: Korrelation der Umweltparameter mit den DGGE-Profilen der bakteriellen Diversität Größenfraktion>5µm 2013 bis 2015	156
Tabelle 28: Korrelation der Umweltparameter mit den DGGE-Profilen der bakteriellen Diversität Größenfraktion<5µm 2013 bis 2015	159
Tabelle 29: Taxonomische Zuordnung der in Abbildung 91 markierten DGGE-Signale nach Datenbankabgleich mit rdp bzw SILVA.....	161
Tabelle 30: Taxonomische Einordnung der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Probe E 08/14 < 5 µm nach Datenbankabgleich mit rdp bzw SILVA.....	164
Tabelle 31: Taxonomische Einordnung der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Probe E 08/14 > 5 µm nach Datenbankabgleich mit rdp bzw SILVA.....	168
Tabelle 32: Taxonomische Zuordnung der in Abbildung 95 markierten DGGE-Signale nach Datenbankabgleich mit rdp bzw SILVA.....	170
Tabelle 33: Taxonomische Zuordnung der in Abbildung 88 markierten DGGE-Signale nach Datenbankabgleich mit rdp bzw. SILVA.....	174
Tabelle 34: Taxonomische Einordnung der aus dem Gel ausgeschnittenen DGGE-Signale (Abbildung 97)	177
Tabelle 35: Taxonomische Zuordnung der in Abbildung 100 markierten DGGE-Signale nach Datenbankabgleich mit SILVA	179
Tabelle 36: Zusammenhänge von Umweltparametern sowie Biovolumina von Phytoplanktongruppen und der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Vergleich zwischen Daten aus der 16S rDNA-Amplikonsequenzierung (454) und der DGGE spezifisch für <i>Bacteria</i>	195

1 Einleitung

1.1 Untersuchungsgewässer Talsperre Saidenbach

Talsperren können wichtige Rohwasserquellen für die Trinkwassergewinnung darstellen. Im Unterschied zu Seen weisen sie insbesondere eine kürzere Verweilzeit auf und sind in stärkerem Maße durch externe Stoffeinträge beeinflusst, da das Verhältnis des Einzugsgebietes zur Wasserfläche meist viel größer ist als für Seen und die Stoffzufuhr im Unterschied zu den grundwasserbeeinflussten Seen vorwiegend über oberirdische Zuflüsse erfolgt [1]. Veränderungen im Einzugsgebiet wirken sich daher auf Stauseen schneller aus und Effekte von Umweltveränderungen sind häufig eher zu beobachten [1], [2]. Darüber hinaus werden Talsperren stark durch Bewirtschaftungsmaßnahmen beeinflusst, so führen z. B. Stauspiegelabsenkungen im Rahmen der Niedrigwasserbewirtschaftung oder zum Hochwasserschutz häufig zu einer Trophieerhöhung [3]. Besonders Mittelgebirgstalsperren weisen eine stark gegliederte Uferlinie mit zahlreichen Nebenarmen und Buchten auf. Aus den Flachwasserbereichen werden schon bei geringen Stauspiegelabsenkungen durch Sedimenteintrag aus den Uferbereichen zusätzliche Nährstoffe eingebracht bzw. aus dem Sediment rückgelöst [4], [3]. Die Entnahme von Rohwasser bevorzugt aus dem Hypolimnion führt zu einer verstärkten Absenkung des Metalimnions und eine Ausweitung des Epilimnionbereiches, wodurch im Spätsommer größere Durchmischungstiefen erreicht werden können [4]. Eine weitere Folge der Trinkwasserentnahme aus dem Grundablass ist der Entzug von Wasserschichten mit vergleichsweise niedrigem Sauerstoffgehalt und höheren Konzentrationen an Nährstoffen wie Phosphat sowie Eisen und Mangan [5].

Die Talsperre Saidenbach nahe der Stadt Chemnitz wurde 1933 zur Trinkwasserversorgung angelegt und ist mit einer Wasserfläche von 1,42 km² der größte Stausee im mittleren Erzgebirge. Mit einem Fassungsvermögen von etwa 22 Millionen m³ ist Saidenbach der größte Wasserspeicher im Talsperrenverbund „Mittleres Erzgebirge“, durch den gemeinsam mit den Talsperren Einsiedel, Neunzehnhain I und II die Trinkwasserversorgung für Chemnitz und Südsachsen sichergestellt wird [6]. Das Einzugsgebiet der Talsperre Saidenbach ist durch landwirtschaftliche Nutzung dominiert (73 %) und weist eine Bevölkerungsdichte von 66 Einwohnern je km² auf (Stand 2001, [1]). Der im Mittelgebirge auf einer Höhe von 439 m ü NN gelegene dimiktische Stausee hat eine maximale Tiefe von 45 m und eine mittlere Tiefe von 15,3 m [6]. Die vier Hauptzuflüsse Saidenbach, Hölzelbergbach, Lippersdorfer Bach und Haselbach sind jeweils mit Vorsperren versehen. Die Aufenthaltszeit in den Vorsperren ist so bemessen, dass gelöste Nährstoffe aus den Zuflüssen durch Algenwachstum in Biomasse gebunden und anschließend durch Sedimentation aus der Wassersäule entfernt werden können [4]. Im Bereich der Stauwurzeln des

1 Einleitung

Saidenbaches und Haselbaches wurden durch Unterwasserstaumauern zusätzlich Unterwasservorsperren abgeteilt, in denen die etwas erhöhte Verweilzeit weitere Sedimentation von Algen und Schwebstoffen ermöglicht um den Nährstoffeintrag in das Hauptbecken zu reduzieren. Zudem verhindern die im Normalfall überstauten Unterwasserstaumauern bei Stauspiegelabsenkungen das Trockenfallen der Stauwurzeln, wodurch eine Resuspension von Sedimenten aus dem Stauwurzelbereich sowie ein schneller Bewuchs freiliegender Flächen verhindert werden [4].

In dieser Arbeit wurden Probenahmestellen in der Vorsperre Forchheim (F), im Haselbacharm in Fließrichtung vor (H) und nach (S) der Unterwasserstaumauer sowie nahe der Hauptstaumauer im Bereich der Entnahmestelle (E) untersucht (Abbildung 1).

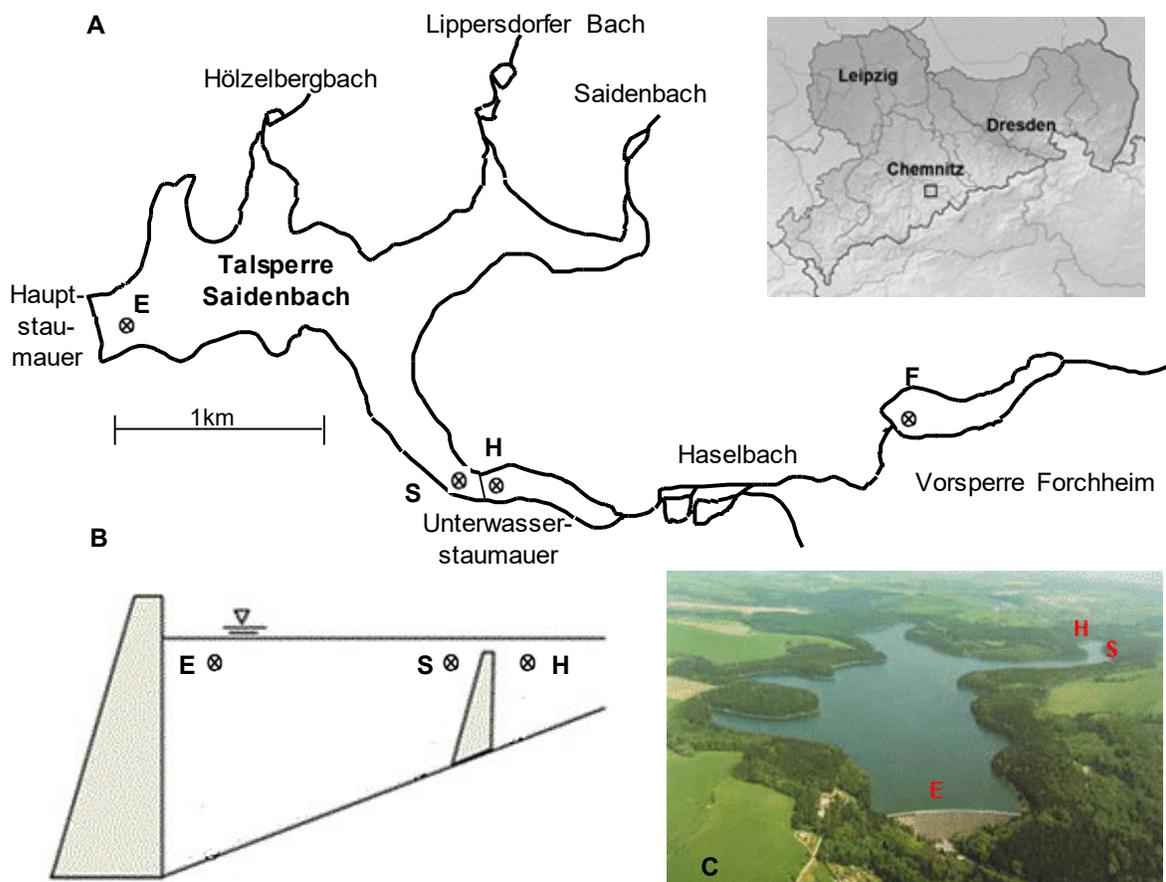


Abbildung 1: (A) Schematische Darstellung der Talsperre Saidenbach und der Vorsperre Forchheim mit den vier Probenahmestellen, (B) longitudinaler Schnitt durch die Talsperre (nicht maßstabsgerecht), verändert nach [7]; (C) Luftbildaufnahme der Talsperre Saidenbach mit den drei Probenahmestellen in der Hauptsperre; (Photo: R. Büschel, Schneeberg)

Nachdem die Talsperre Saidenbach durch Intensivierung der landwirtschaftlichen Produktion im Einzugsgebiet Ende der 70er Jahre einen eutrophen Zustand erreicht hatte, führten die Einführung

1 Einleitung

phosphatfreier Waschmittel im Jahr 1990 sowie zeitgleiche strukturelle Veränderungen der landwirtschaftlichen Bewirtschaftung im Einzugsgebiet dazu, dass sie seit 1991 wieder als mesotrophes Gewässer eingestuft werden konnte [1], [4].

Seit den 50er Jahren werden an der Talsperre Saidenbach verschiedene hydrophysikalische, hydrobiologische und ökologische Fragestellungen untersucht. 1974 wurde eine langfristige Untersuchungsstrategie konzipiert, entsprechend der seitdem auf Grundlage 14tägiger Probenahmen die Zusammenhänge zwischen Nährstoffhaushalt, Phytoplankton, Zooplankton und hydrophysikalischen bzw. meteorologischen Bedingungen analysiert werden [4]. Die detaillierten Untersuchungen umfassen Phyto- und Zooplankton, Chlorophyll, chemische Parameter (wachstumsrelevante Nährstoffe wie Phosphor, Stickstoff und Silizium sowie Sauerstoff, pH, Alkalinität) und hydrophysikalische Größen (Temperatur, Trübung, Leitfähigkeit). Meteorologische und hydrologische Daten werden von den Talsperrenbetreibern (Landestalsperrenverwaltung des Freistaates Sachsen) zur Verfügung gestellt. Eingebettet in dieses Untersuchungskonzept wird seit 2006 auch die mikrobielle Gemeinschaft des Sediments und die Sedimentchemie detailliert untersucht [8], [7]. In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft des Freiwassers in den verschiedenen Teilbereichen der Talsperre Saidenbach gelegt.

1 Einleitung

1.2 Bakterioplankton in Talsperren und Seen

1.2.1 Die Rolle des Bakterioplanktons in limnischen Ökosystemen

Als Plankton werden die im Pelagial (Freiwasser) von Gewässern schwebenden, vorwiegend durch die Strömung des Wassers bewegten, Organismen bezeichnet [9]. Taxonomisch werden die Organismen dem Phytoplankton, Zooplankton oder Bakterioplankton zugeordnet. Die jeweiligen Organismen treten in bestimmten Größenklassen auf, so zählen heterotrophe und chemoautotrophe Bakterien zum Picoplankton, welches Organismen der Größenbereiche 0,2 - 2 μm umfasst. Cyanobakterien, die aufgrund ihrer Phototrophie teilweise gemeinsam mit Phytoplankton behandelt werden (z.B. [10]), phylogenetisch aber zur Domäne *Bacteria* zählen, treten je nach Art als Pico-, Nano- (2 - 20 μm) oder Microplankton (20 - 200 μm) auf. Phytoplankter (eukaryotische Algen) kommen in den Größenklassen Nano-, Micro- und Mesoplankton (200 μm - 2 mm) vor. Die bakterielle Biomasse erreicht in limnischen Ökosystemen oft 30 % der Phytoplanktonbiomasse, wobei der Anteil umso höher ist, je stärker oligotroph der Standort ist [11]. Die bakteriellen Gesamtzellzahlen liegen im Bereich von 10^4 – 10^8 Zellen/ml, in oligotrophen Gewässern $< 1,7 \cdot 10^6$ Zellen/ml, mesotrophen Gewässern $1,7$ - $6,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml und eutrophen Gewässern $> 6,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml [11]. Metabolisch aktiv ist oft nur ein geringer Anteil der Zellen, z.B. ca. 22 %, wobei sehr starke Schwankungen je nach Produktivität der untersuchten Ökosysteme auftreten [11].

Verschiedene biotische und abiotische Faktoren haben Einfluss auf die bakterielle Gesamtbiomasse

sowie auf die taxonomische Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft. Zu den abiotischen Einflussfaktoren zählen u.a. Temperatur, pH-Wert, Salinität, Sauerstoffgehalt und Redox-Potential, Lichtverhältnisse. Diese Faktoren wirken einerseits direkt auf die mikrobielle Gemeinschaft und andererseits indirekt über die Art und Verfügbarkeit von Nährstoffen (Abbildung 2).

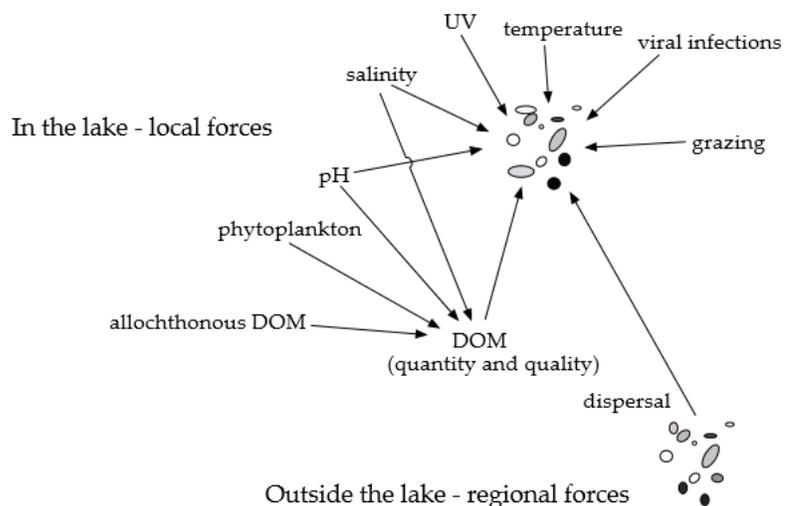


Abbildung 2: Auswahl biotischer und abiotischer Einflussfaktoren auf das Bakterioplankton, aus [12]

1 Einleitung

Die Regulation der Bakterienbiomasse im planktischen Nahrungsnetz erfolgt durch das Nährstoffangebot („bottom up“, [13]) und durch den Einfluss von Predatoren („top down“, [14]). Neben anorganischen Nährstoffen für chemoautotrophe Bakterien bildet das Phytoplankton die wesentliche Substratquelle für heterotrophe Bakterien durch während der Photosynthese ausgeschiedene gelöste organische Substanzen sowie abgestorbene Phytoplanktonbiomasse selbst [11]. Je nach Enzymausstattung unterscheiden sich die Effizienz der Nährstoffaufnahme sowie die Aufnahmefähigkeit der Bakteriengruppen für verschiedene Nährstoffe, sodass das Nährstoffangebot vor allem Auswirkungen auf die taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft hat. Die Gesamtbio­masse der Bakterien weist im Jahresverlauf im Vergleich zur Phytoplanktonbiomasse geringe Schwankungen auf [15]. Aufgrund des in planktischen Ökosystemen meist bestehenden Nährstoffmangels dominieren kleine Zellgrößen [16], so weist der Hauptanteil der Bakterienzellen Zellgrößen $< 1,5 \mu\text{m}$ (Zellvolumen $< 0,3 \mu\text{m}^3$) auf, oft sind sogar die als Ultramicrobacteria bezeichneten Zellen mit Zellgrößen $< 0,1 \mu\text{m}^3$ dominant [17].

Für Bakterien relevante Predatoren sind vor allem Protisten und heterotrophe Nanoflagellaten sowie Viren [18]. Viele bakteriovore Organismen z.B. *Ochromonas* sind grö­ßen­selektiv, sodass bakterielle Strategien zur Vermeidung der Erfassung durch diese Organismen auf eine Veränderung ihrer Zellgröße abzielen. Für zahlreiche Vertreter typischer Süßwasserbakterien in unterschiedlichen Phyla wurde unter Fraßdruck eine Verringerung oder Steigerung der Zellgröße nachgewiesen (u.a. [18], [19]) sowie die Bildung bestimmter Zellformen, die geeignet sind, die Ingestion durch Flagellaten zu erschweren, z.B. länglicher Zellen durch Vertreter der *Alphaproteobacteria* und *Bacteroidetes* [20], [21] (Abbildung 3).

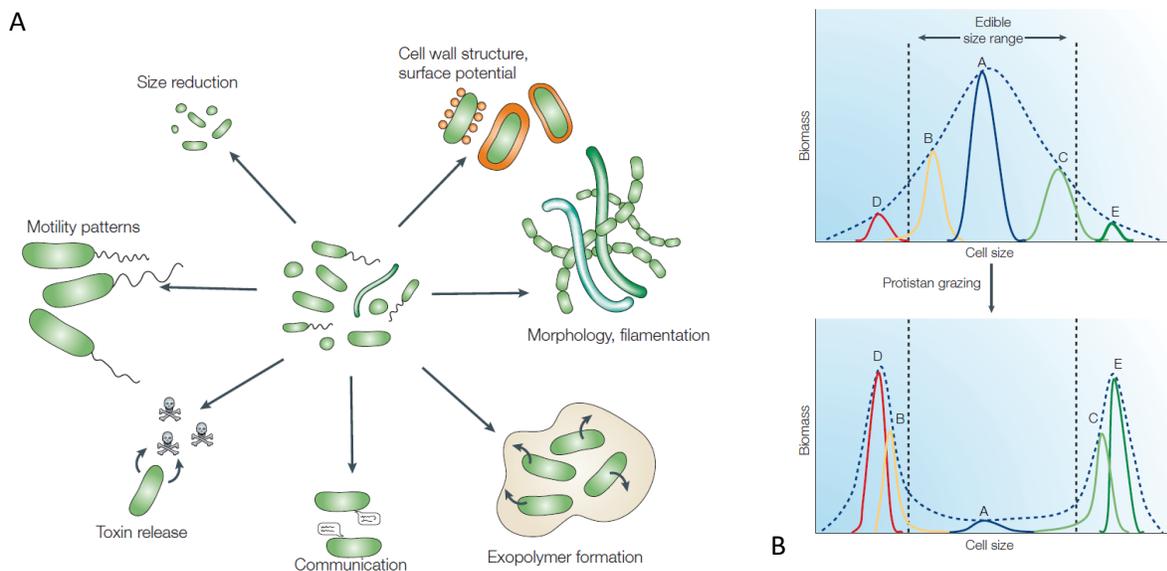


Abbildung 3: (A) bakterielle Strategien zur Fraßvermeidung durch unterschiedliche Predatoren; (B) Auswirkungen größen­selektiver bakteriovorer Organismen auf die Zellgrößenstruktur; aus [22]

1 Einleitung

Die Art der Anpassungsstrategien hängt auch von weiteren Umweltfaktoren ab, so wurde z.B. in kontinuierlichen Kulturen mit Fraßdruck durch heterotrophe Nanoflagellaten unter Phosphat-limitierten Bedingungen die Bildung großer filamentöser Zellen beobachtet, während unter Kohlenstoff-Limitation eher kleine bewegliche Zellen ausgebildet wurden [23]. Eine weitere Strategie besteht im Zusammenschluss von Zellen zu größeren Einheiten, z.B. Filamenten, Ketten oder anderen Aggregaten die insgesamt die Fraßorganismen in ihrer Größe übertreffen und so die Einzelzelle vor Fraß schützen [20]. Durch die unterschiedlichen Anpassungsstrategien der verschiedenen taxonomischen Gruppen des Bakterioplanktons wirkt sich das Auftreten saisonal unterschiedlicher Predatoren deutlich auf die taxonomische Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft im Pelagial aus [18], [21].

Untersuchungen der bakteriellen Gemeinschaft von Süßwasserhabitaten zeigen, dass bestimmte Linien innerhalb der Phyla in den unterschiedlichen limnischen Ökosystemen dominant auftreten, es werden global vorkommende Süßwasservertreter unter den pelagischen Bakterien beschrieben [24], [15], [25]. Diese phylogenetischen Linien treten vor allem in den Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Alpha-* und *Betaproteobacteria* sowie *Cyanobacteria* auf. Die Kombination der verschiedenen Umweltfaktoren steuert die taxonomische Zusammensetzung der Bakterioplanktongemeinschaft je nach den ökologischen Eigenschaften der taxonomischen Gruppen. Dadurch ergeben sich lokale Unterschiede der Populationen verschiedener Gewässer sowie saisonale Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft. Bei Talsperren spielen im Unterschied zu Seen noch Effekte der Bewirtschaftung eine Rolle, wie z.B. kürzere Verweilzeiten, Rohwasserentnahme verbunden mit dem selektiven Abzug des sauerstoffarmen, kalten Tiefenwassers und Stauspiegelschwankungen. Bei weitem die meisten Untersuchungen des Bakterioplanktons limnischer Ökosysteme beziehen sich auf Seen. Darüber hinaus ist jedoch vor allem unter Nutzungsaspekten von Interesse, welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede die bakterielle Gemeinschaft und ihre Dynamik in Talsperren mit ihren morphologischen und bewirtschaftungsbedingten Charakteristika aufweist.

1.2.2 Actinobacteria

Actinobacteria stellen neben *Betaproteobacteria* oft die numerisch bedeutendste Gruppe in Epilimnia von Süßwässern dar [15], [26] und wurden in hohen Abundanzen in Süßwasserökosystemen weltweit nachgewiesen (u.a. [26], [24], [17], [27], [28], [29]). In Süßwasserökosystemen vorkommende *Actinobacteria* werden nach Warnecke et al. (2004) in vier Gruppen eingeteilt (AcI-AcIV), von denen Vertreter der AcI-Linie meist die höchste Abundanz in Epilimnia von Süßwässern der gemäßigten Breiten

1 Einleitung

aufweisen [30], [28]. Ein Großteil der in der Acl-Linie zusammengefassten Vertreter zählt zum hgcl-cluster [15], einem monophyletischen Süßwassercluster der *Actinobacteria* [26], (Abbildung 4).

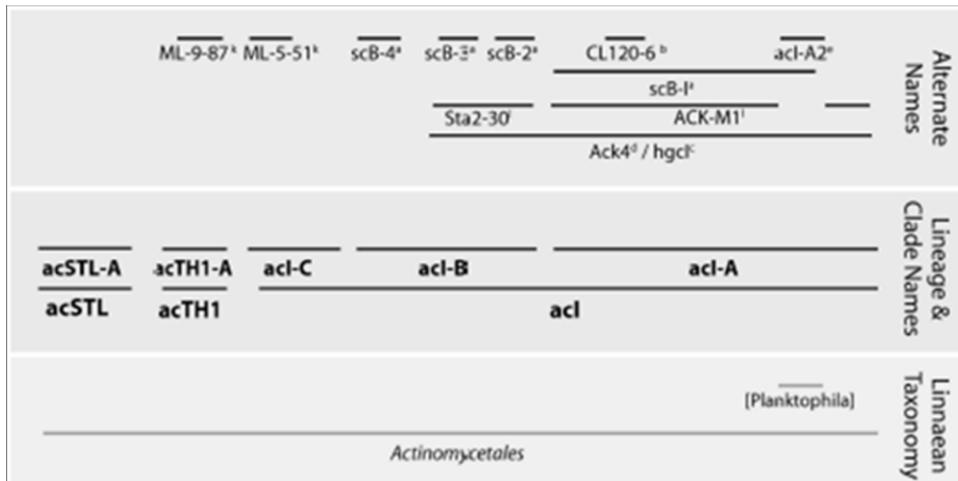


Abbildung 4:
Taxonomische
Einordnung des
hgcl-clusters
(Actinobacteria),
aus [15]

Weitere häufige Süßwasservertreter der Actinobacteria gehören zu den clustern Luna I und II innerhalb des AclI-clusters ([15], [25]).

Als Einflussfaktoren auf die Population der *Actinobacteria* wurden verschiedene biotische und abiotische Faktoren diskutiert, wie pH-Wert ([31], [28]), DOM [32], grazing [19]. Allgaier und Kollegen (2007) konnten Einflüsse von Umweltparametern auf die *Actinobacteria*-Population in verschiedenen Seen nachweisen, jedoch waren in verschiedenen Seen unterschiedliche Umweltparameter von Bedeutung und es konnten keine allgemeingültigen Einflussfaktoren auf die Population der *Actinobacteria* festgestellt werden [33]. Newton und Kollegen (2007) untergliederten die Acl-lineage weiter in 11 monophyletische clades. Vertreter der einzelnen clades traten gehäuft in Seen unterschiedlicher pH-Werte auf, sodass nach den Autoren der pH-Wert den wesentlichen Umweltfaktor für die Zusammensetzung der Acl-Gruppe in einem Gewässer darstellt [28]. Nach [15] bestehen meist nur geringe saisonale Schwankungen der Biomasse und Abundanz der *Actinobacteria* insgesamt. Eventuell werden Reaktionen auf Umweltbedingungen erst ab einer höheren phylogenetischen Auflösung sichtbar, wie die Untersuchungen von Newton und Kollegen (2007) zeigen.

Ein wichtiger Aspekt der Ökologie der *Actinobacteria* ist ihre geringe Zellgröße ($<0,1\mu\text{m}^3$, [15]), wie sie auch für die Vertreter der häufigsten Gruppe (Acl) beschrieben wird [15] sowie für die cluster Luna I (AclI-B) und Luna II (AclI-D) [25]. Die Verringerung der Zellgröße führt zu einem geringeren Fraßdruck durch Protisten, es konnte gezeigt werden, dass unter erhöhtem Fraßdruck durch *Ochromonas sp.* der Anteil der Vertreter der Acl-Gruppe auf 60% anstieg [19].

1 Einleitung

In *Actinobacteria* wurde ein neuer Typ von Rhodopsingenen („Actinorhodopsin“-Gene) gefunden, deren Präsenz im Plankton unterschiedlicher Süßwasser sowie in kultivierten Vertretern von *Actinobacteria* nachgewiesen werden konnte [34]. Das Vorhandensein der Actinorhodopsingene wurde bisher für Vertreter der Acl-Linie sowie der Luna-Gruppe der *Actinobacteria* bestätigt [34], [35]. Wie aus Einzelzellstudien hervorgeht, verfügen 10-20% der Zellen des Süßwasserbakterioplanktons über Rhodopsingene, wobei ein hoher Anteil der Zellen auf die *Actinobacteria* entfällt [36].

Hinsichtlich der ökologischen Beziehung der *Actinobacteria* zu der zahlenmäßig ähnlich bedeutsamen Gruppe der *Betaproteobacteria* fanden Glöckner und Kollegen (2000) für den Gossenkollensee saisonal unterschiedliche Blütezeiten für beide Gruppen: Während *Betaproteobacteria* bei hohen Nährstoffangeboten dominant sind, können sich *Actinobacteria* mit geringeren Nährstoffeinträgen unter niedrigeren Temperaturen entwickeln [26]. Auch nach Yannarell & Kent (2010) erreichen die *Actinobacteria* ihre höchsten Abundanzen im Spätherbst und Winter und werden in Zeiten hoher Phytoplanktonproduktion durch Vertreter der *Betaproteobacteria* ersetzt [25]. Nach Newton und Kollegen (2011) führen hohe Nährstoffkonzentration zu einer relativen Verringerung der Abundanz der *Actinobacteria*, einen Grund dafür sehen die Autoren nicht in der Fähigkeit zur Nährstoffassimilation, die vergleichbar mit anderen Phyla ist, sondern in den Wachstumsraten, welche im Mittel bzw. unterhalb der andere im Süßwasser häufiger Phyla liegen [15]. Ghai und Kollegen (2014) untersuchten die Abundanz verschiedener Phyla in neun Metagenom-Datensätzen und stellten eine statistisch hochsignifikante negative Korrelation zur Abundanz von Cyanobakterien fest. Die Autoren führen dies auf hohe Nährstoffkonzentrationen zurück, die in den Gewässern im Rahmen dieser Untersuchung mit dem Auftreten von Cyanobakterien in Zusammenhang standen. Unter diesem hohen Nährstoffangebot sind *Actinobacteria* den Autoren zufolge kompetitiv gegenüber anderen Phyla benachteiligt [29], was sich mit der Einschätzung anderer Autoren [15] deckt. Ähnliches wird für erhöhte Temperaturen abgeleitet, welche ebenfalls zu einer Förderung von Cyanobakterien beitragen, gleichzeitig aber zu einer relativen Benachteiligung von *Actinobacteria* gegenüber anderen Phyla führt [29]. Der negative Zusammenhang zum Auftreten von Cyanobakterien hat demnach keine direkten Ursachen, wie eine direkte Interaktion zwischen den Vertretern der Phyla, sondern ist auf indirekt wirkende Faktoren zurückzuführen, wie z.B. ein hohes Nährstoffangebot. In der mesotrophen Talsperre Saldenbach sind diese Bedingungen jedoch, bis auf kurzfristige Nährstofffrachten durch Abspülung bei Starkregen oder in Folge von Baumaßnahmen an Gewässern im Einzugsgebiet, nicht gegeben.

1 Einleitung

Insgesamt besiedeln die Vertreter des Phylums *Actinobacteria* in hoher Abundanz ein sehr breites Spektrum unterschiedlich charakterisierter Süßwässer weltweit, ihre zahlenmäßige Bedeutung in den verschiedenen Süßwässern ist dabei ähnlich. Sie sind eher unter oligotrophen Verhältnissen konkurrenzfähig, da sie trotz effizienter Nährstoffaufnahme mittlere Wachstumsraten aufweisen [29], [15], [25]. Veränderung der Population als Reaktion auf Umweltfaktoren (insb. pH-Wert) bzw. saisonale Veränderungen werden möglicherweise erst auf phylogenetischen Ebenen unterhalb der Gruppen (z.B. Ebene der clades von Acl [28]) erkennbar.

1.2.3 Proteobacteria

1.2.3.1 *Alphaproteobacteria*

Alphaproteobacteria stellen im marinen Pelagial die numerisch bedeutendste Gruppe dar, in Süßwasserökosystemen sind sie weniger abundant, jedoch ubiquitär vorhanden [15], [37]. Die zahlenmäßig bedeutendste Gruppe der *Alphaproteobacteria* in Süßwässern ist eine Schwestergruppe der im marinen Bereich dominanten SAR11 clade, erstmals beschrieben durch Bahr und Kollegen (1996) [38] und später als LD12 cluster bezeichnet [24]. Aktuell (03/2018) werden die 16S-Sequenzen von LD12-Vertreter in der Datenbank rdp als *Candidatus Pelagibacter* innerhalb der *Pelagibacterales* klassifiziert [39]. Für die Vertreter des LD12 clusters wird eine ausgeprägte Saisonalität beschrieben mit geringeren Abundanzen in Zeiträumen mit hoher Phytoplanktonproduktion und vorwiegend organischen Nährstoffen und stärkeren Wachstumspulsen bei Vorliegen vorwiegend anorganischer Nährstoffe [40]. Studien zur Aufnahme verschiedener niedermolekularer organischer Nährstoffe ergaben für das LD12 cluster eine deutliche Präferenz für Glutamin und Glutamat [41]. Die höchsten Anteile der LD12-Vertreter an der bakteriellen Gemeinschaft wurden im Sommer und Spätherbst registriert [40]. Lindström und Kollegen (2005) fanden darüber hinaus anhand vergleichender Studien verschiedener Seen positive Zusammenhänge der LD12-Abundanzen mit höheren Wassertemperaturen und Retentionszeiten [31]. Nach Salcher und Kollegen (2011) zeichnen sich die LD12-Vertreter durch langsame aber effiziente Nährstoffaufnahme bei niedrigen Nährstoffkonzentrationen aus und sind damit ähnlich wie die marine Schwestergruppe an oligotrophen Verhältnissen angepasst [37].

Weitere typische Süßwasservertreter der *Alphaproteobacteria* gehören zu den Genera *Sphingomonas* (alfIII [26]), *Novosphingobium*, *Sphingopyxis* (alfIV Novo-A1 bzw. -A2, [26]), *Caulobacter* und *Brevundimonas* (alf II [26]). Weitere regelmäßig in Süßwasserhabitaten gefundene Gattungen sind *Roseomonas* (*Rhodospirillales*), *Rhodobacter* (*Rhodobacterales*) sowie verschiedene Genera der *Rhizobiales* (alfI [26]) [15]. Eine Überarbeitung der Phylogenie der *Alphaproteobacteria* unter

1 Einleitung

Einbeziehung von 23SrDNA-Sequenzen ergab die in Abbildung 5 dargestellten Verwandtschaftsverhältnisse mit der neu vorgeschlagenen Unterteilung in drei Unterklassen [42].

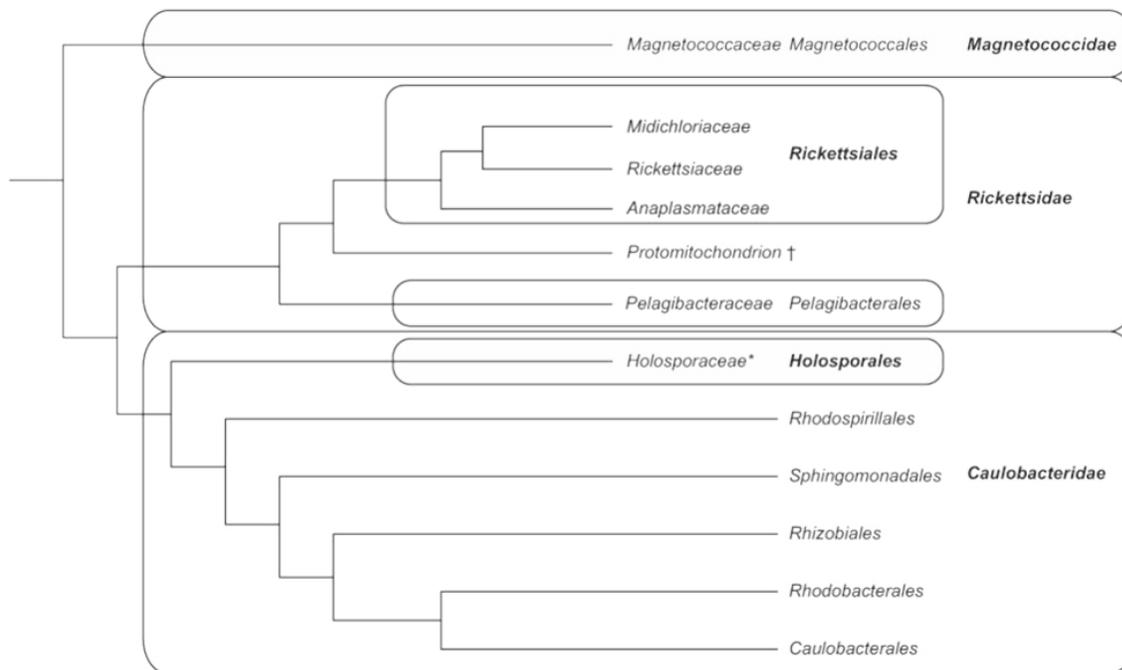


Abbildung 5: vorgeschlagene Unterklassen der Alphaproteobacteria basierend auf 16S- und 23S rDNA Sequenzen nach [40]

Eine Zunahme der Abundanz von *Alphaproteobacteria* unter erhöhtem Fraßdruck wurde in mehreren Studien gezeigt, typischerweise veränderten sich die vorherrschenden Zellformen dabei hin zu vergrößerten stäbchenförmigen Zellen, die zu groß für eine Erfassung durch die Predatoren sind [43], [44], [45]. Die Organismen des LD12 clusters werden jedoch als Ultramicrobacteria mit Zelldurchmessern $< 1 \mu\text{m}$ beschrieben [37], [41] [40].

1.2.3.2 Betaproteobacteria

Betaproteobacteria stellen im Süßwasserbakterioplankton eine der häufigsten Bakteriengruppen dar. Vor allem die Familie der *Comamonadaceae* (*Burkholderiales*) enthält zahlreiche Gattungen mit typischen Süßwasservertretern (u.a. *Acidovorax*, *Albidiferax*, *Delftia*, *Limnohabitans*, *Polaromonas*, *Pseudorhodiferax*, *Rhodiferax*, *Variovorax*), die trotz ihrer hohen Sequenzähnlichkeit der 16S rDNA von 93-97 % eine hohe physiologische Diversität aufweisen [46]. Zu den typischen Süßwasserclustern innerhalb der *Betaproteobacteria* zählen Pnec (betII (*Polynucleobacter necessarius*-cluster)) sowie Lhab/bet I (*Limnohabitans* und *Rhodiferax* (*Comamonadaceae*)) und LD28 (Beta IV, *Methylophilaceae*) (Abbildung 6).

1 Einleitung

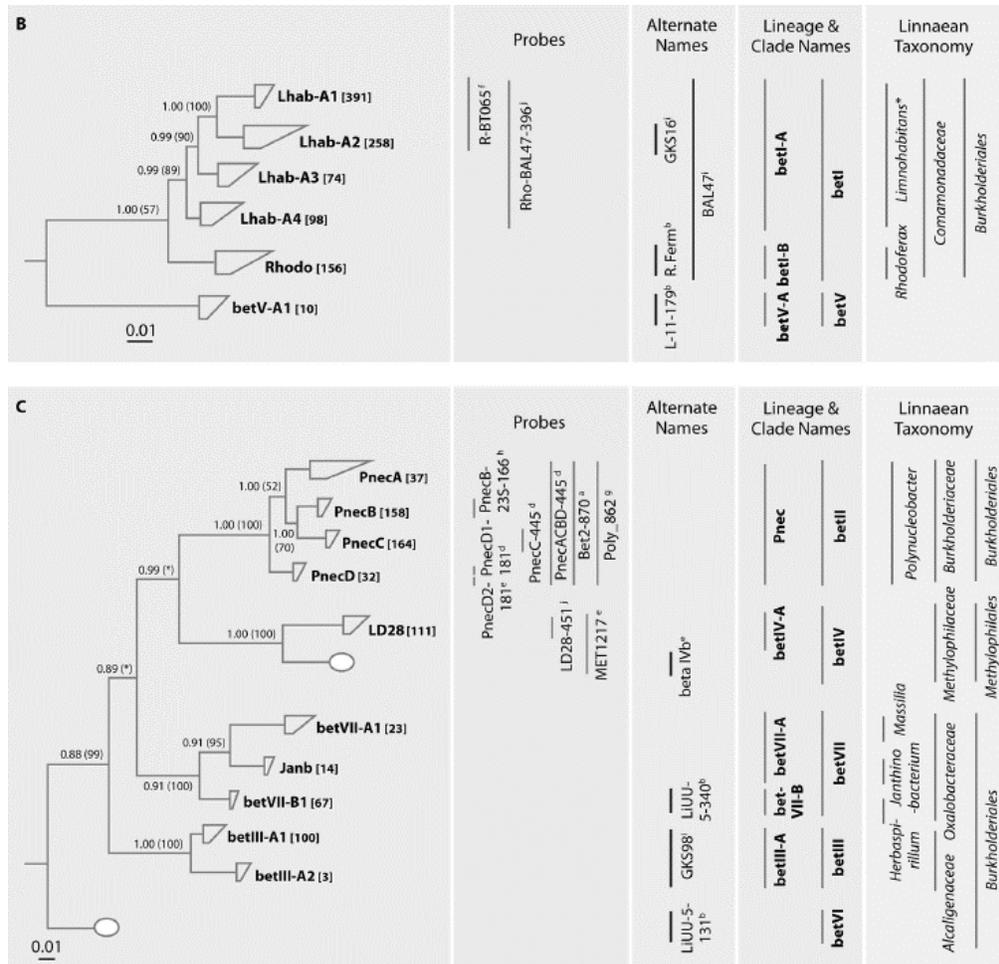


Abbildung 6: Übersicht über Gruppen und taxonomische Einheiten der *Betaproteobacteria*, aus [15]

Kasalicky und Kollegen schlagen über die in Abbildung 6 gezeigten phylogenetischen Verhältnisse hinaus für die verbreitete Gattung *Limnohabitans* eine Untergliederung in die Cluster LimA (Lhab-A3) bis LimE vor, wobei die Mitglieder der Cluster LimB (Lhab-A1) bis LimE durch die verbreitete FISH-Sonde R-BT065 erfasst werden. Zur diversesten Linie Lim C (Lhab-A1) zählen die Arten *L. parvus* und *L. planctonicus*, während das Cluster LimA u.a. durch *L. curvus* und *L. australis* charakterisiert wird [47]. Ökologische Untersuchungen beziehen sich häufig auf die entsprechend der gleichnamigen FISH-Sonde als R-BT065 Cluster oder kurz R-BT Cluster bezeichnete Kerngruppe des Genus *Limnohabitans* und weisen deren Mitglieder als weit verbreitet im Pelagial verschiedenster Süßwasserökosysteme aus, insbesondere in huminstoffarmen Gewässern mit pH-Werten im neutralen bis leicht alkalischen Bereich [48]. Die coccalen, sichel- oder stäbchenförmigen Zellen zeigten signifikant höhere Zellvolumina als andere Bakteriengruppen in verschiedenen Süßwasserhabitaten [47]. Das R-BT065 Cluster ist charakterisiert durch die Fähigkeit zur schnellen Anpassung an veränderte Umweltbedingungen, deutlichen positiven Zusammenhang zu hohen Phytoplanktonbiomassen und einer erhöhten Sensitivität für Fraß durch Flagellaten [48], [49], [50], [43], [44]. Studien zur Aufnahmefähigkeit von Bakteriengruppen für verschiedene organische Substrate zeigten,

1 Einleitung

dass die Vertreter des R-BT clusters eine Vielzahl der untersuchten Substrate aufnehmen können, was zu ihrer Anpassungsfähigkeit an wechselnde Umgebungsbedingungen beiträgt [41].

Innerhalb der Gattung *Polynucleobacter* werden vier monophyletische subcluster unterschieden (PnecA-D). Für jedes der cluster wurden Isolate freilebender Bakterien aus Seen gewonnen (*P. rarus* für PnecA [51], *P. acidiphobus* für PnecB ([52]), *P. necessarius subsp. Asymbioticus subsp. nov.* für PnecC ([53]), *P. cosmopolitanus* für PnecD ([54]). Die Vertreter von PnecB wurden in zahlreichen in neutralen bis alkalischen Seen nachgewiesen, nicht jedoch in Gewässern mit sauren pH-Werten oder erhöhter Salinität [55]. In huminstoffreichen Gewässern mit niedrigen pH-Werten wurden dagegen höhere Abundanzen von Vertretern des PnecC clusters festgestellt [56]. Untersuchungen aufeinanderfolgender Jahre zeigten für die PnecB-Population eine wiederkehrende saisonale Entwicklung mit einem Anstieg der Zellzahlen von März bis Juni oder Juli und darauffolgender Abnahme [55].

Für die als LD28 bezeichneten Methyloprophen wurde eine deutliche Saisonalität und differenzierte Verteilung im Gewässer gezeigt [57]: Im Frühjahr und Spätherbst wiesen sie parallel zur Hauptentwicklungszeit der Primärproduzenten die höchsten Abundanzen auf. Während des Sommers traten sie deutlich häufiger im Hypolimnion auf als in den wärmeren oberflächennahen Gewässerschichten und anhand kultivierter Vertreter konnte psychrophiles Wachstum für diese Gruppe bestätigt werden [57].

1.2.4 Bacteroidetes

Das Phylum *Bacteroidetes* ist gekennzeichnet durch eine sehr hohe morphologische und physiologische Diversität seiner Vertreter [15] [58], die in die drei Klassen *Bacteroidales*, *Flavobacteriales* und *Sphingobacteriales* untergliedert werden [59].

Bacteroidetes stellen oft einen hohen Anteil an partikel-assoziiert lebenden Bakterien, wogegen sie zahlenmäßig unter freilebenden Bakterien eine deutlich geringere Rolle spielen [60], [58]. Kultivierte Vertreter der *Bacteroidetes* verfügen über die Fähigkeit zum Abbau komplexer Biopolymere wie Chitin und Cellulose, die Mitglieder des Phylums spielen im Gewässer eine zentrale Rolle beim Abbau höhermolekularer organischer Substanzen [58]. Deutliche Steigerungen der Abundanz von Gruppen der *Bacteroidetes* (z.B. *Flavobacterium*) im Anschluss an Phytoplankton- bzw. Cyanobakterienmassenentwicklungen sowie positive Zusammenhänge mit hohen Kohlenstoffkonzentrationen in Süßwasserökosystemen wurden gezeigt [61], [62]. Darüber hinaus wurden höhere Anteile von

1 Einleitung

Bacteroidetes in Phasen verstärkter grazing-Aktivität nachgewiesen. Häufig wurden nach einer Phase verstärkter Beeinträchtigung der Population insbesondere filamentöse Zellen gebildet, die als Mitglieder der *Bacteroidetes* bzw. *Cytophaga-Flavobacterium* identifiziert wurden [44] [63] [64], [21]. Dabei dominierten oft Vertreter einer bestimmten phylogenetischen Linie die Population für kurze Zeit, wie z.B. die LD2 clade [63].

Das monophyletische SOL-cluster innerhalb der *Saprospiraceae* ist in zahlreichen Süßwasserhabitaten verbreitet [65], [66], [67] und bildet morphologisch charakteristische Filamente von 8-100 µm. Für die Abundanz der Gruppe wurde ein negativer Zusammenhang zu hoher Trophie und hohen pH-Werten gezeigt, wobei die Organismen in Gewässern mit pH<6 nicht auftreten. Die drei Subcluster LD2, HAL und GKS2-217 reagieren unterschiedlich auf bestimmte Umgebungsbedingungen, wobei der pH-Wert den stärksten Einfluss auf die Abundanzen zeigte [67]. Der bislang einzige kultivierte Vertreter ist *Haliscomenobacter hydrossis* (Subcluster HAL).

1.2.5 Verrucomicrobia und weitere Phyla

Verrucomicrobia sind in geringen Abundanzen (1-6% Sequenzanteile, [15]) jedoch in globaler Verbreitung als Bestandteil der mikrobiellen Gemeinschaft von Seen nachweisbar. Über ihre Ökologie ist noch wenig bekannt, unter anderem werden positive Zusammenhänge zwischen der Abundanz und Diversität von *Verrucomicrobia* und Phytoplanktonbiomasse sowie Cyanobakterien-Massentwicklungen beschrieben [68], [69] und höhere Abundanzen von *Verrucomicrobia* in huminstoffreichen Seen festgestellt [70]. Für einzelne Vertreter der *Verrucomicrobia* wurde ein Zusammenhang zu höheren Nährstoffkonzentrationen, insbesondere Phosphat, gefunden [71].

Weitere Phyla deren Vertreter zumeist in geringen Abundanzen aber in einer Vielzahl von Studien in Süßwässern nachgewiesen wurden, sind u.a. *Acidobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Nitrospira*, *Candidate division OP10*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes* und *Candidate division TM7* [15].

1 Einleitung

1.2.6 Cyanobacteria

1.2.6.1 Vorkommen, Ökologie und Physiologie

Fossilien belegen das Auftreten von Cyanobakterien vor 3,5 Millionen Jahren [72]. Als erste Organismen mit der Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese prägten sie während ihrer Ausbreitung im Präkambrium durch die Sauerstoffanreicherung der Erdatmosphäre wesentliche Umweltbedingungen für die Entwicklung der heutigen Organismen. Die Chloroplasten der heutigen Landpflanzen gehen auf einen Vorfahren der heutigen Cyanobakterien zurück, der durch Endosymbiose aufgenommen und als Zellorganelle mit der Fähigkeit zur Photosynthese in den Stoffwechsel des Organismus integriert wurde [73]. Darüber hinaus zählen einige Cyanobakterienarten zu der begrenzten Zahl von Organismen, die in der Lage sind Luftstickstoff zu binden und sie sind darunter die einzigen phototrophen Organismen mit dieser Fähigkeit. Mit ihrer langen evolutionären Entwicklung und vielfältigen Anpassungsstrategien sind Cyanobakterien heute integraler Bestandteil verschiedener terrestrischer und insbesondere aquatischer Ökosysteme. In jüngster Zeit treten weltweit zunehmend Probleme durch Massenentwicklungen von Cyanobakterien auf, die insbesondere in Zusammenhang mit anthropogenen Veränderungen der Gewässer und der klimatischen Bedingungen stehen [74]. Massenhaftes Auftreten von Cyanobakterien kann zu einer wahrnehmbaren Trübung des Gewässers führen und ihr Abbau eine starke Sauerstoffzehrung im Gewässer nach sich ziehen. Darüber hinaus können von den auftretenden Stämmen Sekundärmetabolite gebildet werden, die die Wasserqualität deutlich beeinträchtigen. Dazu zählen neben Geruchs- und Geschmacksstoffen insbesondere verschiedene Toxine. Massenentwicklungen von Cyanobakterien mit negativen Folgen für die betroffenen Ökosysteme durch Beeinträchtigung der Nahrungsnetzstruktur, Ausbildung von hypoxischen Verhältnissen oder Bildung toxischer Sekundärmetabolite werden als CyanoHABs („harmful algae blooms“) bezeichnet [75].

Zum Auftreten von Cyanobakterienmassenentwicklungen tragen verschiedene Umweltfaktoren in Kombination mit den physiologischen Eigenschaften der Cyanobakterien bei. Die Temperaturoptima für das Wachstum liegen mit meist $>20^{\circ}\text{C}$ bei Cyanobakterien über dem der meisten Algenarten [75], [76], sodass sie bei erhöhten Temperaturen höhere spezifische Wachstumsraten erreichen als andere Phytoplanktongruppen (Diatomeen, Grünalgen, Dinoflagellaten). Dieser Konkurrenzvorteil für Cyanobakterien unter erhöhten Temperaturen trägt zum bevorzugten Auftreten von Cyanobakterienmassenentwicklungen in den Sommermonaten bei.

1 Einleitung

Cyanobakterien verfügen neben Chlorophyll a über weitere Photopigmente wie Phycobiline und Carotinoide. Die Phycobiline Phycocyanin (PC) und Phycoerythrin (PE) sind typische akzessorische Photopigmente von Cyanobakterien. Diese Pigmente ermöglichen die Ausnutzung zusätzlicher Wellenlängenbereiche des Lichts (Abbildung 7).

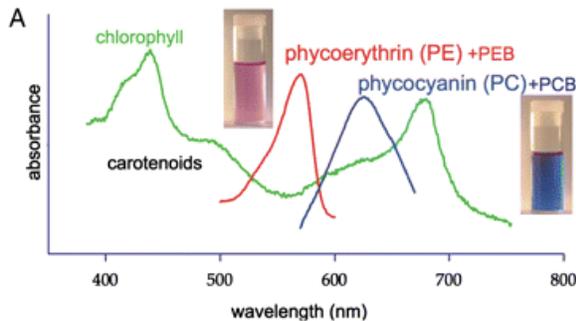


Abbildung 7: Absorptionsspektren der Phycobiline Phycocyanin und Phycoerythrin im Vergleich mit Chlorophyll, aus [77]

Die Pigmente sind im Phycobilisom angeordnet, wobei die äußeren Lichtsammelkomplexe PE oder PC sind, die Übertragung der Energie erfolgt über Allophycocyanin auf Chlorophyll a [77]. Viele Arten können die Zusammensetzung ihrer Antennenpigmente an den Phycobilisomen zudem je nach Lichtqualität und –intensität variieren und durch diese sogenannte chromatische Adaption noch besser an die herrschenden Lichtverhältnisse z.B. in verschiedenen Wassertiefen anpassen ([78], [77]). Durch die effizientere Ausnutzung des Lichts erreichen viele Cyanobakterienspezies unter geringen Lichtintensitäten höhere Wachstumsraten als eukaryotische Phytoplankter. Dies kann bei einer Trübung des Gewässers z.B. infolge von Starkregenereignissen zu einer bevorzugten Entwicklung der Cyanobakterien beitragen. Ebenso kann aber auch im Anschluss an eine durch die Massenentwicklung anderer Arten ausgelöste Trübung des Wasserkörpers eine Massenentwicklung von Cyanobakterien auftreten, da diese zunächst auch im Schatten anderer Phytoplankter wachsen können und ab einer bestimmten Trübung des Wasserkörpers durch bessere Ausnutzung des Lichts eine Dominanz erreichen [76]. Liegt im Wasserkörper eine hohe Zelldichte an Cyanobakterien vor, kann die Beschattung der unter Schwachlichtbedingungen weniger konkurrenzfähigen Phytoplanktonarten zu einer weiteren Stabilisierung der Dominanz der Cyanobakterien führen [76]. Die Fähigkeit zur Bildung intrazellulärer Gasvesikel ermöglicht es den Cyanobakterien, ihre Aufenthaltstiefe im Wasserkörper zu regulieren. Damit sind sie in der Lage, Zonen mit für sie optimalen Licht- und Nährstoffbedingungen aufzusuchen, was z.B. bei einer Trübung des Wasserkörpers oder während langanhaltender Phasen thermischer Schichtung mit sukzessivem Verbrauch von Nährstoffen einen Vorteil gegenüber anderen Phytoplanktern darstellt. Zudem fallen die Verluste durch Absinken gegenüber anderen Planktonorganismen deutlich geringer aus, wodurch in der euphotischen Zone weniger Konkurrenz um Ressourcen besteht. Dies begünstigt ebenfalls besonders während

1 Einleitung

langanhaltender Stagnationsphasen die Stabilität der Cyanobakterienpopulation und erklärt das vorwiegende Auftreten von Cyanobakterienblüten gegen Ende der Sommerstagnationsphase.

Die derzeitigen klimatischen Veränderungen führen mit ansteigenden Temperaturen und zunehmenden Extremwetterlagen (z.B. Starkregenereignissen) in aquatischen Systemen u.a. zu erhöhtem Sediment- und Nährstoffeintrag sowie zur Verlängerung und Stabilisierung der thermischen Schichtung in langanhaltenden Hitzeperioden. Aufgrund der physiologischen Eigenschaften der Cyanobakterien sind diese Veränderungen besonders geeignet, das Auftreten von Cyanobakterien und die Ausbildung von Massenentwicklungen zu fördern [74].

1.2.6.2 Taxonomie und Arteninventar der Talsperre Saldenbach

Die traditionelle Einteilung der Cyanobakterien erfolgt nach morphologischen Gesichtspunkten, wie der Zellgröße, -form und -organisation, der Ausbildung von speziellen Strukturen wie Heterocysten, Akineten oder intrazellulären Strukturen (Gasvesikel) unter Berücksichtigung von Vorkommen (planktisch, benthisch) und physiologischen Eigenschaften (Stickstoff-Fixierung, Bildung von Sekundärmetaboliten). Mit der Weiterentwicklung mikroskopischer Techniken kamen ultrastrukturelle Merkmale wie Formen und Anordnung der Thylakoide hinzu. Entsprechend wurden die traditionellen Subsections I bis V unterschieden [77]:

- Subsection I, Order Chroococcales
- Subsection II, Order Pleurocapsales
- Subsection III, Order Oscillatoriales
- Subsection IV, Order Nostocales
- Subsection V, Order Stigonematales

Subsection I umfasst einzellige Cyanobakterien, die sich durch Zweiteilung oder Knospung vermehren, im Unterschied zu den ebenfalls einzelligen Cyanobakterien in Subsection II, für die eine Mehrfachteilung unter Bildung von Baeocyten charakteristisch ist. In Subsection III werden filamentöse Cyanobakterien ohne Heterocysten zusammengefasst, die Subsections IV und V enthalten heterocystenbildende Arten, wobei die *Nostocales* durch eine Zellteilung in einer Ebene charakterisiert sind, während die *Stigonematales* zur Zellteilung in mehreren Ebenen und damit zur Bildung verzweigter Filamente befähigt sind [79].

1 Einleitung

Viele der traditionell nach morphologischen Gesichtspunkten gebildeten Ordnungen und Familien von Cyanobakterien entsprechen jedoch nicht den phylogenetischen Verhältnissen auf Grundlage der 16S rDNA-Sequenzen (u.a. [80], [81], [82], [83]). Die moderne Taxonomie orientiert sich an den Verwandtschaftsverhältnissen auf Grundlage der ribosomalen DNA (16S rDNA sowie ITS-Region) und bezieht ergänzend morphologische, ultrastrukturelle, physiologische und ökologische Kriterien ein. Dieser Ansatz wird als „polyphasic approach“ bezeichnet [84], [85]. Tabelle 1 zeigt die entsprechende Taxonomie nach [82] unter Kennzeichnung der für die Talsperre Saidenbach relevanten Gattungen.

Tabelle 1: Taxonomie der Cyanobakterien nach [82]; hervorgehoben Gattungen mit Relevanz für die Talsperre Saidenbach

Subsection I	Subsection II	Subsection III	Subsection IV	Subsection V
<i>Chamaesiphon</i>	<i>Cyanocystis</i>	<i>Arthrospira</i>	Anabaena	<i>Chlorogloeopsis</i>
<i>Chroococcus</i>	<i>Dermocarpella</i>	<i>Borzia</i>	<i>Anabaenopsis</i>	<i>Fischerella</i>
<i>Cyanobacterium</i>	<i>Stanieria</i>	<i>Crinalium</i>	Aphanizomenon	<i>Geitleria</i>
<i>Cyanobium</i>	<i>Xenococcus</i>	Geitlerinema	<i>Calothrix</i>	<i>Iyengariella</i>
<i>Cyanothece</i>	<i>Chroococciopsis</i>	<i>Halospirulina</i>	<i>Cyanospira</i>	<i>Nostochopsis</i>
<i>Dactylococcopsis</i>	<i>Myxosarcina</i>	Leptolyngbya	<i>Cylindrospermopsis</i>	<i>Stigonema</i>
<i>Gloeobacter</i>	<i>Pleurocapsa</i>	Limnothrix	<i>Cylindrospermum</i>	
<i>Gloeocapsa</i>		Lyngbya	<i>Nodularia</i>	
<i>Gloeothece</i>		<i>Microcoleus</i>	Nostoc	
Microcystis		<i>Oscillatoria</i>	<i>Rivularia</i>	
<i>Prochlorococcus</i>		Planktothrix	<i>Scytonema</i>	
<i>Prochloron</i>		<i>Prochlorothrix</i>	<i>Tolypothrix</i>	
Synechococcus		Pseudanabaena		
Synechocystis		<i>Spirulina</i>		
		<i>Starria</i>		
		<i>Symploca</i>		
		<i>Trichodesmium</i>		
		<i>Tychonema</i>		

Die Klassifikation der Datenbank **SILVA** orientiert sich an der Einteilung in Subsection I bis V nach [82] und untergliedert für einige davon noch eine weitere Ebene (family). Die für Saidenbach hauptsächlich relevanten Arten fallen jeweils in die Kategorie „family I“ der entsprechenden Subsection nach [82]. Die Ordnung *Chroococcales* der **NCBI-Klassifikation** entspricht in Bezug auf die enthaltenen Gattungen in etwa dem Inventar von Subsection I nach [82], darüber hinaus unterscheidet die NCBI-Taxonomie innerhalb der *Chroococcales* die Genera *Aphanothece*, *Cyanodictyon* und *Woronichinia*, die in Saidenbach regelmäßig nachgewiesen wurden [4]. Subsection III enthält viele der Arten, die in der Ordnung *Oscillatoriales* der NCBI-Taxonomie enthalten sind. Subsection IV entspricht in Bezug auf die für Saidenbach relevanten Gattungen den *Nostocaceae* der NCBI-Klassifikation.

Die Einteilung der **ribosomal database** orientiert sich an 16S rDNA-Stammbaum der Cyanobakterien in [82] und weist 13 Familien (Family I-XIII) und darin Genera aus. Für Saidenbach relevante Arten sind z.B. in folgenden Gruppen enthalten:

1 Einleitung

- family I, genus GpI (*Anabaena*, *Aphanizomenon*),
- family II, genus GpIIa (*Synechococcus*, *Microcystis*)
- family IV, genus GpIV (*Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Oscillatoria*)
- family V, genus GpV (*Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Oscillatoria*)
- family XI, genus GpXI (*Microcystis*)

Im Freiwasser der Talsperre Saidenbach dominierten bis 1986 die Gattungen *Aphanizomenon*, *Anabaena* und *Microcystis*, die in den Jahren 1987 bis 1994 durch *Aphanothece* und *Snowella* (ehem. *Gomphosphaeria*) abgelöst wurden, während seit 1995 vorwiegend *Cyanodictyon planctonicum* und *Aphanothece bachmannii* auftreten [4]. Die Änderung des Artenspektrums wird in Zusammenhang mit der Veränderung der Phosphatbelastung bzw. der Trophie der Talsperre gesehen und lässt den Schluss zu, dass die unter den aktuell geringen Phosphatgehalten dominanten Arten ausgeprägte Phosphat-Kompetitoren sind [4].

1.3 Phytoplankton – Arteninventar und Dynamik in der Talsperre Saidenbach

Die Abundanz und Zusammensetzung des Phytoplanktons in der Talsperre Saidenbach weist eine deutliche jahreszeitliche Sukzession auf [86], [4]: Die Frühjahrsmassenentwicklung ist von Diatomeen dominiert (*Aulacoseira italica*, *Asterionella formosa*, *Diatoma elongatum*, *Synedra acus*), gefolgt von einer schwächeren Entwicklung anderer Algen (z.B. *Chrysochromulina parva*, *Rhodomonas pusilla*, verschiedenen Grünalgen) oder ebenfalls Diatomeen im Frühsommer und Sommer. Ab dem Spätsommer treten Massenentwicklungen von Cyanobakterien auf (*Aphanothece bachmannii*, *A. clathrata*, *Snowella lacustris*) und bzw. oder von *Fragilaria crotonensis*. Verschiedenste biotische und abiotische Faktoren steuern die Phytoplanktodynamik wie Licht, Nährstoffe, Temperatur, *grazing* und Sedimentation. Diese Größen stehen wiederum in Zusammenhang mit den herrschenden Durchmischungsverhältnissen, die wesentlich durch klimatische Bedingungen gesteuert werden. Langzeituntersuchungen der Talsperre Saidenbach ergaben, dass aufgrund veränderter klimatischer Bedingungen der starke Rückgang der Phosphateinträge seit 1990 nicht zum erwarteten Rückgang der Phytoplanktonentwicklung und zur Re-oligotrophierung des Gewässers führte [87]. Wärmere Winter bedingen seit 1990 verlängerte Frühjahrsvollzirkulationen, die die Sedimentationsverluste der Diatomeen vermindern. Durch ihr langes Verbleiben und Wachstum in der euphotischen Zone können die vorhandenen Nährstoffreserven dementsprechend vollständig umgesetzt und hohe Phytoplanktonbiomassen gebildet werden. Je nach Witterungsverhältnissen wird die Frühjahrsmassenentwicklung entweder durch die sich ausbildende thermischen Schichtung verbunden mit Sedimentation der Diatomeen oder durch Aufbrauch der Nährstoffreserven während einer länger andauernden Vollzirkulation abgebrochen. Die so gesteuerte Nährstoffverfügbarkeit ist von entscheidender Bedeutung für die sommerliche Phytoplanktodynamik. Die bis 1990 im Sommer dominierende Diatomee *Fragilaria crotonensis* wird unter den verringerten Phosphatreserven durch Cyanobakterienarten abgelöst, welche stärkere Phosphatkompetitoren darstellen. Dazu zählen vor allem *Aphanothece bachmannii* und *Cyanodictyon planctonicum*, die seit 1995 die sommerliche Cyanobakterienpopulation dominieren, welche zuvor aus anderen Arten zusammengesetzt war (*Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Microcystis* bis 1986, *Aphanothece sp.* und *Snowella sp.* 1987-1994) [88]. Der Rückgang der Biomasse von *Fragilaria* wurde durch die Biomasseproduktion durch Cyanobakterien sogar überkompensiert, da diese in Perioden langanhaltender thermischer Schichtung zudem durch die Möglichkeit der aktiven Auftriebsregulierung begünstigt sind, die ihnen im Unterschied zu den stärker sedimentierenden Diatomeen ein Verbleiben in der euphotischen Zone ermöglicht. Höhere Wassertemperaturen begünstigen Cyanobakterien zusätzlich, die unter diesen Bedingungen oft höhere Wachstumsraten aufweisen als andere Phytoplankter.

1 Einleitung

1.4 Überblick über die angewendeten Methoden

Die Untersuchung des Phytoplanktons und des Bakterioplanktons in der Vorsperre Forchheim und verschiedenen Teilabschnitten der Talsperre Saldenbach erfolgte anhand von *in-situ*-Sondenmessungen, Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie sowie verschiedener molekulargenetischer Methoden. Die Quantifizierung und Differenzierung von Zellen bzw. Organismen mittels Durchflusszytometrie, Sondenmessungen sowie eines Teils der mikroskopischen Analysen basierte auf deren Pigmentzusammensetzung und morphologischen Eigenschaften. Ziel der molekulargenetischen Untersuchungen war die ribosomale RNA. Die ribosomale Nukleinsäure stellt aufgrund ihrer essentiellen Funktion als Bestandteil der Ribosomen und ihres ubiquitären Vorkommens in Zellen ein geeignetes Molekül zur Untersuchung der gesamten bakteriellen Population dar. Aufgrund dieser und ihrer evolutionären Eigenschaften ist die ribosomale RNA als Grundlage molekularökologischer Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften etabliert und insbesondere die 16S rDNA und die 23S rDNA werden als Basis für die Erstellung phylogenetischer Stammbäume verwendet. Für taxonomische und phylogenetische Untersuchungen ist die ribosomale RNA besonders geeignet, da ihre Gensequenz sowohl variable als auch konservierte Regionen enthält, sodass Untersuchungen auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen sowie unterschiedlich nah verwandter Organismen möglich sind: Während hochkonservierte Regionen, die in vielen Arten die gleiche Sequenz aufweisen, die Erfassung größerer taxonomischer Einheiten sowie die Erfassung phylogenetischer Beziehung zwischen weniger nah verwandter Organismen ermöglichen, können anhand variabler Regionen auch nah verwandte Arten unterschieden werden und Gruppen auf Gattungs- und Familien-Niveau erfasst werden (u.a. [89], Abbildung 8).

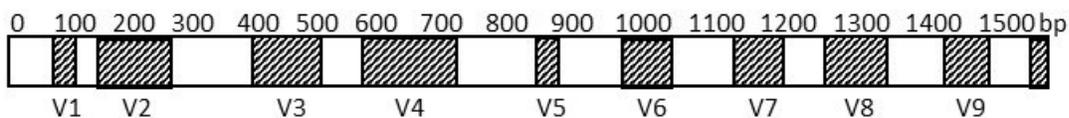


Abbildung 8: Schematische Darstellung der 16S rDNA mit hypervariablen Regionen V1-V9; aus: [90]

Anhand der in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Methoden können unterschiedliche Aspekte der Struktur und Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft untersucht werden. Durch die Sequenzierung von Bereichen der 16S rRNA (Klonierung, 16S-Amplikonsequenzierung) werden umfassende Informationen zu vorliegenden Arten und Artengruppen gewonnen, die auch Aussagen über phylogenetische Beziehungen ermöglichen. Molekulare Fingerprinttechniken wie die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) bilden die strukturelle Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft in einer Probe ab und ermöglichen so räumliche und zeitliche Vergleiche von Umweltproben. Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bietet neben der qualitativen und quantitativen Erfassung der

1 Einleitung

Zusammensetzung der Mikrobe­n­popu­la­tion ins­be­son­de­re die Mög­lich­keit der Ana­lyse der mikrobiellen Gemein­schaft in ihrer realen räumlichen Struktur, wobei z.B. auch mor­pho­lo­gische Eigen­schaften von Grup­pen oder Kon­sortien von Mikroorganismengruppen erkannt werden können.

1 Einleitung

1.5 Zielstellung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Analyse des Bakterioplanktons in der Talsperre Saidenbach und die Identifizierung von Einflussfaktoren auf seine Zusammensetzung. Dazu wird die mikrobielle Gemeinschaft im Freiwasser der Talsperre Saidenbach von 2013 bis 2015 monatlich in seiner saisonalen Entwicklung und hinsichtlich lokaler Unterschiede untersucht. Zur Quantifizierung und Differenzierung des Bakterioplanktons werden Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie, CARD-FISH, DGGE, Klonierung und 16S-Amplikonsequenzierung eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgt durch Korrelationsanalysen, Clusteranalysen und NMDS unter Einbeziehung hydrophysikalischer und hydrochemischen Parameter, meteorologischer Daten sowie der Daten zur Phytoplanktongemeinschaft.

In methodischer Hinsicht werden Verfahren zum Monitoring typischer Organismengruppen im Pelagial auf ihre Eignung hin untersucht: Die spektrofluorometrische Erfassung von Phytoplanktongruppen mit Hilfe einer Tauchsonde (bbe Moldaenke GmbH) wird anhand mikroskopischer Analysen des Phytoplanktons (Dr. H. Horn) validiert. Die Eignung der Durchflusszytometrie zu Ermittlung der bakteriellen Gesamtzellzahl und zur Quantifizierung des autotrophen Picoplanktons differenziert nach den vorherrschenden akzessorischen Photopigmenten (Phycocyanin oder Phycoerythrin) wird ebenfalls anhand mikroskopischer Zählungen überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Probenahme

Zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft im Freiwasser der Saidenbachtalsperre wurden während der eisfreien Zeit im Abstand von vier Wochen Wasserproben genommen. Dabei wurden jeweils vier Probenahmepunkte in Fließrichtung (Vorsperre Forchheim, vor (H) und nach (S) der Unterwassermauer im Haselbacharm und vor der Hauptstaumauer (E)) beprobt (Abbildung 1). Für alle Probenahmestellen und Analysen wurden Wasserproben aus 2 m Tiefe entnommen, darüber hinaus wurden für einige Untersuchungen weitere Wassertiefen beprobt (Tabelle 2). Zur Entnahme von Wasserproben aus den jeweiligen Wassertiefen wurde ein Wasserschöpfer nach Ruttner (HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH, Kiel-Holtenau, D) verwendet. Die Wasserproben wurden gekühlt und dunkel transportiert und bei 4°C gelagert. Die Filtration der Wasserproben erfolgte spätestens am Folgetag.

Tabelle 2: Verwendung und Entnahmebedingungen für Wasserproben

Verwendung	Untersuchungsstelle und Wassertiefe	Probennahmemenge und -bedingungen
DNA-Isolation und molekularbiologische Untersuchungen; CARD-FISH	E: 2m, Metalimnion, 20m; Netzzug (nur DNA) F, H, S: 2m	1l Glasflasche; Netzzug mit Netz Porenweite 0,54mm
Durchflusszytometrie (Bestimmung Gesamtzellzahl, Zellzahl APP)	E: 2m, 4m, 6m, Metalimnion, 20m, 30m, 35m F, H und S jeweils 2m und 4m	15 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D)
Epifluoreszenzmikroskopische Quantifizierung APP	E: 2m, 4m, 6m, Metalimnion, 20m F, H, S: jeweils 2m und 4m	100ml getönte Glasflaschen, Fixierung 2,7ml Formalin (37%)
2014: mikroskopische Quantifizierung Phytoplankton	E 2m, 4m, 6m, 20m, 30m F, H, S: 2m	50ml Glasschliffflaschen, Fixierung mit Lugolscher Lösung
Chemische Analytik	E: 2m, 4m, Metalimnion, 20m F, H, S: 2m	50 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D)

An allen Probenahmepunkten wurden chemisch-physikalische Parameter (Sauerstoffgehalt, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Temperatur, Chlorophyll a-Konzentration) der Wassersäule in Abständen von einem Meter ermittelt (OXI 197-S; pH 197-S; LF 197-S, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, D., microFlu-Chl, TriOS Science GmbH, Rastede, D.) sowie die Sichttiefe mit Hilfe einer Secchi-Scheibe bestimmt. Von April bis November 2014 wurde das Tiefenprofil des Phytoplanktons differenziert nach verschiedenen Gruppen (Diatomeen, Grünalgen, Cyanobakterien, Cryptophyta) mit Hilfe der FluoroProbe-Sonde der Firma bbe Moldaenke GmbH (Schwentinental, D) aufgenommen und parallel dazu die Biovolumina der Phytoplanktonarten in distinkten Tiefen mikroskopisch bestimmt (Methode nach Utermöhl, Dr. H. Horn, Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig). Die durchflusszytometrischen Analysen (Accuri C6, BD Biosciences, New Jersey, USA) zur Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie von Cyanobakteriengruppen erfolgten noch am Probenahmetag.

2 Material und Methoden

Meteorologische Daten wie Globalstrahlung, Lufttemperatur, Niederschlagsmenge, sowie Zu- und Abflussmengen der Talsperre Saidenbach und Vorsperre Forchheim wurden von der Landestalsperrenverwaltung Sachsen, der Ökologischen Station Neunzehnhain der TU Dresden sowie dem Sächsischen Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (Agrarmeteorologisches Messnetz Sachsen, Station Forchheim) bezogen.

2.2 Chemische Analytik

Chemische Analysen (P, NO₃, NH₄, SO₄, DOC, Fe, Mn) der Wasser- und Sedimentproben wurden entsprechend der in Tabelle 3 aufgelisteten Vorschriften von H. Herrling (SAW) durchgeführt.

Tabelle 3: Übersicht Chemische Analysen der Wasserproben (nach Filtration mit 0,45µm Cellulose - Acetat Filtern, Whatman GmbH, Dassel, D)

Parameter	Analyseverfahren
Sulfat (SO ₄ -S) Nitrat (NO ₃ -N) Nitrit (NO ₂ -N)	nach DIN EN-ISO-10304-21 mit Ionenchromatograph Dionex ICS 3000 (Thermo Fisher GmbH, Idstein, D.)
Chlorid (Cl ⁻)	nach DIN EN-ISO-10304-21 mit Ionenchromatograph Dionex ICS 3000 mit Trennsäule AS 9 für Anionen
Acetat (CH ₃ COO ⁻)	nach DIN EN-ISO-10304-21 mit Ionenchromatograph Dionex ICS 3000 mit Trennsäule AS 1 für Fettsäuren (C ₁ -C ₆)
Gelöstes Eisen (D-Fe) Gelöstes Mangan (D-Mn)	AAS-Flamme (Varian Spectra 220 FS, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG)
DIC/DOC/DTC	nach DIN 38409-H3-1 mit liquiTOC-Analyzer (elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, D.)
SRP (o-PO ₄ -P)	nach DIN EN 1189 photometrische Messung bei 880 nm (Milton Roy)

2.3 Mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl in den Wasserproben wurden je 4 ml formalinfixierte Probe mit 150 µl Propidiumjodid (1 mg/ml; Molecular Probes® invitrogen detection technologies, Eugene, USA) versetzt. Nach Inkubation für 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Probe über 0,2 µm Polycarbonatfilter (Whatman GmbH, Dassel, D) filtriert und der Filter auf Objektträger in Citifluor (Citifluor Ltd, London, GB) eingebettet und bei -20°C dunkel gelagert bis zur Auswertung. Die Auszählung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Jena, D) mit Filtersatz 20 (Anregung BP 546/12, Emission BP 575/640, Strahlenteiler 560 Carl Zeiss, Jena, D)

2. 4 Mikroskopische Quantifizierung des autotrophen Picoplanktons

Für die fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung des autotrophen Picoplanktons (APP) wurden 20ml der formalinfixierten Probe über 0,2µm Polycarbonatfilter (Whatman GmbH, Dassel, D) filtriert und die Filter mit Citifluor (Citifluor Ltd, London, GB) auf Objektträger eingebettet. Die Untersuchung am Epifluoreszenzmikroskop mit Hilfe des Filtersatzes 14 (Anregung BP 510-560, Strahlenteiler FT 580, Emission LP 590, Carl Zeiss, Jena, D) ermöglicht die Abgrenzung der Cyanobakterien von anderen Organismen aufgrund der Eigenfluoreszenz der Phycobiline sowie die Differenzierung von phycocyanin- und phycoerythrinhaltigen Cyanobakterien. Quantitativ erfasst wurden kokkale Zellen mit Durchmesser <1µm und 1-2µm, diese bilden gemeinsam das APP, für das Zellzahlen und Biovolumina berechnet wurden. Zur statistischen Absicherung wurden für die Wasserproben 10 Zählungen pro Filter durchgeführt und in die Berechnung einbezogen.

2. 5 Durchflusszytometrie

In einem Durchflusszytometer erfolgt die Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz während Partikel (z.B. Zellen) in einem Flüssigkeitsstrom einen rechtwinklig dazu verlaufenden Laserstrahl passieren [91]. Dabei können neben der schnellen Quantifizierung der Zellen auch verschiedene Eigenschaften detektiert und unterschieden werden. In den meisten Durchflusszytometern werden dazu durch zwei Streulicht-Detektoren zum Einen das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) erfasst, welches vor allem mit der Größe der Zellen korreliert, zum Anderen das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), wodurch Informationen über verschiedene Struktureigenschaften der Zellen gewonnen werden können [91]. Darüber hinaus können weitere, zumeist Fluoreszenzeigenschaften der Partikel detektiert werden. Das für die Untersuchungen verwendete Durchflusszytometer Accuri C6 (Becton Dickinson, Heidelberg, D), verfügt über zwei Anregungslaser und vier Emissionsdetektoren (Tabelle 4).

Tabelle 4: Optische Konfiguration des BD Accuri C6 Durchflusszytometers und detektierte Photopigmente bzw. verwendete DNA-Farbstoffe, verändert nach: [92]

Wellenlänge Anregungslaser	Emissionsdetektor/ Wellenlänge	Photopigment/ Farbstoff	Emissionsmaximum
488nm (Blau)			
	FL1 / 533nm +/-15	SYBRGreen	521nm
	FL2/ 585nm +/-20	Phycoerythrin	575nm
	FL3/ 670 LP	Chlorophyll a, b Propidiumiodid	>640nm 617nm
640nm (Rot)			
	FL4/ 675 +/- 12,5	C-Phycocyanin/ R-Phycocyanin Allophycocyanin	650nm/ 646nm 660nm
Vorwärtsstreulicht	0° +/- 15°		
Seitwärtsstreulicht	90° +/- 15°		

2 Material und Methoden

Die detektierbaren Eigenschaften lassen z.B. eine Quantifizierung von Zellen nach Anfärbung mit entsprechenden Farbstoffen oder eine Quantifizierung und Differenzierung ungefärbter Zellen zu. Für Gewässerproben ermöglichen insbesondere die verschiedenen Photopigmente der Phytoplankter sowohl die Abgrenzung von nicht-photosynthetisch aktiven Organismen als auch eine weitere Differenzierung der Phytoplanktongruppen. Aufgrund der hohen Variabilität von Zellgrößen und -formen können weitere Differenzierungen der Phytoplankter vorgenommen werden.

2.5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl basierte auf der Anfärbung der Zellen mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen (Invitrogen, Carlsbad, USA) (u.a. [93]). 5 µl unfixierte Probe sowie 3 µl einer SYBRGreen-Stammlösung (1:100 in DMSO) wurden in einem Gesamtvolumen von 300 µl in autoklaviertem Reinstwasser eingesetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 15 min wurden 50 µl Probenvolumen mit einer Durchflussrate von 35 µl/min (medium) und einer core size des Probenstroms von 16µm gemessen. Der Threshold wurde bei 800 auf dem zur Detektion von SYBRGreen verwendeten Kanal FL1-H gesetzt. Die Messparameter und die zur Auswertung verwendeten gates basierten auf dem Template *C6 Eawag Water Quality Template for BD Accuri C6* der Firma BD BioSciences [94] .

2.5.2 Quantifizierung und Differenzierung des autotrophen Picoplanktons

Zur Differenzierung und Quantifizierung von Cyanobakterien, insbesondere des APP, wurden ab 2014 je 50 µl der Wasserproben unfixiert am Abend der Probenahme im Durchflusszytomter analysiert. Die Grundlage für die Messungen und Auswertungen bildeten die Angaben in [92]. Für die Auswertung wurden Messungen mit Durchflussrate von 35 µl/min und einer core size des Probenstroms von 16 µm (Standardeinstellung *medium*) verwendet. Der Schwellenwert für die Erfassung der Signale wurde auf den Wert 10.000 im Forward scatter festgelegt. Messungen mit einer geringeren Durchflussrate (14 µl/min) und core size (10 µm) des Probenstroms (Standardeinstellung *slow*), wie sie zur Vereinzelung picoplanktischer Zellen naheliegend wären, wurden nicht verwendet, da bei diesen stärkere Messfehler bei der Quantifizierung des Probenvolumens durch die Software auftreten [95].

2 Material und Methoden

2.6 Spektrofluorometrische Erfassung von Phytoplanktongruppen

2.6.1 Grundlagen und Messprinzip

Aufgrund des hohen zeitlichen Aufwands für mikroskopischen Phytoplanktonanalysen wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um eine schnellere Quantifizierung und Differenzierung des Phytoplanktons vornehmen zu können. Fluoreszenzbasierte Messverfahren beruhen auf der Anregung und Detektion der Emission von Photopigmenten, wie z.B. Chlorophyll a. Die Phytoplanktonklassen zeichnen sich durch das Auftreten unterschiedlicher Anteile weiterer Photopigmente aus, die zur fluorometrischen Differenzierung genutzt werden können (Tabelle 5).

Tabelle 5: Algengruppen und Photopigmente (aus: [96], [97])

	<i>Chlorophylle</i>			<i>Xanthophylle</i>		<i>Phycobiline</i>	
	a	b	c	Fuco-xanthin	Peridinin	Phycocyanin	Phycoerythrin
$\lambda_{abs} (nm)$	430	435	444-452	450	466	614	498
	660-665	470	583-586	470	535	620	538
		645	630-635				565
$\lambda_{ex} (nm)$	430-450	459-467	450-465	508-525	490	630	550
	668-685	652-678	633-696	678-680	675	650	560-575
<i>Chlorophyta</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Euglenophyta</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Chryso- phyta</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Bacillario- phyta</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Dino- phyta</i>	+	-	+	-	+	-	-
<i>Hapto- phyta</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Crypto- phyta</i>	+	-	+	-	-	+	+
<i>Cyano- bacteria</i>	+	-	-	-	-	+	+

Die Erfassung und Differenzierung verschiedener Algenklassen mit der Tauchsonde FluoroProbe basiert auf dem Vorkommen der Photopigmente Chlorophyll a, Chlorophyll c, Phycocyanin, Phycoerythrin, Fucoxanthin und Peridinin [98]. Anhand ihrer Pigmentzusammensetzung werden vier Algenklassen unterschieden (Tabelle 6).

2 Material und Methoden

Tabelle 6: Spektrale Gruppen von Organismen nach den vorherrschenden Photopigmenten, nach [98]

Bezeichnung spektrale Gruppe nach [98]	Organismen	Photopigmente
Green group	Chlorophyta	Chlorophyll a/b; Carotinoide
Blue group	Cyanobacteria	Phycocyanin
Brown group	Heterokontophyta, Haptophyta, Dinophyta	Chlorophyll a, c
Mixed group	Cryptophyta	Chlorophyll a, c, Phycoerythrin

Grundlage der Differenzierung der untersuchten Algenklassen sind Normspektra der Fluoreszenzintensität der einzelnen Algengruppen nach Anregung in fünf verschiedenen Wellenlängenbereichen (Abbildung 9).

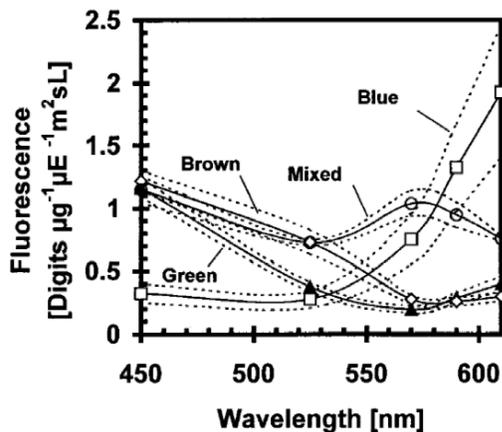


Abbildung 9: Fluoreszenzspektra verschiedener Algenklassen nach Anregung in fünf Wellenlängenbereichen, aus [98]

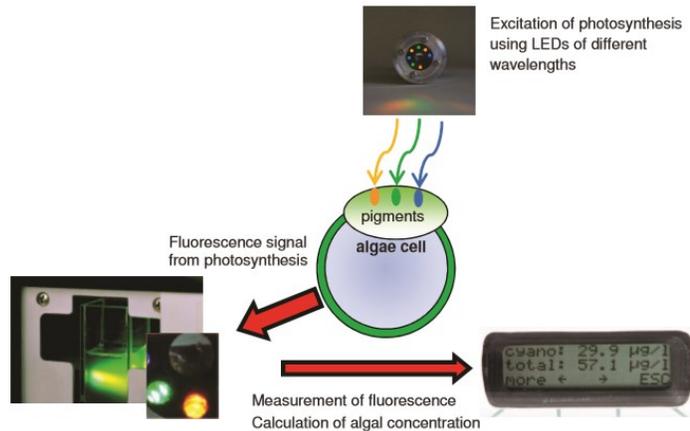


Abbildung 10: Darstellung des bbe-Messprinzips (bbe moldaenke GmbH, 2016)

Die Anregung erfolgt in aufeinanderfolgenden Pulsen mit sechs LEDs der Wellenlängen 370, 470, 525, 570, 590 und 610 nm (Abbildung 10), wobei die Anregung bei 370nm zur Korrektur von Gelbstoffen dient. Mit Hilfe eines Photomultiplieres wird die Fluoreszenzemission bei 680nm (Chl a) gemessen und anhand des für jede taxonomische Gruppe charakteristischen Normspektrums sowie des gruppenspezifischen Photopigment-/Chlorophyll-a-Verhältnisses die Anteile der jeweiligen Algenklassen am Chlorophyll a-Signal berechnet [98]. Die detektierbare Chl a-Konzentration wird vom Hersteller mit 0 – 200 µg Chl a/l angegeben, bei einer maximalen Auflösung von 0,01 µg Chl a/l.

Grenzen der Differenzierung sowie Quellen für mögliche Fehlzuordnungen können durch die teilweise Überlappung von Fluoreszenzspektren der Photopigmente gegeben sein. Darüber hinaus treten bestimmte Photopigmente in mehreren Algenklassen auf wie z.B. Phycoerythrin in Cyanobakterien und *Cryptophyta* [99], [100]. Anpassungsstrategien der Organismen an unterschiedliche Umweltbedingungen wie Lichtintensitäten und -qualitäten z.B. in verschiedenen Wassertiefen, bedingen Unterschiede im Verhältnis der Photopigmente [101]. Cyanobakterien verfügen z.B. über die als chromatische Adaptation

2 Material und Methoden

bezeichnete Fähigkeit, die Anteile der Phycocyanin- und Phycoerythrinmoleküle in den peripheren Antennenkomplexen zu variieren. Die Veränderung der Anteile von Phycocyanin, Phycoerythrin und Chlorophyll a wirken sich auf die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen aus [102], was die zuverlässige Detektion und Unterscheidung von anderen Phytoplanktongruppen erschwert. Darüber hinaus sind die Fluoreszenzsignaturen der einzelnen Spezies innerhalb einer spektrometrischen Gruppe nicht identisch, sodass sich je nach Artenzusammensetzung Abweichungen vom definierten Normspektrum ergeben können (Catherine et al. 2012).

2.6.2 Datenaufnahme und Vergleich mit mikroskopisch ermittelter Phytoplanktonzusammensetzung

Tiefenprofile mit der FluoroProbe Sonde wurden mit drei Messungen je Sekunde und ca. 25 Messwerten je Meter Wassersäule aufgenommen. Zur Auswertung wurden 20 cm-Mittelwerte der Originaldaten errechnet. Diese Werte wurden mit den mikroskopisch ermittelten Biovolumina verglichen, für die aus den jeweiligen Tiefen an jeder Probenahmestelle Wasserproben mittels Ruttner-Schöpfer entnommen wurden. Die Proben wurden vor Ort mit Lugolscher Lösung fixiert, kühl und dunkel gelagert und nach Utermöhl in Sedimentationskammern unter 200-facher bzw. 400-facher Vergrößerung ausgezählt (Umkehrmikroskop Sedival, Zeiss AG, Jena, D). Die Quantifizierung des Phytoplanktons wurde von Dr. Heidemarie Horn (Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig) vorgenommen. Für die Berechnung der Biovolumina wurden artspezifische Mittelwerte aus langjährigen Untersuchungen des Phytoplanktons der Talsperre Saidenbach zugrunde gelegt [4]. Für einige Arten erfolgte die Bestimmung der Biovolumina anhand der in der jeweiligen Probe ermittelten Zell- bzw. Koloniegroßen: Für koloniebildenden coccale Arten (*Aphanothece bachmanii*, *A. minutissima*, *Cyanodictyon planctonicum*, *Woronichinia naegeliana*, *Microcystis flos-aquae*) wurden die Kolonien zur Ermittlung der Biovolumina vermessen. Für die fadenförmigen Cyanobakterienarten (*Oscillatoria limnetica*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena sp.*, *Tychonema sp.*) wurden die Biovolumina anhand der mittleren Länge der Filamente in jeder Probe ermittelt. Biovolumina von *Coenochloris polycoeca*, *Oocystis sp.* und *Pandorina morum* wurden auf Grundlage der in der jeweiligen Probe vermessenen Zell- bzw. Koloniedurchmesser bestimmt.

Für den Vergleich der Phytoplanktongruppenspezifischen Chlorophyll a-Konzentrationen aus den Sondemessungen mit den Ergebnissen der mikroskopischen Quantifizierung erfolgte die Gruppierung der Arten anhand ihrer Photopigmente in die entsprechenden Gruppen der spektrophotometrischen-Klassifizierung. Diatomeen, Dinophyceen, Haptophyceen und Chrysophyceen wurden als spektrale Gruppe "Diatoms" ("brown group" nach [98]) zusammengefasst. Die spektrale Gruppe der Grünalgen

2 Material und Methoden

(“Green group” [98]) wurde im Vergleich den Biovolumina von Grünalgen und Desmidiaceen gegenübergestellt. Die spektrale Gruppe der Cryptophyta (“red group” in [98]) umfasste Arten der Cryptophyceen und Cyanobakterien wurden zum Vergleich mit der spektralen Gruppe “bluegreen” zusammengefasst.

Beim Vergleich von Fluoreszenzintensitäten mit Zellzahlen oder Biovolumina muss jedoch beachtet werden, dass zwischen diesen Parametern kein strikter Zusammenhang besteht. Die Konzentration und Anteile der Photopigmente in den Zellen kann zwischen Arten stark variieren, sodass bei einer Quantifizierung von Phytoplanktongruppen die jeweilige Artenzusammensetzung der Gruppe auf das Verhältnis zwischen Fluoreszenzsignal und Zellzahlen Einfluss nehmen kann. Darüber hinaus variiert die Pigmentkonzentration auch innerhalb einer Art je nach physiologischen Zustand der Zellen und Umweltbedingungen wie Licht- und Nährstoffangebot [103] [104] [105].

Die statistische Auswertung von insgesamt 54 Proben erfolgte mit dem Program R V. 2.2.1 [106]. Die Korrelation gruppenspezifischer Chlorophyll a-Konzentration mit den entsprechenden Biovolumina wurde mittels Rangkorrelation nach Spearman untersucht, da die Daten nicht den Anforderungen der Normalverteilungsannahme genügten (Shapiro-Wilk-Test, Kolmogorov-Smirnoff-Test, QQ-Plot).

2 Material und Methoden

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 DNA-Isolierung, Polymerase-Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Zur Gewinnung von DNA aus den Wasserproben wurden 400 ml sequentiell in zwei Größenfraktionen filtriert: Auf Filtern mit einer Porenweite von 5 µm (Cellulose Nitrat-Filter, Whatman, Dassel, D) wurden Partikel-assoziierte Bakterien oder größere Organismen, z.B. Algen, zurückgehalten. Das Filtrat wurde anschließend über Filter der Porengröße 0,2 µm (Polycarbonatfilter, Whatman, Dassel, D) gegeben, diese Größenfraktion enthält die im Folgenden als frei lebende Bakterien bezeichnete Organismen. Die DNA-Isolierung von den Filtern erfolgte mit dem *UltraClean™ Soil DNA Purification Kit* (Mobio Laboratories, Inc., Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben.

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR wurden die Thermocycler T3 und Tpersonal (Biometra, Göttingen, D) sowie Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Hamburg, D) verwendet. Die jeweiligen PCR-Ansätze, PCR-Programme und Primer sind den Tabellen 8 bis 10 zu entnehmen

Tabelle 7: PCR-Ansätze

Komponente	Volumen [µl]
10 µl PCR-Ansatz GoTaq® DNA-Polymerase (Promega, Mannheim, D)	
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	2
dNTPs	1
Forward-Primer (10 µM)	0,2
Reverse-Primer (10 µM)	0,2
DNA-Template	1-2
PCR-Wasser	ad 10
GoTaq® DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,05
10 µl PCR-Ansatz 5 PRIME HotMaster Mix (5Prime, Darmstadt, D)	
5 PRIME HotMaster Mix (2.5x) (50 U/ml)	4
Forward-Primer (10 µM)	0,2
Reverse-Primer (10 µM)	0,2
PCR-Wasser	ad 10
DNA-Template	1-2
10 µl PCR-Ansatz PerpetualTaq (Roboklon, Berlin, D):	
Puffer B	1
dNTPs	2
Forward-Primer (10 µM)	0,5
Reverse-Primer (10 µM)	0,5
DNA-Template	1-2
PCR-Wasser	ad 10
PerpetualTaq DNA-Polymerase (xU/µl)	0,05

2 Material und Methoden

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten PCR-Programme

Reaktionsschritt		Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklusanzahl	
TPU1/1492R: Amplifizierbarkeit der Probe; <i>Bacteria</i>					
		Initiale Denaturierung	95	5	30
		Denaturierung	95	1	
		Annealing	57	1	
		Elongation	72	1	
		Finale Elongation	72	10	
341FGC/R518: DGGE-Fragment <i>Bacteria</i> ; DGGE-Fragment <i>Synechococcus</i> (nested PCR von ProCR/ Cya-b-F371)					
	1. Teilzyklus	Initiale Denaturierung	95	5	20
		Denaturierung	95	1	
		Annealing	65 ¹	1	
		Elongation	72	1	
	2. Teilzyklus	Denaturierung	95	1	15
		Annealing	55	1	
		Elongation	72	1	
		Finale Elongation	72	10	
341FGC/A688R: DGGE-Fragment Alphaproteobacteria					
Beta680F/1055RGC: DGGE-Fragment Betaproteobacteria					
	1. Teilzyklus	Initiale Denaturierung	95	5	20
		Denaturierung	95	1	
		Annealing	65 ¹	1	
		Elongation	72	1	
	2. Teilzyklus	Denaturierung	95	1	18
		Annealing	55	1	
		Elongation	72	1	
		Finale Elongation	72	10	
ProCR/ Cya-b-F371: Spezifität <i>Synechococcus</i> für nested PCR DGGE-Fragment					
	1. Teilzyklus	Initiale Denaturierung	95	5	20
		Denaturierung	95	1	
		Annealing	65 ¹	1	
		Elongation	72	1	
	2. Teilzyklus	Denaturierung	95	1	15
		Annealing	55	1	
		Elongation	72	1	
		Finale Elongation	72	10	
M13F/M13R: Klonierung Vektor pCR2.1					
		Initiale Denaturierung	95	10	35
		Denaturierung	95	1	
		Annealing	57	1	
		Elongation	72	2	
		Finale Elongation	95	10	

¹-0,5K je Zyklus

2 Material und Methoden

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Primer

Bezeichnung	Spezifität/Zielgen	Sequenz 5'-3'	Quelle
TPU1 (27F)	Bacteria, 16S rDNA	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	[107]
357FGC/341 FGC	Bacteria, 16S rDNA, DGGE-Standard	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG	[108]
359FGC	Cyanobacteria, 16S rDNA,	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGGRGGAATTTTCYGAATGGG	[109]
Cya-b-F371	Cyanobacteria, 16S rDNA	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCG	[110]
R518	Bacteria, 16S rDNA, DGGE-Standard	ATTACCGCGGCTGCTGG	[108]
Beta680F	Betaproteobacteria, 16S rDNA	CRCGTGGTAGCAGTGA	[111]
A688R	Alphaproteobacteria, 16S rDNA	TATCTACGAATTTACCT	[112]
1055RGC	Bacteria, 16S rDNA	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCGCC CCCGCCCCAGCTGACGACAGCCAT	[113]
1492R	Bacteria, 16S rDNA	TACGGYTACCTTGTACGACTT	[107]
B23S5'R	Cyanobacteria, 23S rDNA	CTTCGCCTCTGTGCCTAGGT	[114]
ProCR	Synechococcus, 16S rDNA	CCTCCTCCACAAGGGT	Schumann, nicht veröffentlicht
M13F	Vector pCR 2.1	GTAAAACGACGGCCAG	[115]
M13R	Vector pCR 2.1	CAGGAAACAGCTATGAC	[115]

Zur Überprüfung der korrekten Größe der Amplifikate wurden je 5 µl PCR-Produkt entsprechend der erwarteten Größe des Produktes in 1 % oder 2 % Agarosegelen aufgetrennt. Die Elektrophorese (Gelelektrophoresekammern BioRad, München, D) erfolgte in 1 x TAE (TrisBase 242,28 g, Essigsäure 100 % 57,10 ml, EDTA 37,22 g, ad 1L mit A. dest) für 35 min (1 % Agarosegele) bzw. 40 min (2 % Agarosegele) bei 140 Volt (Electrophoresis Power Supply E844, Consort, Turnhout, B). Nach der Färbung für 10-30 min in Ethidiumbromid (1 µg/ml, Roth, Karlsruhe, D) erfolgte die Detektion mit Hilfe eines UV-Transilluminators (GelDOC 2000, BIO-RAD, München, D) und dem Programm *Quantity One 4.1.1* (BioRad, München, D). Zur Überprüfung der Größe des PCR-Produktes und Abschätzung der DNA-Menge wurde in 1 % Agarosegelen der quantitative Längenstandard Smart Ladder 10 kb und in 2 % Agarosegelen der Smart Ladder SF (beide Eurogentec Deutschland GmbH, Köln, D) verwendet.

2.7.3 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen gleicher Länge, die sich in ihrer Sequenz unterscheiden. In den für die DGGE verwendeten Acrylamidgelen besteht ein ansteigender Gradient einer denaturierenden Substanz wie Formamid oder Harnstoff, der im Verlauf der Elektrophorese zu einer Auftrennung des DNA-Doppelstranges führt, welcher die Beweglichkeit des DNA-Stranges im Gel einschränkt [108]. Die Auftrennung des DNA-Doppelstranges

2 Material und Methoden

hängt von der Nukleotidzusammensetzung ab, da zwischen Adenin und Thymin zwei, zwischen Guanin und Cytosin hingegen drei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Der DNA Doppelstrang trennt sich daher in GC-reichen Bereichen später auf als in AT-reichen Abschnitten. Die Auftrennung des DNA-Stranges und damit seine elektrophoretische Beweglichkeit im Gel sind daher sequenzspezifisch und können für jedes PCR-Produkt ein unterschiedliches Laufverhalten ergeben [116]. Die vollständige Auftrennung der beiden DNA-Stränge im Gel wird verhindert, indem durch geeignete Primer in der vorangehenden PCR eine GC-reiche Region an einem Ende der Amplifikate eingeführt wird (GC-Klammer), durch die im Verlauf der Elektrophorese der Zusammenhalt des DNA-Doppelstranges erhalten bleibt [108]. Das Ergebnis der DGGE ist ein für die jeweilige mikrobielle Struktur der Probe charakteristisches Bandenmuster („molekularer Fingerprint“), welches mit Proben z.B. vom gleichen Standort zu unterschiedlichen Zeiten oder mit Proben von anderen Standorten verglichen werden kann. Auf dieser Grundlage sind mit Hilfe statistischer Auswertungsverfahren Aussagen über die Ähnlichkeit mikrobieller Populationen der Proben möglich, z.B. in Hinblick auf die Stabilität einer mikrobiellen Gemeinschaft unter dem Einfluss zeitlicher oder räumlicher Veränderungen bestimmter Umweltparameter. Durch Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Gel und anschließende Reamplifikation ist auch eine Sequenzierung der entsprechenden DNA-Abschnitte möglich. Wurden in der PCR z.B. die Gene der 16S rRNA amplifiziert, können damit die zu den Banden gehörigen Spezies identifiziert werden.

Für die Durchführung der DGGE wurde das System IngePhorU-2 (Ingeny International BV, Goes, N) verwendet. Das Gießen der Gradientengele erfolgte mit Hilfe eines Gradientenmischers (GradientFormer S 485, BioRad, München, D) und einer Peristaltikpumpe (Watson Marlow, Rommerskirchen, D) mit einer Flussrate von 5ml/min über eine Kanüle zwischen die nach Herstellerangaben in die Gelkassette eingesetzten Glasplatten. Das Sammelgel wurde mit Hilfe einer Kanüle auf die auspolymerisierten Trenngele gegeben. Die Herstellung der Trenn- und Sammelgele erfolgte aus Acrylamid-Stammlösungen (Tabelle 10), die über Cellulose-Acetat-Filter (Porenweite 0,2 µm, Whatman GmbH, Dassel, D) sterilfiltriert und bei 4°C in Glasflaschen aufbewahrt wurden. Die Zusammensetzung der Trenngele variierte in Abhängigkeit der aufzutrennenden PCR-Produkte und ist Tabelle 11 zu entnehmen.

2 Material und Methoden

Tabelle 10: Acrylamid-Stammlösungen für DGGE

Substanz	7% Acrylamid 0% denaturierend	7% Acrylamid 80% denaturierend	8% Acrylamid 0% denaturierend	8% Acrylamid 80% denaturierend
Harnstoff (Urea)	-	168 g	-	168 g
Formamid	-	160 ml	-	160 ml
50x TAE, pH 7,4	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
40% Acrylamid / Bisacrylamid	87,5 ml	87,5 ml	100 ml	100 ml
Aqua dest.	ad. 500 ml	ad. 500 ml	ad. 500 ml	ad. 500 ml

Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele aus Acrylamid-Stammlösungen

	Sammelgel	Trenngel							
	Lösung A 7% Acrylamid	Lösung B 7% Acrylamid				Lösung C 8% Acrylamid			
		25%	30%	35%	40%	55%	60%	65%	70%
Stammlösung 0% denaturierend	6ml	16,5ml	15ml	13,5ml	12ml	7,5ml	6ml	4,5ml	3ml
Stammlösung 80% denaturierend	-	7,5ml	9ml	10,5ml	12ml	16,6ml	18ml	19,5ml	21ml
TEMED	6µl	15µl							
APS	60µl	50µl							

Entsprechend der Mengenabschätzung im Agarosegel anhand des Standards wurden jeweils circa 80ng PCR-Produkt aufgetragen und anschließend die Elektrophorese in 60°C warmen 1xTAE-Puffer bei 100 Volt für 20 Stunden durchgeführt (Electrophoresis Power Supply EPS 1001, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Wien, Ö).

Die Färbung des Gels erfolgte mit 20 ml 1x SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 60 min im Dunkeln. Anschließend wurde die Färbelösung mit destilliertem Wasser abgespült und die Banden mit Hilfe des UV-Transilluminators und dem Programm Quantity One 4.1.1 detektiert. Die Auswertung des Bandenmusters erfolgte mit dem Programm Bionumerics v6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, B).

Zur relativen Bestimmung der Laufhöhe der Banden im Gelbild wurde ein DGGE-Standard verwendet, bestehend aus DNA aus den Organismen *Flexibacillus* sp., *Bacillus sphaericus*, *Commamonadaceae bacterium* MWH5, *Sphaerotilus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Variovorax paradoxus*, *Leptothrix discophora* sowie *Leptothrix mobilis* (zur Verfügung gestellt von Dr. Burga Braun (TU Berlin)). Durch PCR-Produkte der Mycoplasmen-Spezies *Mycoplasma penetrans* ARA, *Mycoplasma salivarium* und *Mycoplasma gallisepticum* wurde der Standard um weitere AT-reiche DNA-Fragmente ergänzt (Tabelle 12).

2 Material und Methoden

Tabelle 12: PCR-Ansätze und -Programme zur Herstellung des DGGE-Standards

SEAN-Mix				Mycoplasmen-Mix		
PerpetualTaq-DNA-Polymerase, Primer: 341F/R518_GC				GoTaq-DNA-Polymerase, Primer: 341F/R518_GC		
Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	96°C	5min		95°C	3min	
Denaturierung	94°C	30s		95°C	1min	
Annealing	58°C	2min	35x	58°C	1min	30x
Elongation	72°C	2min		72°C	1min	
Finale Elongation	72°C	10min		72°C	10min	
Ansatz 2x50µl				Ansatz 50µl		
Puffer B	10µl			GoBuffer	10µl	
dNTPs	20µl			dNTPs	5µl	
Primer F/R	je 2µl			Primer F/R	je 1µl	
Wasser	64µl			Wasser	31µl	
Template ¹	0,5µl			GoTaq	0,25 µl	
¹ SEAN-Mix v. Dr. Burga Braun				Template ²	6µl	
				² je 2µl <i>M. pneumoniae</i> ARA, <i>M. salivarium</i> , <i>M. gallisepticum</i>		

Einzelne DGGE-Banden wurden zur Sequenzierung unter UV-Licht (UV-Tisch Syngene GVM20, Synoptics Ltd., Cambridge, UK) aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelfragmente wurden in 300µl A. dest für zwei Stunden bei Raumtemperatur gewaschen, das Wasser anschließend durch 50 µl frisches A. dest ersetzt und die Proben bei 4 °C gelagert. Im Vorfeld der Sequenzierung erfolgte eine Reamplifikation mit dem identischen PCR-Programm und entsprechenden Primern ohne GC-Klammer.

2.7.4 Klonierung

Die Klonierung dient der Gewinnung von *E. coli*-Kolonien, die jeweils eine Sequenz eines Gemisches von DNA-Abschnitten aufgenommen haben, mit dem Ziel, diese einzelnen DNA-Abschnitte anhand der Kolonien weiter zu vervielfältigen und zu untersuchen. Die mit Hilfe von Primern entsprechender Spezifität gewonnenen PCR-Produkte wurden mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe, D) mit Hilfe des Vektors des pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, USA) in One Shot® TOP10F' chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (Invitroge, Carlsbad, USA) kloniert. Die chemische Transformation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die *E. coli*-Zellsuspension auf LB-Agar (Difco™ LB-Agar, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) mit 6µg/ml IPTG, 100µg/ml X-Gal und 100µg/ml Ampicillin 24 Stunden bei 37°C kultiviert.

Da das Gen für Ampicillinresistenz mit dem Vektor in *E.coli* eingebracht wird, können auf dem mit Ampicillin versetzten Medium nur Kolonien wachsen, die einen Vektor aufgenommen haben. Die

2 Material und Methoden

Aufnahme eines DNA Fragmentes in das Plasmid führt zur Unterbrechung des Beta-Galaktosidasegens, sodass Bakterien, die ein Plasmid mit DNA-Fragment enthalten anhand der Unfähigkeit zur Verwertung von X-Gal selektiert werden können (Blau-Weiß-Selektion, weiße Kolonien). Die Kolonien dieser Klone wurden weiter kultiviert und mit dem Koloniematerial die Colony-PCR durchgeführt. Dabei wird das von dem jeweiligen Klon aufgenommene DNA-Fragment mit Hilfe der M13-Primer (Invitrogen, Carlsbad, USA) amplifiziert, die im Plasmid an flankierende Bereiche des aufgenommenen DNA-Fragmentes binden. Für die Colony-PCR wurde das gleiche PCR-Programm verwendet wie zur Herstellung des klonierten PCR-Produktes, mit dem Unterschied, dass die initiale Denaturierungszeit 10 min betrug, da Koloniematerial statt isolierter DNA als Templat eingesetzt wird. Ausgehend von diesem PCR-Produkt kann mit einer nested PCR ein kürzeres und mit GC-Klammer versehenes DNA-Fragment für die Untersuchung der Klone mittels DGGE hergestellt werden. Werden dabei die gleichen Primer verwendet, wie für die klonierte Umweltprobe, so können die Laufhöhen der Banden, die die von den Klonen aufgenommenen Sequenzen repräsentieren, mit dem Banden der Umweltprobe verglichen werden. Dadurch ist eine Zuordnung der DGGE-Signale aus der taxonomisch identifizierten DNA-Sequenz der Klone zu den Banden der Umweltproben möglich.

2.7.5 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Klonen und DGGE-Banden wurde das Prinzip der Kettenabbruch-Methode nach Sanger genutzt. In Vorbereitung dafür wurden PCRs mit Koloniematerial der Klone bzw. für DGGE-Banden mit den entsprechenden Primern ohne GC-Klammer durchgeführt. Zum Abbau verbliebender dNTPs und Primern wurde das PCR-Produkt mit den Enzymen Exonuklease I (New England BioLabs Inc., Hertfordshire, UK) und Shrimp Alkaline Phosphatase (USB, Cleveland, USA) für 30min bei 37°C und 15min bei 80°C inkubiert. Abhängig von der Menge erhaltenen PCR-Produktes wurden z.B. 5µl PCR-Produkt mit 2 µl einer Gebrauchslösung beider Enzyme (je 1U/µl) inkubiert. Die anschließende Sequenzier-PCR wurde mit einem der beiden Primer und dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) unter den in Tabelle 13 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Die im Kit neben dNTPs enthaltenen fluoreszenzmarkierten ddNTPs (Dideoxyribonukleosidtriphosphate) führen aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am 3'-C Atom der Ribose dazu, dass kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann und das DNA-Fragment mit dieser Base endet. Die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung von ddATP, ddGTP, ddTTP und ddCTP ermöglicht während der Sequenzierung die Identifikation der Base.

2 Material und Methoden

Tabelle 13: Ansatz und PCR-Bedingungen der Sequenzier-PCR

Ansatz Sequenzier-PCR		PCR-Programm Sequenzierreaktion			
Komponente	Volumen	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Enzymatisch aufgereinigtes PCR-Produkt	Je nach Menge PCR-Produkt	Denaturierung	96 °C	10 sec	25
Premix (BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit)	2 µl	Annealing	entspr. Primer	5 sec	
Primer	1 µl	Elongation	60 °C	4 min	
Aqua dest.	ad 10 µl				

Nach Aufreinigung des Sequenzieransatzes (MSB Spin PCRapace Kit (Invitex, Berlin, D), nach Herstellerangaben) erfolgte die Sequenzierung mit dem Kapillarsequenzierer Abi Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durch Dr. W. Rudolph (TU Dresden).

Alternativ wurden externe Sequenzierservices der Firmen Macrogen (Macrogen Europe, Amsterdam, N), GATC (GATC Biotech AG, Konstanz, D) bzw. SeqLab (Sequence Laboratories, Göttingen, D) genutzt.

2.7.6 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung

Bei der Pyrosequenzierung beruht die Aufklärung der Nukleotidsequenz auf der Detektion eines Lichtquants, welches durch den Einsatz spezieller Enzyme beim Einbau eines bestimmten Nukleotids entsteht und detektiert wird. Während der PCR wurde dem amplifizierten DNA-Abschnitt der Proben durch die 24 unterschiedlich markierten Forwardprimer (Tabelle 14) eine probenspezifische Markierung (MID) angefügt.

Die DNA-Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte wurde spektrometrisch (NanoDrop ND 1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D) bestimmt und die PCR-Produkte äquimolar vereinigt. Die Sequenzierung erfolgte durch MWG Eurofins Genomics (NGS-Laboratory, Ebersberg, D) mit Hilfe der GS FLX Titanium series chemistry (Proben 2013) bzw. GS FLX-++Titanium series chemistry (Proben 2014 und 2012).

2 Material und Methoden

Tabelle 14: Für die Pyrosequenzierung verwendete Primer, nach [117]:

Primer A	Sequenz (5' - 3') forward Primer	MID
1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGACTACAGGGTTNCGNTCGTTG	ACGACTACAG
2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACGACTCGGGTTNCGNTCGTTG	AGACGCACTC
3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGGGGTTNCGNTCGTTG	ATCAGACACG
4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTGTCTTAGGGTTNCGNTCGTTG	CGTGTCTCTA
5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCTCGACAGGGTTNCGNTCGTTG	ACGCTCGACA
6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACTGTAGGGTTNCGNTCGTTG	AGCACTGTAG
7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCGCGTGTGGGGTTNCGNTCGTTG	CTCGCGTGTC
8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTATGCGGGTTNCGNTCGTTG	TCTCTATGCG
9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATACGTCTGGGTTNCGNTCGTTG	TGATACGTCT
10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAGAGATACGGGTTNCGNTCGTTG	CGAGAGATAC
11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATACGACGTAGGGTTNCGNTCGTTG	ATACGACGTA
12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTACTACTCGGGTTNCGNTCGTTG	TGTACTACTC
13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCACGTACTAGGGTTNCGNTCGTTG	TCACGTACTA
14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATAGAGTACTGGGTTNCGNTCGTTG	ATAGAGTACT
15	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACTATACTGGGTTNCGNTCGTTG	AGACTATACT
16	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACTGTACAGTGGGTTNCGNTCGTTG	ACTGTACAGT
17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACGAGTATGGGTTNCGNTCGTTG	TACGAGTATG
18	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACAGATCGTGGGTTNCGNTCGTTG	TACAGATCGT
19	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGTGTAGATGGGTTNCGNTCGTTG	TAGTGTAGAT
20	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTATACTATGGGTTNCGNTCGTTG	TCTATACTAT
21	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACAGTATATAGGGTTNCGNTCGTTG	ACAGTATATA
22	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTAGACTAGGGTTNCGNTCGTTG	CGTAGACTAG
23	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATAGTAGTGGGTTNCGNTCGTTG	CATAGTAGTG
24	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-ACTACTATGTGGGTTNCGNTCGTTG	ACTACTATGT
Reverse Primer	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCCAGCMGCCGCGT	PrB-U529F

Die parallele Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe von beads, an die jeweils ein einzelnes DNA-Fragment spezifisch gebunden wird. Die so vereinzelt DNA-Sequenzen werden in einer EmulsionsPCR (emPCR) amplifiziert, sodass zahlreiche Kopien des jeweiligen DNA-Abschnittes je bead vorliegen (klonale Amplifikation). Diese DNA-beladenen beads werden in Reaktionskammern einer Mikrotiterplatte vereinzelt und darin die Pyrosequenzierung durchgeführt [118]. Die Pyrosequenzierung beruht auf der enzymatischen Generierung eines Lichtsignals beim Einbau eines Nukleotids. Aus dem beim Einbau eines Nukleotids abgespaltenen Molekül Pyrophosphat entsteht ATP, welches vom Enzym Luciferase zur Katalyse einer Reaktion mit einem Lichtsignal verwendet wird. Da sequentiell nur eines der vier Nukleotide in die Reaktionsräume zugegeben wird, kann das Lichtsignal dem Einbau einer bestimmten Base zugeordnet werden (Abbildung 11) [119].

2 Material und Methoden

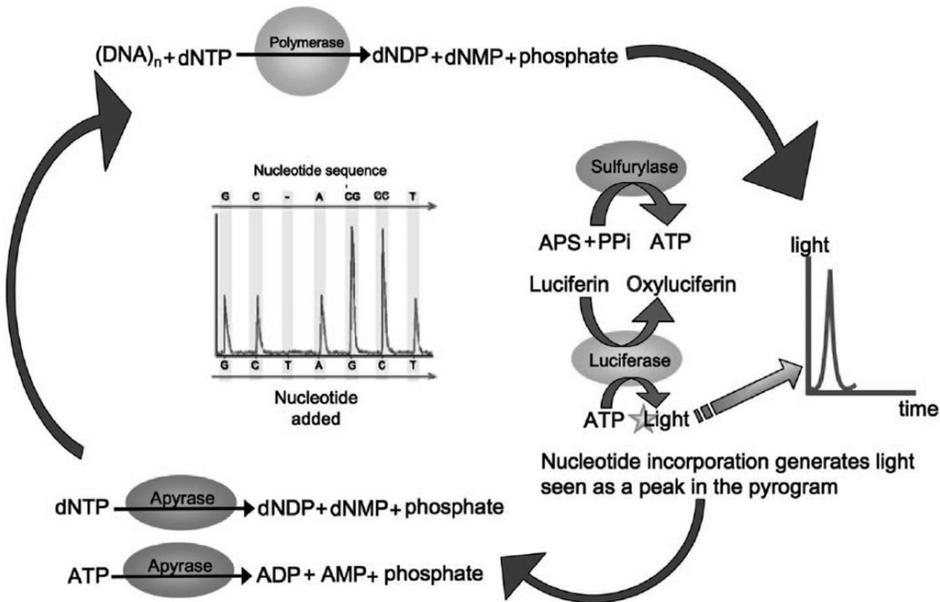


Abbildung 11:Prinzip der 454-Amplikon-Sequenzierung, aus [119]

Die Qualitätskontrolle der erhaltenen Sequenzen erfolgte in Anlehnung an [120] unter Verwendung der Software MOTHUR V. 1.36.1 [121]. In die Auswertung wurden nur Sequenzen ohne undefinierte Basen und Homopolymere von mehr als acht Basen, mit weniger als vier Fehlern in der Primersequenz bzw. einem Fehler im Barcode einbezogen. Darüber hinaus wurden Sequenzen entfernt, die nicht der Domäne Bacteria zugeordnet werden konnten, wie z.B. Archaea oder Mitochondrien, sowie chimäre Sequenzen (Uchime, [120]). Die verbliebenen Sequenzen wurden nach Entfernung der Primer- und Barcodesequenzen ab einer Sequenzidentität von 97 % in OTUs (operationelle taxonomische Einheiten) unterteilt. Die phylogenetische Zuordnung einer für das jeweilige OTU repräsentativen Sequenz erfolgte mit Hilfe der Software Mothur anhand der Datenbanken SILVA (SILVA rRNA database project [122]) und rdp (Ribosomal Database Project, [39]).

2.7.7 Catalyzed reporter deposition Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (CARD-FISH)

Bei der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung werden die Zellen einer Probe auf einem Objektträger oder Filter fixiert und mit einer fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde unter Hybridisierungsbedingungen inkubiert. Die Sonde lagert sich entsprechend ihrer Sequenz an komplementäre Bereiche der rRNA an, so dass je nach Spezifität der Sonde bestimmte Mikroorganismengruppen erfasst und unterschieden werden können. Da die im Freiwasser vorkommenden Bakterien aufgrund ihrer physiologischen Aktivität meist nicht genügend Ribosomen für ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal aufweisen, erfolgt eine Signalamplifikation mit Hilfe von HRP (Meerrettich-Peroxidase-) gekoppelten Sonden und

2 Material und Methoden

fluoreszenzmarkierten Tyramidmolekülen (Catalyzed-reporter-Deposition, CARD). Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid eine Umwandlung von Tyramidmolekülen in Tyamidradikale, welche unspezifisch mit aromatischen Verbindungen in der Zelle reagieren. Durch diese Reaktion erfolgt die Anlagerung der tyamidgekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe im direkten Umfeld der Bindungsstelle der Meerrettich-Peroxidase, welche durch die Spezifität der Sonde vorgegeben ist (Abbildung 12).

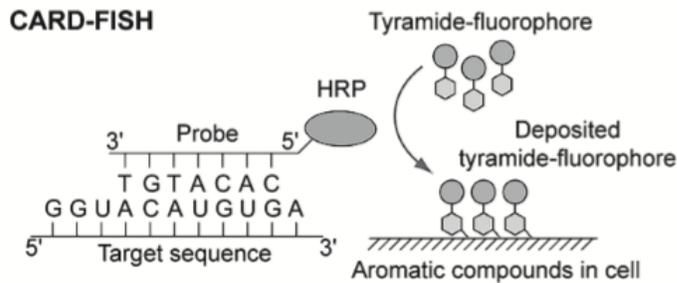


Abbildung 12: Prinzip der HRP-vermittelten Signalamplifikation (CARD), aus: [123]

Die Behandlung der Wasserproben basierte auf einem modifizierten Protokoll nach [124], welches durch eine Konzentration der Bakterien auf Membranfiltern und Einbettung in low-melt-Agarose ermöglicht, die weiteren Behandlungsschritte ohne größere Verluste an Zellen durchzuführen. Zur getrennten Fixierung mit PFA bzw. Ethanol wurden je 2 x 15 ml der Wasserproben über Polycarbonatfilter (Porenweite 0,2µm) filtriert und in einem PFA/PBS-Gemisch (Tabelle 15) bzw. Ethanol (99%) über Nacht bei 4°C fixiert. Am Folgetag wurde die Fixierungslösung zur Minimierung von Zellverlusten über den Filter gegeben und dieser anschließend durch Filtration von 30 ml PBS gewaschen. Zur Einbettung in low-melt-Agarose wurden die Filter in einer Petrischale mit auf 60°C abgekühlter 0,2 % low-melt-Agarose überschichtet, für 15min bei 37°C inkubiert und anschließend für 1min in 96% Ethanol dehydriert. Zur Permeabilisierung der Zellwände für die Fluoreszenzsonden wurde Lysozym eingesetzt sowie Achromopeptidase zur Permeabilisierung lysozymresistenter grampositiver Zellen [125]. Die Filter wurden für eine Stunde in der feuchten Kammer bei 37°C mit Lysozymlösung (Tabelle 15) inkubiert, in A. dest gewaschen und anschließend für 30min unter gleichen Bedingungen mit Achromopeptidaselösung (Tabelle 15) inkubiert. Danach wurden die Filter mit A. dest gewaschen und zur Inaktivierung endogener Peroxidasen für 30 min in 4 ml Methanol mit 20 µl H₂O₂ inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in A. dest und Dehydrierung in 96 % Ethanol für 1 min wurden die Filter luftgetrocknet.

Die Hybridisierung mit HRP-gekoppelten Sonden (5'-HRP-Markierung, Synthese durch Biomers (D)), die Tyramid-Signalamplifikation sowie die Gegenfärbung von Teilstücken der Filter wurden in 48-Well-Platten durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit 27 µl Hybridisierungspuffer/Sonde-Gemisch (Tabelle 15) je Filterteilstück bei 46°C über Nacht. Am Folgetag wurde zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden

2 Material und Methoden

jedes Filterstück mit 500 µl auf 48°C erwärmtem Waschpuffer (Tabelle 15, Tabelle 16) gewaschen und anschließend mit 500 µl frischem Waschpuffer 10 min bei 48°C inkubiert. Nach Abnehmen des Waschpuffers wurden die Filterstücke einmal mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend 15 min bei Raumtemperatur in je 500 µl PBS inkubiert. Für die anschließende Substratreaktion (Tyramid-Signalamplifikation) wurde jedes Filterstück mit 50 µl Substratmix (Amplifikationspuffer mit H₂O₂ zum Start der Enzymreaktion und dem Substrat für die HRP (FITC-Tyramid) versetzt und 30 min bei 46°C dunkel inkubiert. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Nach Entfernung des Substratmixes wurden die Filter mit 500 µl PBS gewaschen, 10 min mit 500 µl frischem PBS inkubiert und anschließend zweimal je 1 min mit A. dest gewaschen. Nach Dehydrierung mit je 50 µl 96 % Ethanol für 1min wurden die Filter lufttrocknen gelassen. Die Gegenfärbung mit je 20 µl Propidiumjodidlösung (1:200 mit A. dest. verdünnte 1 mg/ml Stammlösung) erfolgte für 15 min im Dunkeln. Nach Entfernung der Propidiumjodidlösung wurden die Filter zweimal je 1 min mit 500 µl A. dest gewaschen und mit Citifluor auf Objektträgern eingebettet. Die Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop erfolgte mit dem Filtersatz 44 (Anregung BP 475/40, Emission 530/50, Strahlenteiler 500, Carl Zeiss, Jena, D) für die FITC-Signale und dem Filtersatz 20 (Anregung BP 546/12, Emission 575/640, Strahlenteiler 560, Carl Zeiss, Jena, D) für die Propidiumjodid-Signale der Gegenfärbung. Zur statistischen Absicherung wurden minimal 400 Zellen in mindestens fünf zufällig ausgewählten Zählfeldern ausgezählt.

2 Material und Methoden

Tabelle 15: Lösungen für CARD FISH

(a) Fixierungslösung und Enzymlösungen zur Permeabilisierung:

Fixierungslösung	Achropeptidase (pH8)	Lysozymlösung
3,7 Vol % Formaldehydlösung/ PBS 3:1	3000U/ml Achropeptidase 1 µl	Lysozym 10 mg
PBS:	0,01 M NaCl-Tris/HCl 499 µl	0,5 M EDTA 0,1 ml
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O 11,5 g		1 M Tris/HCl 0,1 ml
NaCl 80 g		A. dest. ad 1 ml
KCl 2 g		
A.dest ad 1 L		

(b) Hybridisierung, Substratreaktion/Signalamplifikation und Gegenfärbung:

Hybridisierungspuffer (HP) (10ml)		10% Blocking Reagenz:	
5 M NaCl	1,8 ml	Blocking Reagenz	10g
1 M Tris/HCl (pH 7,4)	0,2 ml	Maleinsäurepuffer	100ml
Formamid	Tabelle 16c, insg. 7ml		
Aqua dest.		Maleinsäurepuffer:	
10 % Blocking Reagenz	1 ml	Maleinsäure	11,6g
10 % (w/v) SDS	10 µl	NaCl	8,8g
Dextransulfat*	1 g	A.dest	ad 1L
HRP-Sonde	Endkonz. 5ng/µl	pH 7,5	
Waschpuffer (50ml)		Amplifikationspuffer (10ml)	
5 M NaCl	1,35 ml bei ≤ 20 % Formamid im HP; 0,42 ml bei ≥ 35 % Formamid im HP	10xPBS	1 ml
1 M Tris/HCl	1ml	10 %Blocking Reagenz	0,1 ml
0,5M EDTA	0,5ml	5M NaCl	4 ml
10% SDS	50µl	A.dest	ad 10ml
A.dest	ad. 50ml	Dextransulfat*	1 g
		*Puffer vor Zugabe auf 60°C erwärmt	
Substratmix (2ml)		Propidiumiodidlösung	
Amplifikationspuffer	1980µl	PI 1mg/ml	0,5ml
1µl 30 %H ₂ O ₂ in 200 µl	20µl (EK H ₂ O ₂ 0,0015%)	A.dest.	100ml
PBS			
FITC-Tyramid	4µl		

(c) Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer

Anteil Formamid im Hybridisierungspuffer	Formamid (ml)	A.dest (ml)	Sonde
0%	0	7	EUB, NONEUB
20%	2	5	ALF968
35%	3,5	3,5	BET42a, LD12-121

Tabelle 16: Verwendete Sonden und Spezifität

Bezeichnung	Spezifität/Zielgen	Sequenz 5'-3'	Quelle
EUB 338I	<i>Eubacteria</i> , 16S rRNA	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	[126]
EUB338 II	Planktomycetes, 16S rRNA	GCAGCCACCCGTAGGTGT	[127]
EUB338 III	Verrucomicrobia, 16S rRNA	GCTGCCACCCGTAGGTGT	[127]
NonEUB	Kompetitor für EUB, 16S rRNA	ACTCCTACGGGAGGCAGC	[128]
ALF968	Alphaproteobacteria, 16S rRNA	GGTAAGGTTCTGCGGTT	[129]
Alpha688	Alphaproteobacteria, 16S rRNA	TATCTACGAATTCACCT	[112]
LD12-121	LD12-clade (<i>Alphaproteobacteria</i>), 16S rRNA	CACAAGGCAGATCCACAT	[37]
BET42a	Betaproteobacteria, 23S rRNA	GCCTTCCCACTCGTTT	[130]

2.8 Sequenzanalyse und statistische Auswertung

Zur phylogenetischen Einordnung von Sequenziererergebnissen wurden die Datenbanken des ribosomal database project (rdp classifier [131]) bzw. des SILVA rRNA database project [122] verwendet. Für die Identifikation phylogenetisch verwandter Organismen wurde das BLAST-Tool von NCBI verwendet [132]. Alignments von Sequenzen wurden mit der Software MEGA V 5.0 [133] vorgenommen.

Die digitale Verarbeitung, Normalisierung und Clusteranalyse der DGGE-Profile wurde mit der Software BioNumerics V6.6 durchgeführt. Die Berechnung der Ähnlichkeitsmatrices beruhte auf dem Ähnlichkeitskoeffizienten nach Pearson (Pearsons Produkt-Moment-Korrelation, [134]). Die auf der Ähnlichkeitsmatrix basierende Gruppierung in hierarchische Cluster zur Dendrogrammdarstellung erfolgte nach der Methode UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean, [135]). Die NMDS basiert auf Präsenz-/ Absenz-Daten der normalisierten DGGE-Profile jeder Probe. Grundlage dafür ist die Erstellung einer binären Matrix mit der Information über das Vorhandensein von DGGE-Signalen bestimmter Laufhöhen für jede Probe. Dafür wurde zunächst ein band class matching mit allen Proben durchgeführt (1% Toleranz der Bandenhöhen-Differenz). Die im gesamten Datensatz vorkommenden Bandenhöhen werden so erfasst und durch die Klassenzuordnung der DGGE-Signale wird für jede Probe festgestellt, in welchen der vorkommenden Bandenhöhen ein Signal auftritt. Mit den exportierten Präsenz-/Absenz-Daten wurden anschließend weitere statistische Analysen mit der Software R V 2.2.1 [106] einschließlich der Softwarepakete vegan V 2.4-2. [136], lattice [137], permute [138] und BiodiversityR [139] durchgeführt. Die zweidimensionale Anordnung der Proben entsprechend der Ähnlichkeit ihrer DGGE-Signale durch die NMDS basierte auf dem Bray-Curtis-Koeffizienten. Anschließend wurde durch vector fitting die Wirkrichtung der Umweltparameter in die NMDS-Plots projiziert und die Stärke des statistischen Zusammenhanges zwischen den Umweltparametern und den DGGE-Profilen ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Meteorologische, physikalische und chemische Parameter

3.1.1 Übersicht Probenahmen

Die vier Untersuchungsstellen in der Vorsperre Forchheim (F) sowie der Talsperre Saidenbach (H, S, E) wurden von 2013 bis 2015 ab dem Eisaufbruch zur Frühjahrszirkulation bis zum Einsetzen der Herbstvollzirkulation im 4 - Wochen-Rhythmus beprobt. Die Probenahmeterminale sowie die an den jeweiligen Untersuchungsstellen herrschenden thermischen Schichtungsverhältnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Thermische Schichtungsverhältnisse an den vier Untersuchungsstellen sowie die Tiefe des Metalimnions an der Entnahmestelle (E_M [m]) der Probenahmezeitpunkte (Kalenderdatum + Jahrestag) 2013 bis 2015, S...Stagnation; Z..Zirkulation

2013		F	H	S	E	2014		F	H	S	E	E_M	2015		F	H	S	E	E_M
Tag	Datum					69	10.03.2014	Z	Z	Z	Z		75	16.03.2015	Z	Z	Z	Z	
112	22.04.2013	S	Z	Z	Z	104	14.04.2014	S	S	S	Z		103	13.04.2015	Z	Z	Z	Z	
141	21.05.2013	S	S	S	S	132	12.05.2014	S	S	S	S	4,5	131	11.05.2015	S	S	S	S	5,5
176	25.06.2013	S	S	S	S	154	03.06.2014	S	S	S	S	4,5	159	08.06.2015	S	S	S	S	7,5
						181	30.06.2014	S	S	S	S	6,5							
204	23.07.2013	S	S	S	S	209	28.07.2014	S	S	S	S	8,5	194	13.07.2015	S	S	S	S	9,5
232	20.08.2013	S	S	S	S	238	26.08.2014	S	S	S	S	11,5	222	10.08.2015	S	S	S	S	10,5
260	17.09.2013	S	S	S	S	265	22.09.2014	S	S	S	S	12,5	250	07.09.2015	S	S	S	S	11,5
288	15.10.2013	S	S	S	S	293	20.10.2014	Z	Z	Z	S	17,5							
316	12.11.2013	Z	Z	Z	Z	321	17.11.2014	Z	Z	Z	Z								

3.1.2 Meteorologische Charakterisierung der Untersuchungsjahre

Die Lufttemperaturen bedingen wesentlich die thermischen Schichtungsverhältnisse im Wasserkörper welche von entscheidender Bedeutung für die Wachstumsperiode der Phytoplankter als Primärproduzenten im Standgewässer sind. Die mit der Frühjahrsvollzirkulation beginnende Frühjahrsmassenentwicklung wird z.B. begrenzt durch das Absinken der Organismen aus der euphotischen Zone ab dem Einstellen der thermischen Schichtung. Die Monatsmittel der Lufttemperatur für die untersuchten Jahre 2013 bis 2015 (Abbildung 13) zeigen die deutlich niedrigeren Wintertemperaturen im Jahr 2013 gefolgt von einem späten, aber steilen Anstieg der Lufttemperaturen zwischen März und April. Im Winter 2013 / 2014 lagen die Monatsmittel der Lufttemperaturen stets über 0 °C, während 2014 / 2015 kurzzeitig Mittelwerte unter 0 °C (02/2015) erreicht wurden. Hinsichtlich der Sommertemperaturen zeigten August und September 2015 nicht nur im Vergleich der drei Untersuchungsjahre, sondern auch der langjährigen Vergleichswerte (1981 – 2010) deutlich erhöhte Monatsmittel [140].

3 Ergebnisse

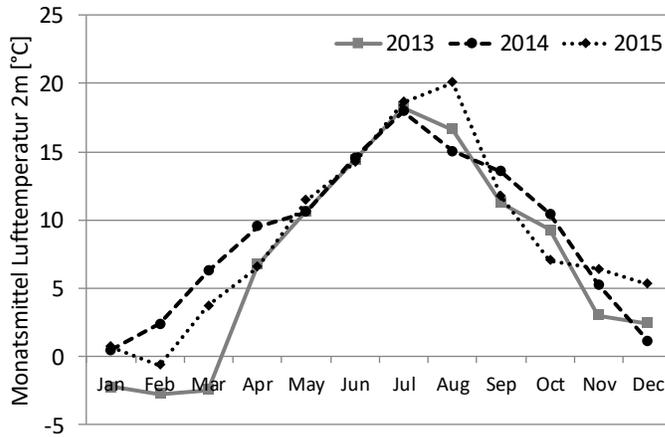


Abbildung 13: Monatsmittel der Lufttemperaturen in 2 m Höhe an der Station Forchheim (50.71 °N 13.27 °E; 600 m ü. NN); Datengrundlage [141]

Die resultierenden Temperatur- und Schichtungsverhältnisse im Bereich der Entnahmestelle in der Talsperre Saidenbach spiegeln die deutlichen Unterschiede der Lufttemperaturverhältnisse zwischen den untersuchten Jahren wider. Anhand der 14-tägigen Probenahmen der Ökologischen Station der TU Dresden sowie der Probenahmen durch die Untersuchungsstelle Reifland der Landestalsperrenverwaltung Sachsen können die Schichtungsverhältnisse an der Entnahmestelle zeitlich detaillierter dargestellt werden (Abbildung 14).

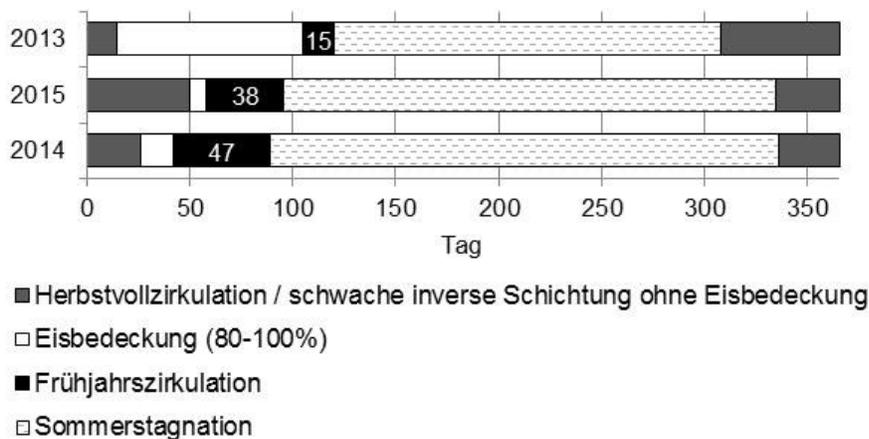


Abbildung 14: Zirkulations- und Schichtungsverhältnisse an der Entnahmestelle der Talsperre Saidenbach von 2013 bis 2015; Datengrundlagen (Temperaturprofile, Grad der Eisbedeckung) von: Landestalsperrenverwaltung Sachsen (Staumeisterei Saidenbach sowie Untersuchungsstelle Reifland (B. Schröter)) sowie Ökologische Station Neunzehnhain der TU Dresden (Dr. L. Paul)

Das Untersuchungsjahr 2013 war gekennzeichnet durch einen sehr späten Eisauflauf Mitte April. Die Frühjahrszirkulation, definiert als der Zeitraum zwischen dem Eisauflauf und dem Erreichen von Wassertemperaturen von über 4°C an der Oberfläche, setzte infolgedessen spät ein und dauerte aufgrund der schnellen Erwärmung der oberflächennahen Wasserschichten deutlich kürzer als in den Jahren 2014 und 2015. Im deutlichen Kontrast dazu bestand im Winter 2013/2014 auf der Talsperre keine durchgängige

3 Ergebnisse

Eisbedeckung, die Frühjahrsmassenentwicklung des Phytoplanktons setzte in beiden Jahren 2014 und 2015 etwa einen Monat früher ein als im Jahr 2013. Diese beiden Jahre wiesen auch eine länger anhaltende Sommerstagnationsphase auf, da die Herbstvollzirkulation zudem jeweils ca. drei Wochen später als 2013 einsetzte.

Niederschläge beeinflussen u.a. die Bodenerosion und damit den Eintrag von Nährstoffen und Bakterien in das Gewässer und wirken sich somit auf das Phytoplankton und die mikrobielle Gemeinschaft aus. Geringe Niederschläge führen zum Absinken des Stauspiegels, zusätzlich verstärkt durch die in Trockenzeiten eventuell notwendige Niedrigwasserbewirtschaftung der Talsperre. Durch Resuspension von Sedimenten in flacheren Bereichen der Talsperre kann es in diesen Perioden zu Nährstoffeinträgen kommen. Deutliche Auswirkung haben vor allem Starkniederschläge, bei denen aufgrund der verstärkten Oberflächenerosion Bodenmaterial in Zuflüsse und das Standgewässer eingetragen wird, was eine erhöhte Trübung und vor allem Zufuhr von Nährstoffen zur Folge hat. Die Niederschlagsverteilung in den untersuchten Jahren wies deutliche Unterschiede auf, wie die monatlichen Niederschlagssummen zeigen (Abbildung 15). Das Frühjahr 2015 war gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Trockenheit, die Niederschlagssummen im Mai und April lagen deutlich unter denen der Vorjahre. Anfang Juni 2013 kam es zu Starkniederschlägen, fast die Hälfte des monatlichen Niederschlags (143,3 mm von 304 mm) fiel im Zeitraum vom 1. bis 3. Juni (Abbildung 15), insgesamt fielen im Zeitraum vom 29. Mai bis 03. Juni 230 mm Niederschlag.

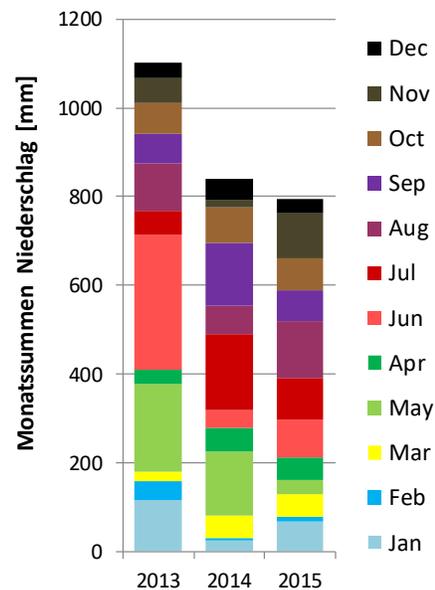


Abbildung 15: Monatssummen Niederschläge 2013 bis 2015 an der Wetterstation Forchheim (50.71°N 13.27°E; 600 m ü. NN); Datengrundlage [141]

Die mit dem Niederschlagsereignis verbundenen Stoffeinträge zeigten Auswirkungen auf verschiedene physikalische und chemische Parameter (Daten von Dr. L. Paul, TUD): Die im Juni eingetragenen Wassermassen schichteten sich im Bereich der Hauptstaumauer zwischen 5 und 15 m Tiefe ein, wie das deutliche Maximum der Trübung in diesem Bereich zeigt (Abbildung 16). Etwa ab Tag 175 -180 normalisierte sich die Trübung wieder, zum Zeitpunkt der entsprechenden Probenahme (25.5., Tag 176), hatte die Trübung in diesem Bereich der Talsperre bereits stark abgenommen.

3 Ergebnisse

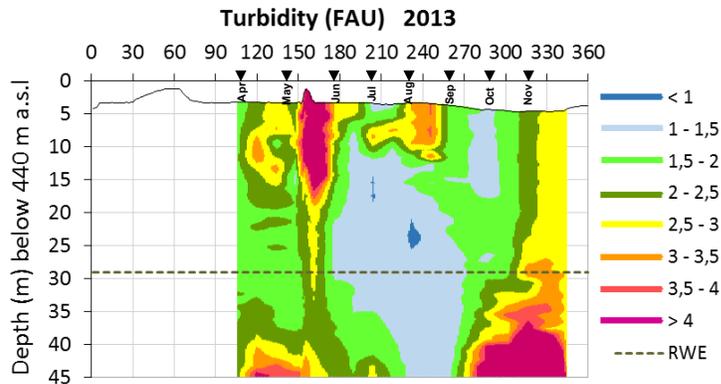


Abbildung 16: Verlauf der Trübung an der Entnahmestelle der Talsperre Saidenbach 2013 mit Kennzeichnung der monatlichen Probenahme, verändert nach: Dr. L. Paul, Ökol. Station Neunzehnhain, TUD (1.-3. Juni entsprechend Tag 152 bis 154 in der Abbildung)

Der Verlauf der Sichttiefe zeigt ähnliche Verhältnisse: Vor dem Starkregen betrug sie am 28.5. 2,4 m und war am 2.6. deutlich auf 0,85 m gesunken. Am 5.6. erreichte die Sichttiefe 1 m, am 10.6. bereits 2 m und zur Probenahme am 25.6. wurden an dieser Stelle wieder 2,6 m Sichttiefe ermittelt, was in etwa dem Wert vor den starken Regenfällen entspricht. Kenngrößen für die Nährstoffbelastung des Gewässers zeigen ebenfalls deutliche Anstiege in Zusammenhang mit den Niederschlägen Anfang Juni 2013: In den auf die starken Regenfälle folgenden ca. vier Wochen war ein deutlicher Anstieg des Gesamtphosphates in den Wasserschichten von 0-15m Tiefe zu verzeichnen (Abbildung 17). Der Anstieg des löslichen Phosphates fiel deutlich geringer aus und bestand wesentlich kürzere Zeit, da dieser im Unterschied zum partikulären Phosphor sehr schnell von den Planktonorganismen aufgenommen wird.

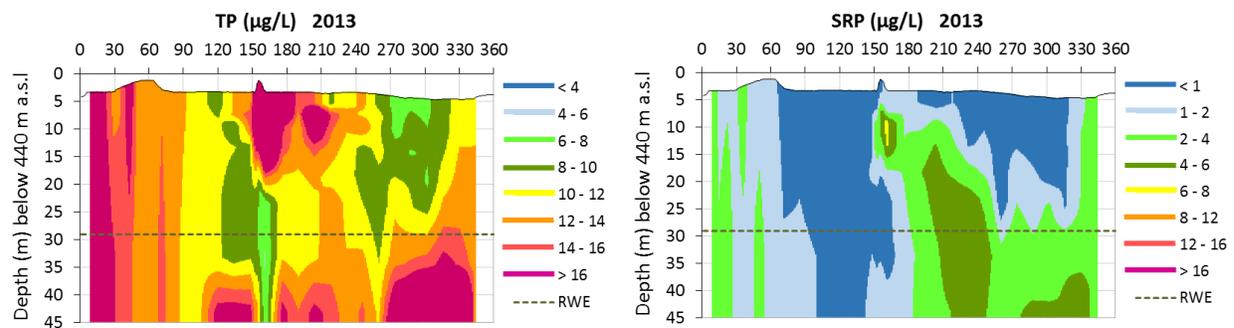


Abbildung 17: Gesamtphosphat (total phosphorus TP) und lösliches Phosphat (soluble reactive phosphate SRP) und an der Entnahmestelle der Talsperre Saidenbach 2013; nach: Dr. L. Paul, Ökologische Station Neunzehnhain, TU Dresden

In den Jahren 2014 und 2015 wurden keine vergleichbar hohen Niederschlagssummen binnen weniger Tage erreicht, die höchsten Werte lagen bei 79,6 mm Niederschlag für 8. - 10. Juli 2014 (darauffolgende Probenahme 28. 07. 2014) und 112 mm Niederschlag im Zeitraum 14. - 19. August 2015 (darauffolgende Probenahme 07. 09. 2015).

Eine weitere meteorologische Größe mit wesentlichem Einfluss auf biotische und abiotische Parameter des Wasserkörpers ist die Sonneneinstrahlung bzw. Globalstrahlung. Neben der Lichtversorgung des

3 Ergebnisse

Phytoplanktons trägt die Sonneneinstrahlung durch eine Erwärmung vor allem der oberen Wasserschichten zur Ausbildung und Stabilisierung der thermischen Schichtung im Wasserkörper bei. Eine Besonderheit hinsichtlich dieses Faktors zeigt im Vergleich der drei Untersuchungsjahre das Jahr 2015, dessen auffällig trockenes und sonniges Frühjahr sich vor allem im April und Mai durch deutlich höhere Monatsmittel der Globalstrahlung von den anderen Jahren abhebt. Auch im August und September wurden höhere Werte registriert als in den beiden vorhergehenden Jahren (Abbildung 18).

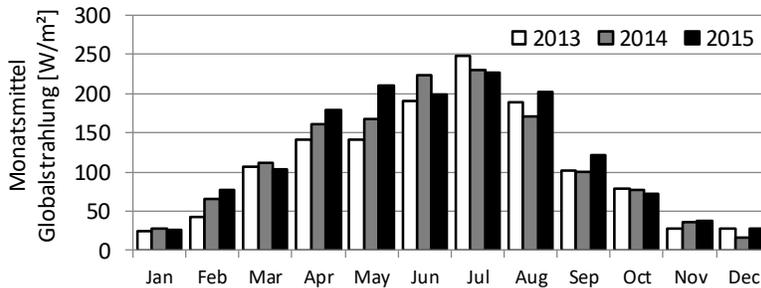


Abbildung 18: Monatsmittel der Globalstrahlung 2013 bis 2015 an der Wetterstation Forchheim (50.71°N 13.27°E; 600 m ü. NN); Datengrundlage [141]

3.1.3 Hydrophysikalische Parameter

Zu jeder Probenahme wurden wesentliche hydrophysikalische Kenngrößen (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit, Gesamtchlorophyllkonzentration¹) als vollständige Tiefenprofile mit Messungen aller 1 m aufgenommen sowie die Sichttiefe bestimmt (s. Anlage A1)

Die **Sichttiefe** und daraus abgeleitete Tiefe der euphotischen Zone wird beeinflusst durch eingetragene Trübstoffe sowie die Phytoplanktonentwicklung und wies von der Vorsperre Forchheim bis hin zur Entnahmestelle je Probenahmezeitpunkt eine Zunahme in Fließrichtung auf. Die höchsten Sichttiefen wurden im Juni und September 2015 mit 5,8 bzw. 5,9 m an der Entnahmestelle beobachtet, die niedrigste Sichttiefe innerhalb der Talsperre betrug an der Stelle H im September 2014 1,1 m. In der Vorsperre Forchheim lagen die Sichttiefen meist nur um 2 m, maximal wurden 3 m (April 2013) erreicht. Die euphotische Zone lag an den Probenahmestellen innerhalb der Hauptsperre H, S und E immer über 5 m außer an der Stelle H im Juni 2013 und September 2014 (Abbildung 19).

¹ Juni und November 2013, Juli 2015: Defekt Chlorophyllsonde; Daten Entnahmestelle Juni 2013 Dr. L. Paul, Ökol. Station Neunzehnhain, TUD

3 Ergebnisse

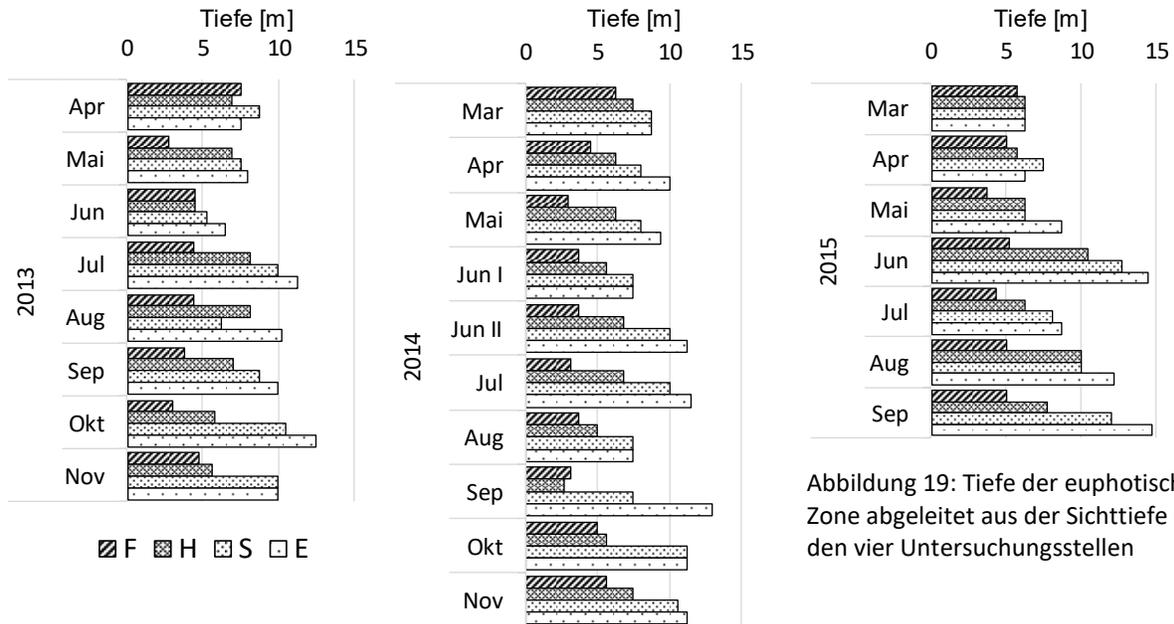


Abbildung 19: Tiefe der euphotischen Zone abgeleitet aus der Sichttiefe an den vier Untersuchungsstellen

Hinsichtlich der **Leitfähigkeit** als Maß für den Gesamt-Ionengehalt des Wassers wird für die TS Saidenbach seit 1991 eine kontinuierliche Abnahme beobachtet, die in Zusammenhang mit dem Rückgang von Calcium-, Nitrat- und Sulfatkonzentrationen steht [4]. In den hier ermittelten Tiefen-profilen zeigte sich jedoch für die Probenahmestellen der Talsperre ein Anstieg der Leitfähigkeit von 2013 bis 2015. Generell wurden in der Vorsperre etwas niedrigere Leitfähigkeiten ermittelt als für die

Untersuchungsstellen der Hauptsperre, was auch für die damit in Zusammenhang stehenden Chloridkonzentrationen gilt. Der Vergleich der mikrobiologisch näher untersuchten Beprobungstiefen zeigt deutlich diesen Unterschied zwischen Vorsperre und Hauptsperre (Abbildung 20) sowie erhöhte Werte für das Metalimnion der Entnahmestelle.

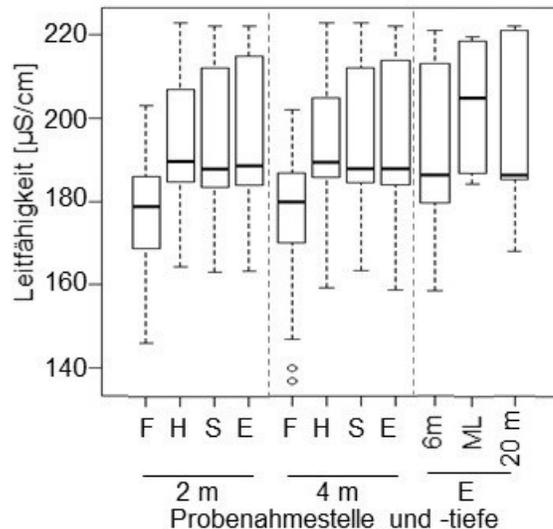


Abbildung 20: Elektrische Leitfähigkeit 2013 bis 2015 für 2 m und 4 m Wassertiefe aller Untersuchungsstellen sowie 6 m, Metalimnion und 20 m der Entnahmestelle

2013 lag die Leitfähigkeit an allen Probenahmestellen um $175\mu\text{S}/\text{cm}$. In der Talsperre wurden im Frühjahr die höchsten Werte gemessen, im Juni kam es zu einem sprunghaften Rückgang der Werte, vermutlich verursacht durch den Eintrag großer Mengen elektrolytarmen Regenwassers nach Starkniederschlägen Anfang Juni. Anschließend stiegen bis zum Ende des Jahres hin die Werte wieder an. In der Vorsperre

3 Ergebnisse

Forcheim nahmen die Werte dagegen allmählich im Verlauf des Jahres ab. 2014 wurden in der Hauptsperre bis August Werte von 185 – 190 $\mu\text{s}/\text{cm}$ registriert, danach traten sprunghaft höhere Werte um 210 $\mu\text{s}/\text{cm}$ auf. 2015 konnte in der Vorsperre ein sprunghafter Rückgang der Leitfähigkeiten von Werten um 200 $\mu\text{s}/\text{cm}$ bis Juni und 150-170 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ab Juli beobachtet werden. An der in Fließrichtung nächstgelegenen Probenahmestelle H war eine ähnliche Tendenz erkennbar, wobei die Werte der ersten Jahreshälfte mit ca. 220 $\mu\text{s}/\text{cm}$ höher lagen als in der Vorsperre und der Rückgang ab Juli weniger stark ausfiel. An den Stellen S und E lagen die Werte der Leitfähigkeit über das ganze Jahr hinweg eng beieinander im Bereich um 215-225 $\mu\text{s}/\text{cm}$.

Die Tiefenprofile der **Wassertemperatur** zeigten die typischen Schichtungsverhältnisse dimiktischer Gewässer. Die zunehmende Erwärmung des Oberflächenwassers beendet die Frühjahrsvollzirkulation, die sich herausbildende Sprungschicht verlagert sich im Verlauf der Saison in größere Tiefen bis zum Einsetzen der Herbstvollzirkulation. Während die thermische Schichtung in den tiefen Bereichen der Talsperre deutlich ausgeprägt ist, kommt es besonders in flacheren Bereichen und der Vorsperre durch Wind auch während der Sommerstagnation zu einer teilweisen oder vollständigen Durchmischung des Wasserkörpers. Vor allem die Zeiträume von Eisauflauf und Frühjahrszirkulation wiesen in den untersuchten Jahren deutliche Unterschiede auf, wie Abbildung 14 (vgl. Kap. 3.1.1) für die Schichtungsverhältnisse an der Entnahmestelle zeigt. Zufließendes Wasser schichtet sich seiner Temperatur entsprechend ein, wie z.B. die Zuflüsse der Starkniederschläge Anfang Juni 2013, die im Bereich der Entnahmestelle zwischen 5 und 15 m Tiefe vorübergehende Höchstwerte der Trübung und Nährstoffkonzentration verursachten.

Die **Sauerstoffkonzentration und -sättigung** im Gewässer wird wesentlich durch die photosynthetische Sauerstoffproduktion des Phytoplanktons und die Sauerstoffzehrung beim mikrobiellen Abbau organischer Substanz gesteuert. In Zusammenspiel mit der thermischen Schichtung ergeben sich im dimiktischen See typische saisonale und vertikale Gradienten. Die Frühjahrsmassenentwicklung führt zu einer hohen Sauerstoffsättigung in der euphotischen Zone, die sich aufgrund der Zirkulation über die gesamte Wassersäule verteilt. In den Jahren 2013 bis 2015 wurden zu diesen Zeitpunkten in der Vorsperre und an den Probenahmestellen der Talsperre zwischen 10,5 und 13,5 mg / l (ca. 100 - 115 %) Sauerstoff gemessen. Mit dem Einsetzen der thermischen Schichtung bildet sich im Bereich des Metalimnions aufgrund des Abbaus der dort angereicherten organischen Substanz ein Sauerstoffminimum. In Wasserschichten hoher photosynthetischer Aktivität wurden dagegen lokale Sauerstoffmaxima beobachtet. Im Bereich des Hypolimnions bildet sich im Spätsommer eine zunehmende Sauerstoffzehrung

3 Ergebnisse

aus, die erst durch die Herbstzirkulation aufgelöst wird. Die Sauerstoffkonzentration an der Entnahmestelle lag ab September in über 25 m Wassertiefe um 5 mg/l, 2013 wurden dabei im Oktober und November unterhalb von 30 m Werte unter 2,5 mg/l erreicht. In der Vorsperre Forchheim sowie an der Probenahmestelle H wurden in den Sommermonaten unterhalb 3 bzw. 4 m regelmäßig Sauerstoffgehalte zwischen 0 und 5 mg/l gemessen. An der Probenahmestelle S sowie an der Entnahmestelle bestanden in den Sommermonaten ausgeprägte metalimnische Sauerstoffminima mit Tiefstwerten von 0–1 mg/l (2–5%), die sich im Verlauf des Sommers zunehmend in größere Wassertiefen verlagerten.

Hinsichtlich der mikrobiologisch genauer untersuchten Wassertiefen sind die Sauerstoffkonzentrationen in der Beprobungstiefe 2 m in der Vorsperre am höchsten und sinken leicht in Fließrichtung. Für 4 m Wassertiefe sind die Verhältnisse jedoch umgekehrt, zudem weisen die Proben aus der Vorsperre und dem Vorbecken der Talsperre höhere Konzentrationsschwankungen auf. Das metalimnische Sauerstoffminimum an der Entnahmestelle zeichnet sich durch ca. 2 mg/l niedrigere Sauerstoffkonzentrationen aus (Abbildung 21).

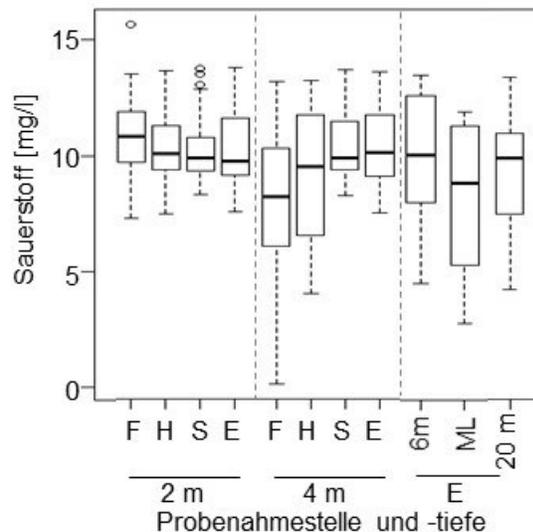


Abbildung 21: Sauerstoffkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung; ML=Metalimnion

Der **pH-Wert** im Wasserkörper wird maßgeblich durch die Phytoplanktonentwicklung und mikrobielle Abbauprozesse beeinflusst, die zu saisonalen Unterschieden und vertikalen Gradienten in der Wassersäule führen. Der verstärkte CO₂-Verbrauch durch das Phytoplankton v.a. in der euphotischen Zone führt zu einem Anstieg des pH-Wertes, mikrobielle Abbauvorgänge im Hypolimnion dagegen senken den pH-Wert. Langfristige Messungen ergaben für die TS Saidenbach keinen Trend hinsichtlich des mittleren pH-Wertes, allerdings spiegeln sich die stärkeren Frühjahrmassenerkennungen des Phytoplanktons seit 1990 in einem häufigeren Auftreten von pH-Werten > 9 wider, die zuvor kaum beobachtet worden waren [4]. An der Entnahmestelle wurden in allen untersuchten Jahren pH-Werte über 9 in den oberflächennahen Wasserschichten registriert, an den anderen Probenahmestellen der Talsperre sowie in der Vorsperre Forchheim nur in den Jahren 2014 und 2015.

3 Ergebnisse

In den Beprobungstiefen 2 m und 4 m steigt der pH-Wert im Vergleich der Probenahmestellen in Fließrichtung an (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). An der Entnahmestelle sinken die pH-Werte mit zunehmender Wassertiefe. Für die niedrigeren pH-Werte trotz höherer Phytoplanktonproduktion in der Vorsperre spielen eventuell mikrobielle Abbauprozesse eine Rolle, die durch den näheren Sedimentkontakt und die häufigere Durchmischung in dem flachen Gewässer stärkeren Einfluss auf die gesamte Wassersäule haben.

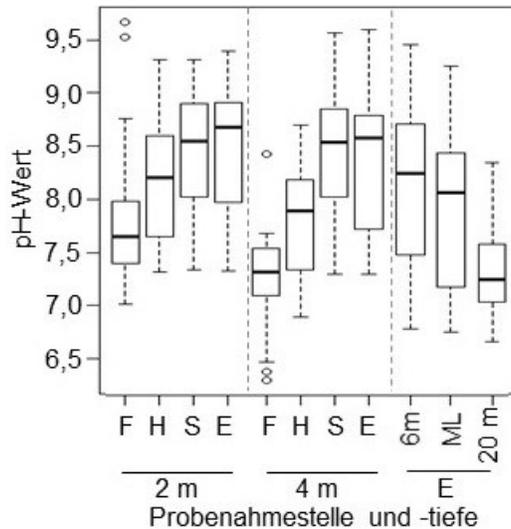


Abbildung 22: pH-Werte 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung; ML=Metalimnion

Die Entwicklung der Algenpopulation gemessen an der **Gesamtchlorophyllkonzentration** wird durch zahlreiche biotische und abiotische Faktoren gesteuert und hat selbst wiederum starken Einfluss auf verschiedene Parameter des Gewässerökosystems. Langzeituntersuchungen an der TS Saidenbach zeigten, dass trotz verringerter Nährstoffgehalte die Phytoplanktobiomasse ab 1990 zunahm. Klimatische Veränderungen mit Einfluss auf die thermischen Schichtungsverhältnisse führten zu stärkeren Frühjahrsmassenentwicklungen sowie einer Veränderung des Artenspektrums mit einer Zunahme an Cyanobakterien in den Sommermonaten [87]. Im Vergleich der Probenahmestellen in 2 m Wassertiefe

sinkt die mittlere Chlorophyllkonzentration von der Vorsperre mit der Fließrichtung und erreicht in der Hauptsperre bei S und E ein ähnlich niedriges Niveau (Abbildung 23). In 4 m Wassertiefe sind die Verhältnisse zwischen Vorsperre und Unterwasservorbecken (H) umgekehrt, an der Stelle H werden sogar höhere Konzentrationen erreicht als in der

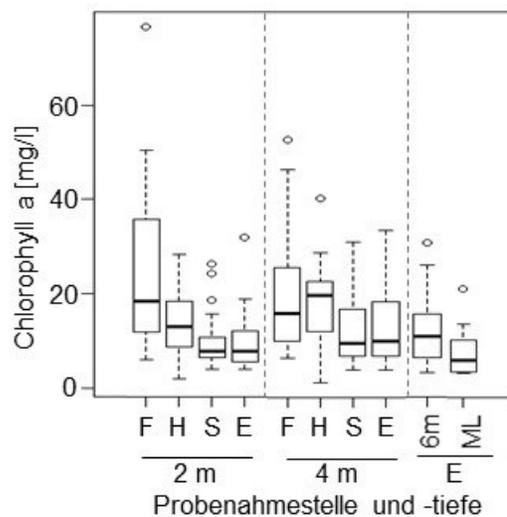


Abbildung 23: Chlorophyll-a-Konzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung; ML=Metalimnion

Vorsperre, was durch die höhere Trübung und damit schlechtere Lichtversorgung in dieser Tiefe der Vorsperre bedingt sein kann.

3 Ergebnisse

2013 begann die Frühjahrsmassenentwicklung in der Hauptsperre aufgrund des späten Eisaufbruchs erst im April und erreichte sowohl in der Vorsperre als auch in der Hauptsperre Werte um $10 \mu\text{g/l}$. Die höchsten Chlorophyllkonzentrationen in der Vorsperre wurden 2013 mit Werten um $40 \mu\text{g/l}$ im Oktober erreicht, wobei ein Zusammenhang zu Nährstoffmobilisierung durch Bauarbeiten im Bereich der Zuflüsse möglich ist. Das Sommermaximum in der Vorsperre erreichte mit knapp $40 \mu\text{g/l}$ im Juli (F 2m) im Vergleich zu 2014 und 2015 deutlich geringere Werte. Die in Fließrichtung folgende Untersuchungsstelle H wies 2013 ebenfalls erhöhte Chlorophyllkonzentrationen im Oktober auf (ca. $20 \mu\text{g/l}$), das Sommermaximum im August war jedoch mit $40 \mu\text{g/l}$ (4 m) deutlicher ausgeprägt. An der Stelle S bestand zusätzlich zu höheren Konzentrationen im Juli und August ($15 - 20 \mu\text{g/l}$) im Mai in 6 m Wassertiefe mit $22,6 \mu\text{g/l}$ die höchste Chlorophyllkonzentration des Jahres. Erhöhte Werte im Oktober konnten an dieser sowie der in Fließrichtung folgenden Entnahmestelle nicht mehr beobachtet werden. Die Höchstwerte der Chlorophyllkonzentration lagen 2013 an der Entnahmestelle in den Monaten Juli und August (E 4 m Juli $34 \mu\text{g/l}$), wobei vor allem das Chlorophyllmaximum im Juli sehr eng begrenzt in einer Wassertiefe von 3m auftrat. Die Starkniederschläge Anfang Juni 2013 spiegelten sich zur darauffolgenden Probenahme Ende Juni (25. 6.) nicht mehr in den aufgenommenen Parametern wider, die Chlorophyllkonzentrationen waren zu diesem Zeitpunkt auch nicht auffällig erhöht (Ökologische Station Neunzehnhain, TU Dresden). Das verhältnismäßig stark ausgeprägte Chlorophyllmaximum im Juli könnte jedoch durch den zusätzlichen Nährstoffeintrag mit den Starkniederschlägen von Anfang Juni mit verursacht worden sein. Parallel zur erhöhten Photosyntheseaktivität traten auch die höchsten pH-Werte auf, an der Entnahmestelle wurden von Mai bis August in 0-4m Werte zwischen 8,5 und 9,2 erreicht. Diese Maximalwerte fielen jedoch deutlich niedriger aus als 2014 und 2015. Im Frühjahr und Herbst wurden mit ca. 7,5 ebenfalls niedrigere pH-Werte als zu vergleichbaren Zeiten der anderen beiden Untersuchungsjahre beobachtet. Die pH-Werte in 0-2m der Vorsperre erreichten maximal 8 und lagen damit in den Sommermonaten deutlich niedriger als 2014 und 2015, worin sich die niedrigere Photosyntheseaktivität widerspiegelt. Auch an der Untersuchungsstelle H im Vorbecken der Hauptsperre traten mit maximal 8,8 vergleichsweise niedrige Maximalwerte (Juni, August) auf.

Nach einem milden Winter 2013 / 2014 ohne durchgehende Eisbedeckung der Talsperre traten die höchsten Chlorophyllkonzentrationen des Jahres **2014** an den Stellen S und E im März sowie Mai und Anfang Juni auf. Die Chlorophyllkonzentrationen im Frühsommer lagen zwar über denen von 2013, dafür traten 2014 keine ausgeprägten Chlorophyllmaxima zwischen Juli und September auf, wie es besonders 2013 der Fall war. Entsprechend wurden auch im Bereich der metalimnischen Sauerstoffminima von August bis Oktober nicht so niedrige Werte erreicht wie 2013. Während in der Vorsperre Forchheim auch

3 Ergebnisse

im Mai und Juni mit 40 bzw. 50µg/l hohe Chlorophyllkonzentrationen verzeichnet wurden, traten die Höchstwerte von 77µg/l Chlorophyll im Juli auf und erreichten damit ähnliche Dimensionen wie 2015 (August). Im Vorbecken der Talsperre (H) wurden ebenfalls im Juli die Maximalwerte der Chlorophyllkonzentration beobachtet, die mit 32 µg / l jedoch unter den Höchstwerten von 2013 und deutlich unter denen 2015 lagen.

Im Unterschied zu den anderen Untersuchungsjahren traten **2015** an den Stellen E und S die höchsten Chlorophyllkonzentrationen des Jahres im März und April auf. Die Konzentrationen von ca. 30 µg / l (E März und April, S April) sind auf die außergewöhnlich sonnigen Wetterlage im Frühjahr 2015 zurückzuführen. Trotz einer leichten Erhöhung der Wassertemperaturen von März zu April bestand an beiden Untersuchungsstellen zu diesem Zeitpunkt noch Vollzirkulation. Die Sauerstoffgehalte waren in den Frühjahrsmonaten 2015 mit 13,5 nur ca. 0,5 mg / l höher als in den beiden vorangegangenen Jahren. Die pH-Werte zeigten jedoch deutlich die hohe Photosyntheseaktivität, während im März noch pH 8,3 – 8,4 über die gesamte Wassersäule erfasst wurde, hatte sich im April der pH-Wert in den oberen 4 m bereits auf 8,8 erhöht. Die Sommermaxima an den beiden Stellen S und E wurden mit 22µg/l bzw. 24µg/l im August erreicht und fielen im Vergleich zu 2013 geringer aus. Hinsichtlich des Sauerstoffgehaltes prägte sich an der Entnahmestelle erst im September ein lokales Minimum in 10 bis 12 m Wassertiefe aus, während im Juli und August im Unterschied zu den Vorjahren kein ausgeprägtes Minimum vorhanden war. Im Unterschied zu den Untersuchungsstellen E und S wurden in der Vorsperre Forchheim sowie der in Fließrichtung folgenden Untersuchungsstelle H zwar ebenfalls leicht erhöhte Chlorophyllkonzentrationen im Frühjahr gemessen (v.a. H 2m März 28 µg / l), die Sommermaxima waren jedoch deutlich ausgeprägter. Sie wurden ebenso wie an den Stellen S und E im August erreicht und betrugen in der Vorsperre 70µg/l (3m), an der Stelle H 80 µg/l (5m). Dieser Wert stellt mit Abstand die höchste Chlorophyllkonzentration für die Untersuchungsstelle H von 2013 bis 2015 dar und spiegelt sich auch im höchsten dort gemessenen pH-Wert von 9,4 und einem lokalen Sauerstoffmaximum (12mg/l im Vergleich zu 10mg/l in der übrigen Wassersäule) in 3m Wassertiefe wider.

3.1.4 Chemische Parameter

Wesentliche chemische Parameter der Wasserproben wurden in den Jahren 2014 und 2015 für 2 m und 4 m Wassertiefe aller Probenahmestellen sowie aus dem Metalimnion und 20 m Tiefe an der Entnahmestelle bestimmt (s. Anlage A2). Für 2013 wurden ebenfalls für alle Untersuchungsstellen Proben aus 2 m Tiefe analysiert, sowie aus 4 m Tiefe der Stellen F, H und S (Juni und August-November 2013) und 20 m Tiefe an der Entnahmestelle ab Juni 2013.

3 Ergebnisse

Als Stickstoffverbindungen spielen im Gewässer vor allem Ammonium, Nitrit und Nitrat eine Rolle. **Ammonium** wird vom Phytoplankton bevorzugt als Stickstoffquelle aufgenommen und ist daher meist nur in sehr niedrigen Konzentrationen nachweisbar. Höhere Ammoniumkonzentrationen sind zumeist ein Hinweis auf einen Eintrag von Verunreinigungen z.B. durch Landwirtschaft oder häusliche Abwässer. Die ermittelten Ammonium-Konzentrationen lagen bis auf wenige Ausnahmen unter 0,2 mg/l, in den meisten Proben unter 0,1 mg/l. In Fließrichtung gehen die Ammoniumkonzentrationen in gleicher

Wassertiefe an den Probenahmestellen leicht zurück, die Werte in 2 m Tiefe lagen über denen in 4 m Wassertiefe (Abbildung 24). An der Entnahmestelle lagen die Ammoniumkonzentrationen im Bereich des Metalimnions meist geringfügig über denen in 2 m Wassertiefe. Saisonale Schwankungen wurden nicht beobachtet, im Vergleich der Untersuchungsstellen traten auffällige

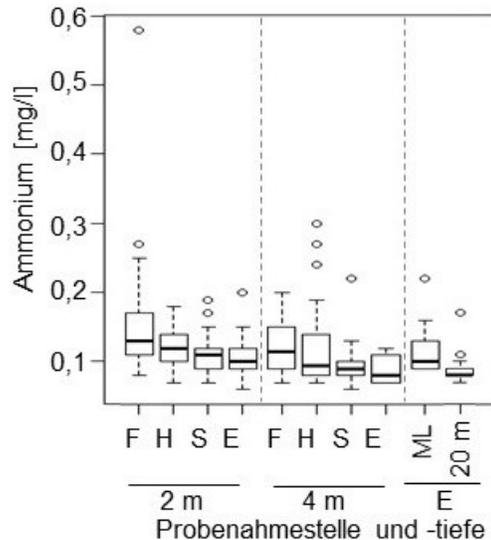


Abbildung 24: Ammoniumkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung; ML=Metalimnion

Maximalwerte nur in der Vorsperre Forchheim (0,58 mg/l und 0,27 mg/l April und Mai 2013, 2m; 0,25 mg/l August 2014, 2m) und an der Untersuchungsstelle H (0,3 mg/l August 2013, 4m; 0,27 mg/l und 0,24 mg/l September und Oktober 2014, 4m) auf.

Nitrit tritt als Zwischenprodukt bei der Nitrifikation nur auf, wenn die Weiterreaktion zu Nitrat durch Sauerstoffmangel gehemmt wird. Es wurde in keiner der hier analysierten Proben nachgewiesen. Auch die langjährigen Datenreihen für die Talsperre Saidenbach zeigten nur selten leicht erhöhte Werte im sedimentnahen Bereich bei stärkerem Sauerstoffverbrauch im Spätsommer [4]. Die wesentliche **Nitrat**quelle für die Talsperre Saidenbach stellen die Zuflüsse dar, die das leicht lösliche Ion aus den umliegenden landwirtschaftlich genutzten Flächen einbringen [4]. Saisonale Unterschiede der Nitratkonzentration werden vorwiegend durch den verstärkten Eintrag von Nitrat mit den Zuflüssen im Frühjahr sowie verstärkte Nitratatmung (dissimilatorische Nitratreduktion) im sedimentnahen Bereich bei zunehmend anoxischen Verhältnissen gegen Ende des Sommers verursacht während in der Vegetationsperiode des Phytoplanktons in der eutrophen Zone Nitrat verbraucht wird [5]. In Einklang mit den langjährigen Untersuchungen der Talsperre Saidenbach [4], wiesen die Nitratkonzentrationen in allen

3 Ergebnisse

drei Untersuchungsjahren einen deutlichen Jahresgang auf, mit Maxima von 4 – 5,5 mg/l in den Frühjahrs- und Wintermonaten und Minima von 2 – 3 mg/l in den Sommermonaten. Vor allem in Monaten mit allgemein höheren Nitratkonzentrationen werden in der Vorsperre mit 1 – 3 mg/l etwas höhere Werte erreicht als in der Hauptsperre (v. a. Oktober 2013 bis April 2014 und Oktober 2014 bis Mai 2015), während die Verhältnisse in den Sommermonaten häufig umgekehrt waren. Im Bereich des Hypolimnions (20 m Tiefe) an der Entnahmestelle waren die saisonalen Konzentrationsschwankungen deutlich geringer ausgeprägt. Die höchste Nitratkonzentration wurde mit 6 mg/l im Bereich des Metalimnions (Oktober 2014) an der Entnahmestelle gemessen.

Im Vergleich der Untersuchungsstellen liegen die mittleren Nitratkonzentrationen in der Vorsperre deutlich über denen in der Hauptsperre, innerhalb der Hauptsperre ist ein Anstieg der Konzentrationen in Fließrichtung (v. a. in 4 m Wassertiefe) zu beobachten (Abbildung 25). Darüber hinaus sind auch die Schwankungen der Nitratkonzentrationen in der Vorsperre und im Vorbecken der Talsperre am höchsten.

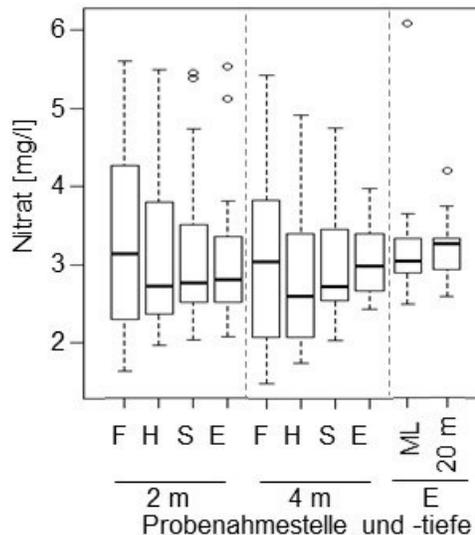


Abbildung 25: Nitratkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung; ML=Metalimnion

Wie in den meisten limnischen Ökosystemen spielt auch in der Talsperre Saldenbach Phosphat als wachstumslimitierender Nährstoff für das Phytoplankton eine wesentliche Rolle (u.a. [4]). **Orthophosphat** als pflanzenverfügbare Phosphorquelle war daher meist nur in sehr geringen Konzentrationen (0,001 mg/l – 0,005 mg/l) im Wasser nachweisbar. Die Konzentrationen unterlagen kaum saisonalen Schwankungen oder wiesen Unterschiede zwischen den Probenahmestellen auf. Als einzige Ausnahmen fallen Proben aus dem Frühjahr 2013 auf (April 2013 F, H und S 2 m) mit Konzentrationen von 0,014–0,016 mg/l: Der dieser Probenahme vorangegangene außergewöhnlich lange Winter mit Eisbedeckung ermöglichte eventuell eine besonders intensive Akkumulation von Nährstoffen durch den mikrobiellen Abbau der Biomasse. Darüber hinaus kann der Zeitpunkt der Probenahme kurz nach dem Eisaufruch dazu beitragen, dass die beginnende Frühjahrsmassenentwicklung des Phytoplanktons noch nicht zum Verbrauch dieses Nährstoffes führen konnte. An der Untersuchungsstelle H wurden im November 2014 mit 0,07 mg/l (2 m) bzw. 0,14 mg/l (4 m) die höchsten Orthophosphat-Konzentrationen der drei Untersuchungsjahre ermittelt. Die Ursache dafür könnten Bauarbeiten o. ä. in Verbindung mit verstärktem

3 Ergebnisse

Zufluss und Sedimenteintrag sein. Meteorologische Ursachen wie Starkregenereignisse wurden in diesem Zeitraum nicht registriert, zudem zeigten die anderen Untersuchungsstellen keine vergleichbaren Auffälligkeiten.

Die **Sulfatkonzentrationen** lagen zwischen 8,8 – 18,5 mg/l, wobei die Werte 2013 mit ca. 10 – 10,5 mg/l allgemein unter denen der beiden anderen Untersuchungsjahre (12 - 14 mg/l) lagen.

Zwischen den Probenahmestellen war ein leichter Anstieg der Konzentrationen in Fließrichtung erkennbar (Abbildung 26). Saisonal wurden im Frühjahr um 2 - 4 mg/l erhöhte Werte gegenüber den Proben der anderen Monate gemessen. Darüber hinaus traten im November 2014 sowie im Juni 2015 an allen Probenahmestellen ähnlich erhöhte Konzentrationen auf.

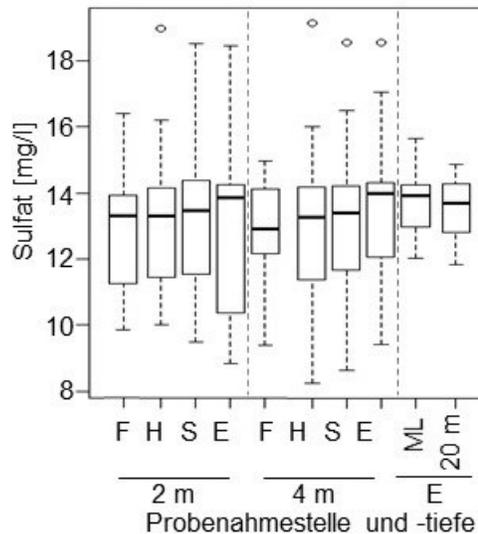


Abbildung 26: Sulfatkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung; ML=Metalimnion

Die **Chloridkonzentrationen** lagen im Bereich von 10 – 23 mg/l. In der Vorsperre Forchheim wurden allgemein um 2-5 mg/l niedrigere Werte gemessen als in der Hauptsperre, wo Proben von H und S oft etwas höhere Werte aufwiesen als Proben von der Entnahmestelle (Abbildung 27). Saisonale Schwankungen hinsichtlich dieses Parameters waren sehr gering.

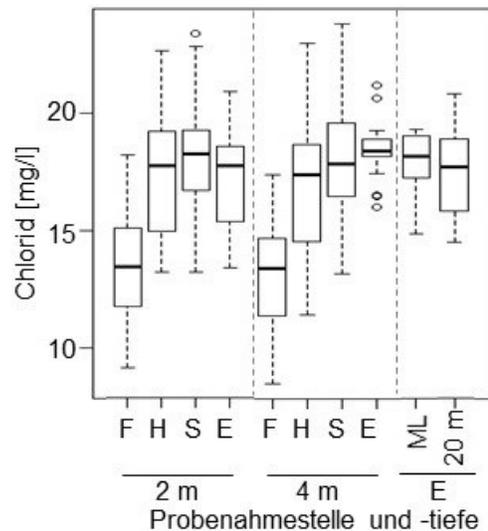


Abbildung 27: Chloridkonzentrationen 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung; ML=Metalimnion

Die Konzentrationen lagen in den Jahren 2013 und 2014 an allen Probenahmestellen in den ersten beiden Probenahmeterminen der jeweiligen Saison um ca. 3 mg/l höher als im übrigen Jahr. Da Streusalze eine der Hauptquellen für den Eintrag von Chlorid in Gewässer darstellen, stehen die höheren Konzentrationen nach dem Winter eventuell damit in Zusammenhang.

Für die **Acetatkonzentrationen** wurden ohne saisonale oder lokale Trends Werte zwischen 0 mg/l und 1 mg/l bestimmt, wobei die Bestimmungsgrenze der verwendeten Methode bei 0,5 mg/l Acetat liegt.

3 Ergebnisse

Die am häufigsten gemessenen Werte zwischen 0,4 mg/l und 0,6 mg/l müssen vor diesem Hintergrund betrachtet werden, ebenso wie Proben für die 0 mg/l Acetat bestimmt wurden.

Die Konzentration an gelöstem **Eisen** ist im Bereich des Epilimnions aufgrund seiner Lösungseigenschaften meist sehr gering und wird zudem durch Fällung, Adsorption und Aufnahme durch die Primärproduzenten verringert. Niedrige Sauerstoffsättigungen (< 50 %) und pH-Werte (< 7,5) sowie hohe Gehalte an freiem CO₂ und organischem Material ermöglichen es, dass Eisen (II)-Verbindungen vermehrt in Lösung bleiben, diese Bedingungen treten jedoch vor allem im Hypolimnion auf [142]. Die ermittelten Eisenkonzentrationen lagen zwischen 0 und 0,25 mg/l, die höchste Konzentration wurde in einer Probe aus dem Metalimnion der Entnahmestelle im Juli 2014 mit 0,41 mg/l gemessen. Auch im August 2014 sowie im Juli und August 2015 wurden im Bereich des Metalimnions leicht erhöhte Werte im Vergleich zu den anderen Probenahmestellen und – tiefen bestimmt. Die **Mangankonzentrationen** lagen meist unter 0,06 mg/l. Auffällige Ausnahmen traten im Mai 2014 an den Probenahmestellen F 2 m 0,37 mg/l und S 2 m (0,33 mg/l) auf, an der in Fließrichtung dazwischenliegenden Probenahmestelle H wurden nur 0,12 mg/l gemessen. Die Löslichkeitseigenschaften von Mangan ähneln dem des Eisens, die Eisenkonzentrationen in den beiden auffälligen Proben lagen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze von 5 µg/l, sodass Bedingungen, die zu einer erhöhten Löslichkeit beider Stoffe führen, nicht als Ursache in Frage kommen. Die Mangan-Konzentrationen in 4 m Wassertiefe wiesen generell stärkere Schwankungen auf mit Maximalwerten von 0,16 mg/l (F 4 m September 2013, H 4 m September 2014). Ein Anstieg der hypolimnischen Eisen- und Mangan-Konzentrationen im Spätsommer bis zur Herbstvollzirkulation wurde im sedimentnahen Bereich des Hypolimnions aufgrund der Sauerstoffzehrung auch für die Talsperre Saidenbach beobachtet [4], konnte hier jedoch anhand der Werte für 20 m Wassertiefe an der Entnahmestelle nicht festgestellt werden.

Hinsichtlich des Kohlenstoffhaushaltes im Gewässer wurden die Parameter **DIC**, **DOC** sowie **DTC** bestimmt. Als langfristiges Mittel sind für die Talsperre Saidenbach 5,2 mg C /l bekannt, Tiefstwerte traten dabei meist in Perioden starker Phytoplanktonentwicklung und damit bei hohem Kohlenstoffverbrauch und entsprechend hohen pH-Werten auf [4]. In den hier untersuchten Jahren lagen die DIC-Konzentrationen meist zwischen 4,5 und 6,5mg/l. Höhere Werte traten vorwiegend in den Hochsommermonaten auf, wie die Maximalwerte um 7,5 mg/l im Juli und August 2014 in der Vorsperre Forchheim sowie der Probenahmestelle H. Tiefstwerte an allen Probenahmestellen wurden im Mai und Juli 2013 mit Konzentrationen < 2 mg/l registriert, wogegen zur dazwischenliegenden Probenahme im Juni Werte um 4 mg/l ermittelt wurden. Die DOC-Konzentrationen wiesen ebenfalls im Jahr 2013 die stärksten

3 Ergebnisse

Schwankungen auf und reichten von 2 bis 9 mg/l. Spitzenwerte wurden häufig, jedoch nicht ausschließlich, in der Vorsperre Forchheim registriert (7 - 9 mg/l: April, August, Oktober 2013, März, August 2015). 2014 traten die höchsten Konzentrationen an der Untersuchungsstelle H im Juli auf, als bereits ein sehr niedriger Wasserstand im Unterwasservorbecken und der Talsperre erreicht war. Auffällig hohe Konzentrationen an der Entnahmestelle, wo sonst häufig die geringsten DOC-Werte bestimmt wurden, traten im April 2013 mit 9 mg/l auf. Im Vergleich der Untersuchungsstellen (Abbildung 28) in 2 und 4 m Wassertiefe ist der DIC in der Vorsperre am niedrigsten und am höchsten im Bereich des Metalimnions an der Entnahmestelle. Die DOC-Konzentrationen dagegen sind vor allem in 2 m Wassertiefe in der Vorsperre am höchsten und gehen in Fließrichtung zurück. Für 4 m Wassertiefe sind die Werte fast auf gleichem Niveau. In der Summe ergeben sich für den DTC in 2 m Wassertiefe ähnliche Werte für die Vorsperre und die Stelle S, die höchsten Werte für das Unterwasservorbecken der Hauptsperre und die niedrigsten Konzentrationen für die Entnahmestelle. In 4 m Wassertiefe liegen die Konzentrationen an den Probenahmepunkten F, H und S auf ähnlichem Niveau, während sie an der Entnahmestelle in 4 m geringer, im Metalimnion dagegen deutlich höher sind.

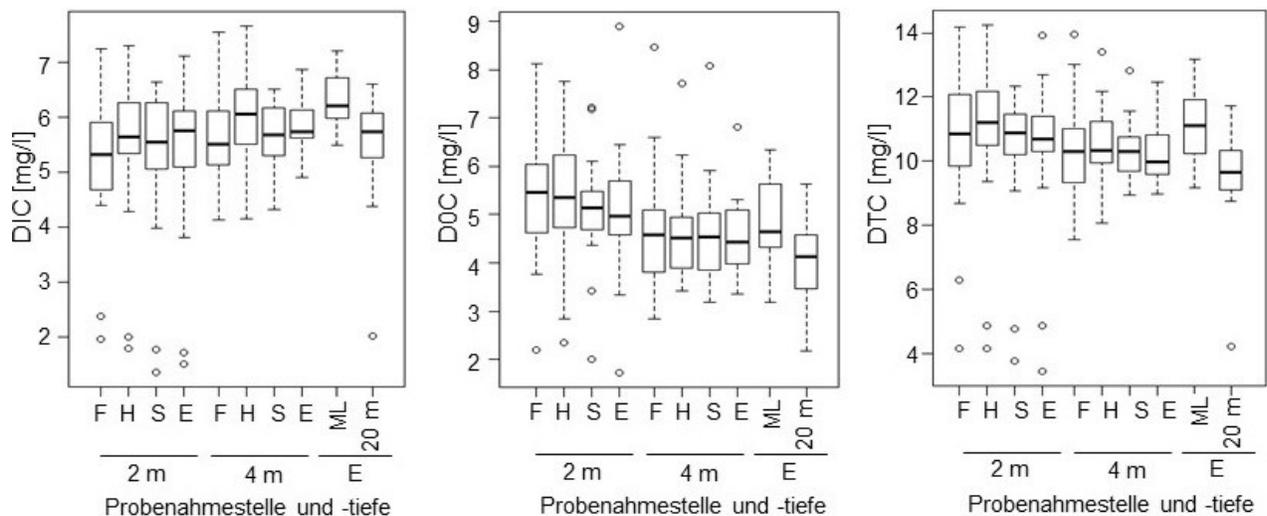


Abbildung 28: Konzentrationen von DIC, DOC und DTC 2013 bis 2015 in 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen in Fließrichtung; ML=Metalimnion

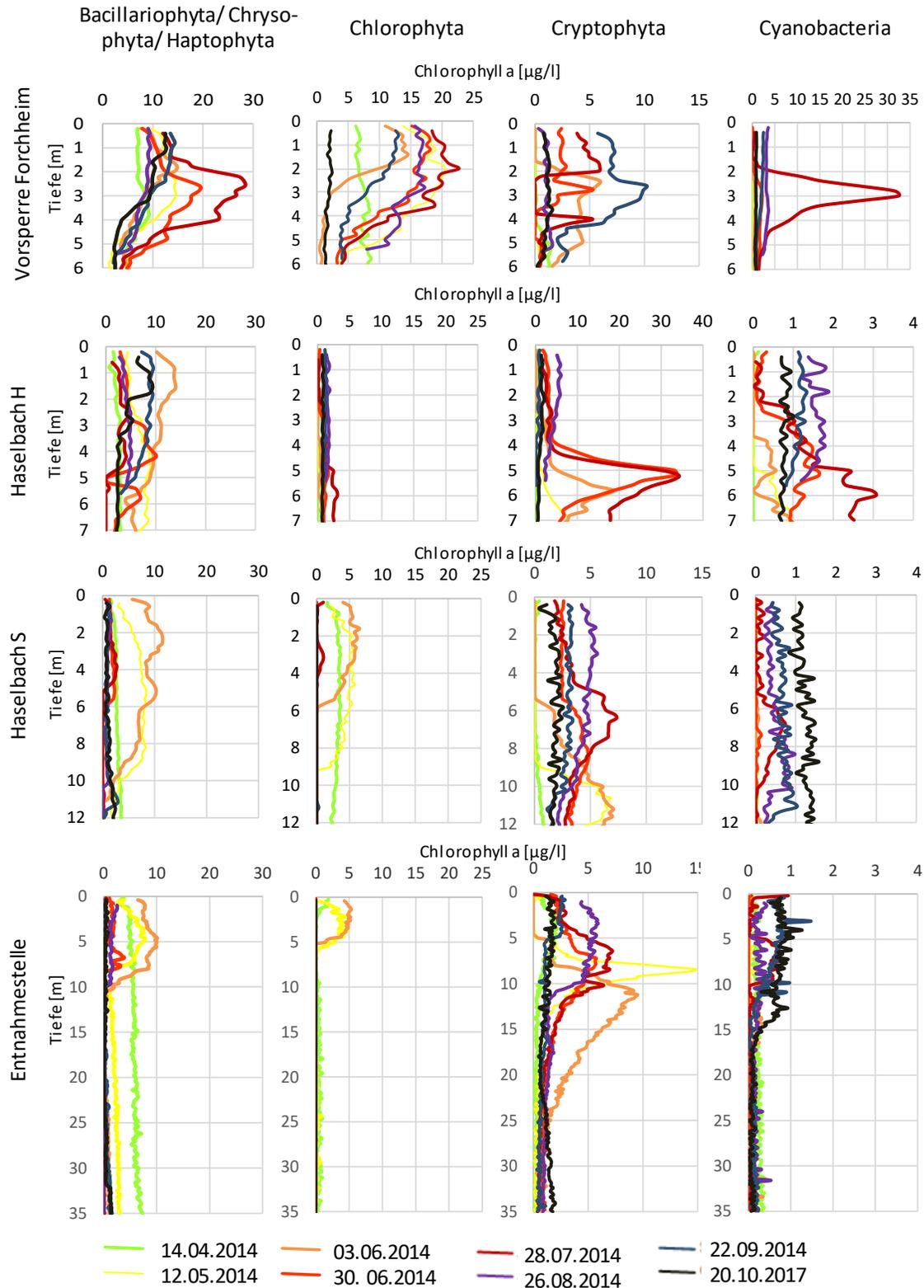
3.2 Spektrofluorometrische Erfassung von Phytoplanktongruppen

3.2.1 Saisonale Entwicklung der Phytoplanktongruppen anhand der Sondenmessungen

Von April bis November 2014 wurden mit Hilfe der FluoroProbe-Sonde (bbe Moldaenke GmbH, Schwentental, D) Tiefenprofile von Phytoplanktongruppen entsprechend ihrer spektralen Eigenschaften an den vier Untersuchungsstellen aufgenommen. Die fluoreszenzbasierte Sondenmessung erlaubt die Unterscheidung von Diatomeen (incl. Chrysophyceen, Haptophyceen, Dinophyceen), Grünalgen, Cryptophyceen und Cyanobakterien. Diatomeen und Grünalgen waren an allen Untersuchungsstellen im Jahresverlauf die bedeutsamsten Gruppen, sie bildeten auch den größten Anteil der Frühjahrsmassenentwicklung aus. Cryptophyceen erreichten in einzelnen Tiefen und Monaten an den Untersuchungspunkten in der Talsperre Saidenbach höhere Konzentrationen als die anderen Algengruppen. Die Etablierung der Cyanobakterienpopulation erfolgte erst im Anschluss an die Massenentwicklungen der anderen Algengruppen in den Sommer- und Spätsommermonaten bis in den Herbst hinein. Die Tiefenprofile der Konzentrationen einzelner Algengruppen im Vergleich der Monate am Beispiel der Entnahmestelle zeigen deutlich den Schwerpunkt der Entwicklung bei den Diatomeen und Grünalgen in den Frühjahrsmonaten, bei den Cyanobakterien dagegen im Sommer und Spätsommer (Abbildung 29). Im Vergleich der Untersuchungsstellen nahmen die Konzentrationen der Algengruppen allgemein in Fließrichtung von der Vorsperre hin zur Entnahmestelle ab. Die Darstellung der Ergebnisse für die Monate April (Zirkulation), Mai (Frühjahrsmassenentwicklung, beginnende Schichtung), Juli (Schichtung) und Oktober (Ende Schichtung/Beginn Zirkulation)) zeigt für die Grünalgen in der Vorsperre Forchheim ebenso hohe bis etwas höhere Konzentrationen wie für Diatomeen (Abbildung 30). Das Verhältnis dieser beiden Algengruppen kehrt sich an den Untersuchungsstellen in Fließrichtung bis zur Entnahmestelle hin um: Am Untersuchungspunkt im Haselbacharm der Talsperre Saidenbach vor der Unterwasserstaumauer erreichen beide Gruppen zum Zeitpunkt der Frühjahrsmassenentwicklung ähnliche Konzentrationen, bereits in Fließrichtung nach der Unterwasserstaumauer erreichen die Diatomeen etwas höhere Konzentrationen als die Grünalgen. An der Entnahmestelle besteht schließlich eine deutliche Dominanz der Diatomeen.

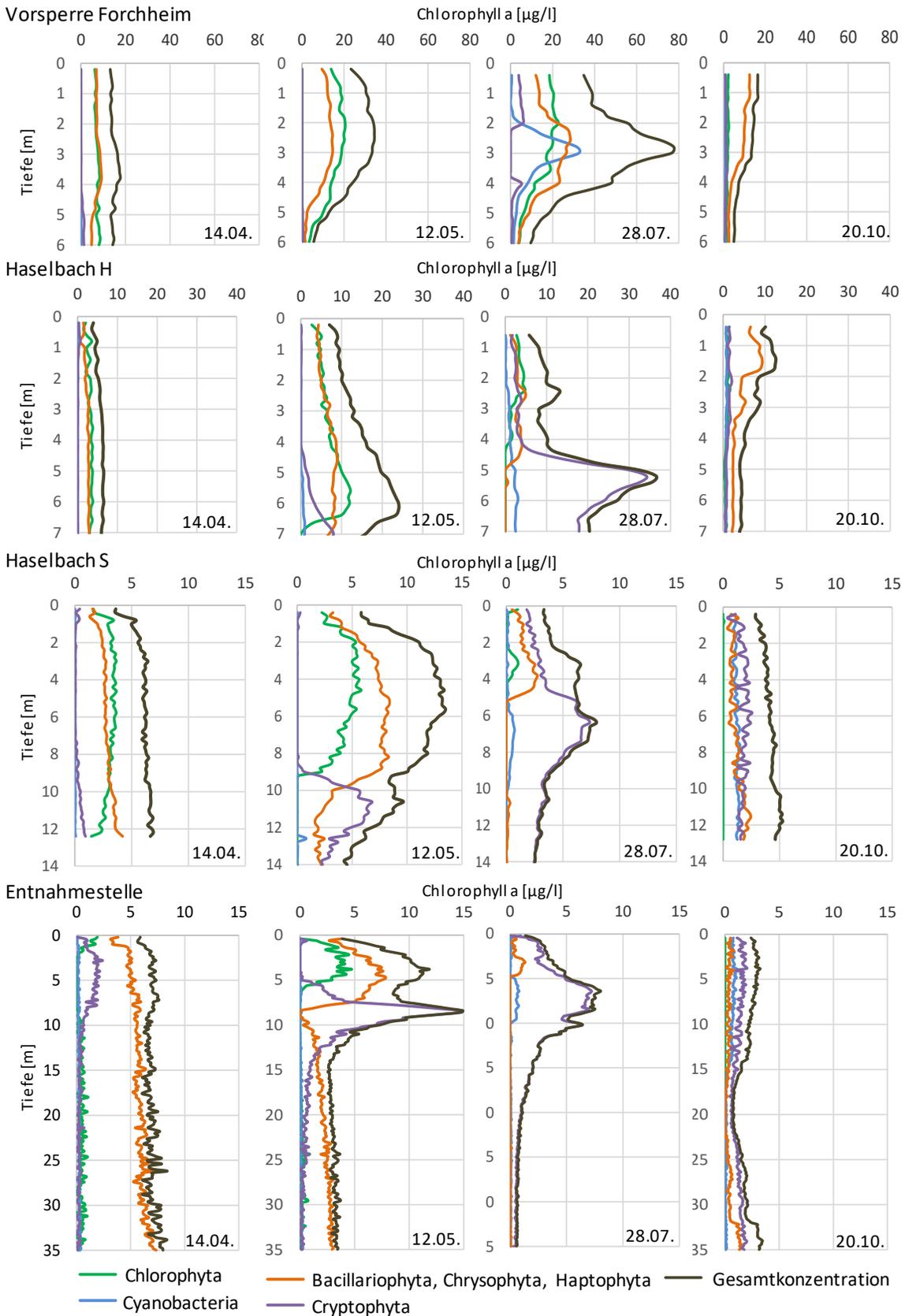
3 Ergebnisse

Abbildung 29: Tiefenprofile der mit der FluoroProbe-Sonde quantifizierten Algengruppen für die vier Untersuchungsstellen in Fließrichtung



3 Ergebnisse

Abbildung 30: Auswahl der FluoroProbe-Tiefenprofile an den Untersuchungspunkten in Fließrichtung



3 Ergebnisse

3.2.2 Vergleich zwischen Sondenmessungen und mikroskopischer Analyse des Phytoplanktons

3.2.2.1 Gesamt-Chlorophyll a-Konzentration und Gesamtbiovolumina

Die anhand mikroskopischer Zählungen ermittelten Gesamtbiovolumina reichten in den untersuchten Proben von 0,2 bis 17,1 mm³/l. Die Gesamtchlorophyll-Konzentrationen in den Wassertiefen, die auch mikroskopisch analysiert wurden, betragen entsprechend der FluoroProbe-Messungen 0,7 bis 55,7 µg/l. Die vollständigen Tiefenprofile der Sondenmessungen zeigten darüber hinaus die höchste Chlorophyll-a-Konzentration von 78 µg/l in 3 m Tiefe in der Vorsperre Forchheim im Juli 2014. Weitere lokale Höchstwerte von 35 bzw. 36 µg/l wurden im Juni (30.6.) und Juli in 5 m Wassertiefe an der Probenahmestelle H gemessen.

Da mikroskopische Analysen und fluorometrische Messungen unterschiedliche Eigenschaften der Zellen bzw. Partikel erfassen, können nur die jeweiligen Jahressgänge und relativen Verhältnisse zwischen den Proben vergleichend betrachtet werden. Stark abweichende Verhältnisse zwischen Proben anhand der beiden Quantifizierungsverfahren können u.a. durch umweltbedingte oder artspezifische Variationen im Pigmentgehalt der Zellen entstehen. Um solche Diskrepanzen zwischen den beiden Methoden darzustellen, wurde je Probe das Verhältnis aus der ermittelten Chlorophyll- a-Konzentration und dem Biovolumen berechnet. Wie Abbildung 31 zeigt, stimmen die saisonalen Verläufe von Biovolumina und Chlorophyll-a-Konzentrationen sowie die Verhältnisse zwischen unterschiedlichen Probenahmestellen und -tiefen bis auf wenige Ausnahmen (z.B. S2 JunII, E4 Mai, Juli, Oktober) gut überein.

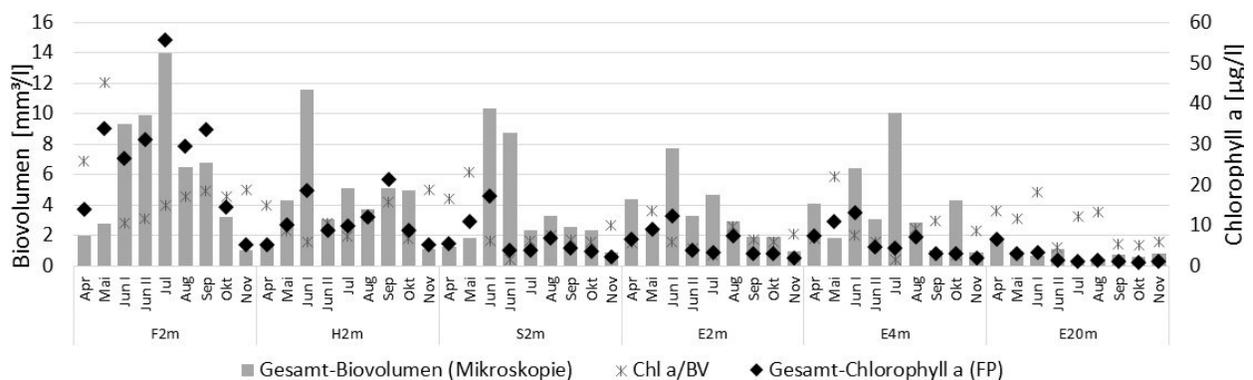


Abbildung 31: Jahresgang der Gesamtbiovolumina (Mikroskopie) und Gesamt-Chlorophyll a-Konzentrationen (Sondenmessungen FluoroProbe) für die vier Probenahmestellen sowie das Verhältnis von Chlorophyll a zu Biovolumen (Chl a/BV)

Es gibt jedoch einige Ausnahmen: Für die Proben in 2 m Wassertiefe der Vorsperre Forchheim wurde von April bis Juni eine Zunahme des Gesamtbiovolumens verzeichnet, mit einem deutlichen Sprung zwischen Mai und Juni. Die Chlorophyll a-Konzentrationen hingegen zeigten einen sprunghaften Anstieg von April zu Mai und im deutlichen Kontrast zu den Biovolumina einen Rückgang zwischen Mai und Juni. Die

3 Ergebnisse

Diskrepanzen zwischen beiden Methoden werden auch anhand der stark variierenden Verhältnisse aus Chlorophyll a und Biovolumen (Chla/BV) deutlich. Für die gleiche Probenahmestelle stellen sich die Verhältnisse zwischen August und September je nach Methode umgekehrt dar, mit einem Rückgang der Biovolumina von August zu September und einer gegenläufigen Entwicklung der Chlorophyll a-Konzentrationen. Für die beiden Probenahmen im Juni (3. und 30. 6. 2014) wurden an der Stelle S ähnliche Biovolumina ermittelt, während die Sondenmessung eine deutliche Abnahme der Chlorophyll a-Konzentration ergab. Eine ähnliche Diskrepanz ist für Stelle H in den Monaten September und Oktober zu verzeichnen. In 4 m Wassertiefe an der Entnahmestelle hingegen stehen ähnliche Chlorophyll a-Konzentrationen im Juni (30. 6.) und Juli einer deutlichen Steigerung der Biovolumina zwischen den beiden Beprobungszeitpunkten gegenüber.

Die Korrelationsanalyse (Rangkorrelation nach Spearman) für den gesamten Datensatz zeigte jedoch mit $Rho = 0,73$ ($p < 0,001/***$) eine insgesamt hohe Korrelation zwischen Gesamtbiovolumina und Chlorophyll a-Konzentrationen.

3 Ergebnisse

3.2.2.2 Die gruppenspezifische Zusammensetzung des Phytoplanktons im Vergleich zwischen Mikroskopie und Sondenmessung

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der mikroskopischen und der fluorometrischen Analyse der Phytoplanktonzusammensetzung für jede Probenahme-stelle und -tiefe. Die Relationen zwischen den Phytoplanktongruppen stellen sich nach den beiden Methoden unterschiedlich dar: Gemäß mikroskopischer Analyse sind Diatomeen vor allem in der Vorsperre Forchheim und der in Fließrichtung folgenden Probenahmestelle H die bedeutendste Gruppe, gefolgt von Cyanobakterien und Cryptophyta, während Grünalgen eine deutlich untergeordnete Rolle spielen. Legt man die Sondenmessungen zugrunde, erreichen Grünalgen an den Probenahmestellen F und H jedoch ähnlich hohe Chlorophyllkonzentrationen wie Diatomeen. An der Entnahmestelle zeigten die Sondenmessungen in Übereinstimmung mit der Mikroskopie sehr geringe Konzentrationen an Grünalgen.

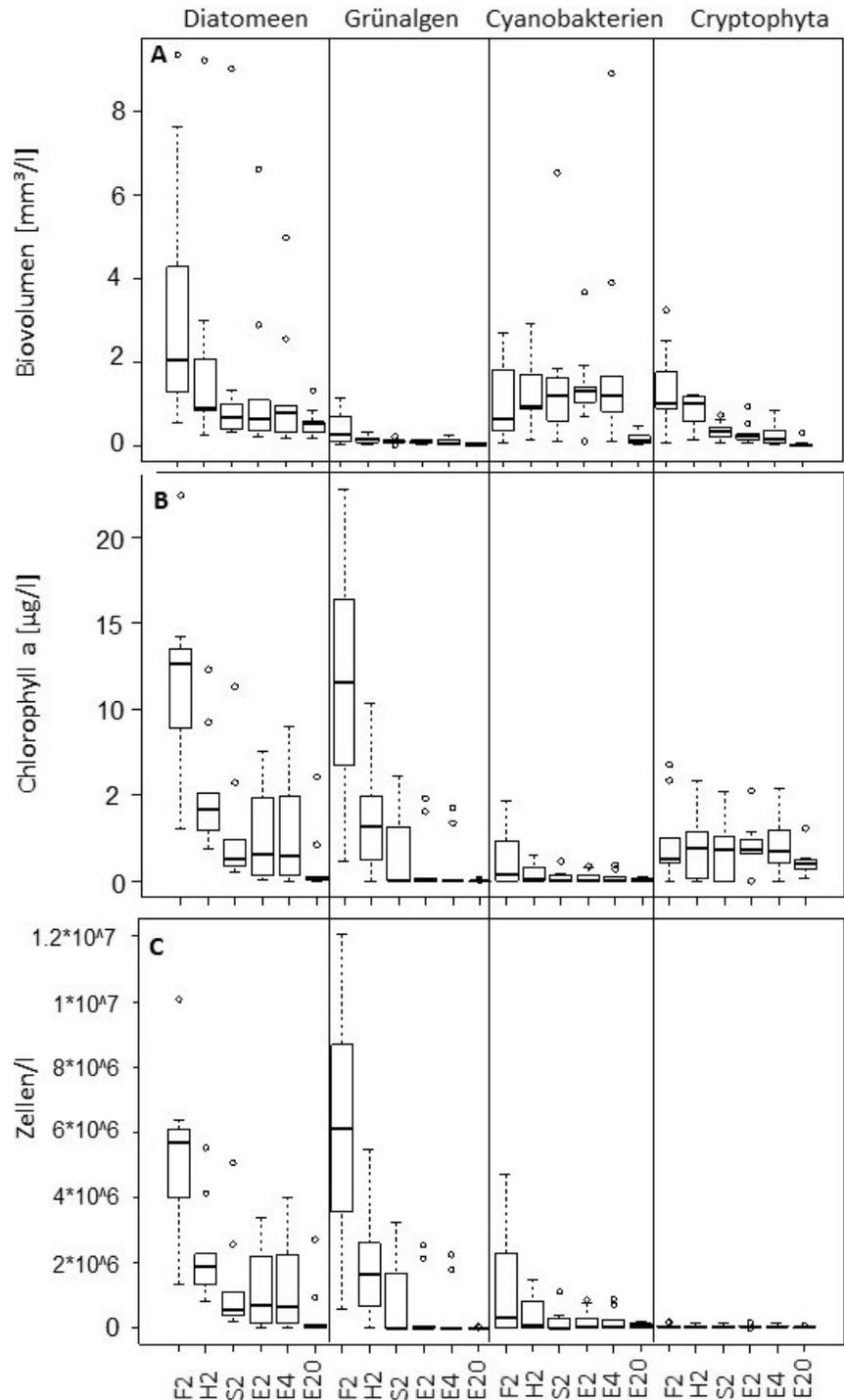


Abbildung 32: Gruppenweise Phytoplanktonzusammensetzung je Probenahmestelle nach mikroskopischer Analyse und nach FP-Sondenmessungen im Vergleich

3 Ergebnisse

Cyanobakterien werden im Vergleich zur Mikroskopie durch die Sondenmessungen deutlich unterschätzt, vor allem an den Probenahmestellen der Hauptsperre. Stattdessen werden für Cryptophyta in der Hauptsperre höhere Konzentrationen durch die Sondenmessungen erfasst als durch die Mikroskopie. Die Verwendung der Umrechnungsfaktoren in Zellzahlen nach bbe Moldenke GmbH (Abbildung 32C) führt vor allem zu einer deutlichen Verringerung des Anteils der Cryptophyta.

Da die absoluten Werte der beiden Verfahren nur schwer miteinander verglichen werden können, wurde das Verhältnis zwischen Chlorophyll a-Konzentration (Sondenmessung) und Biovolumen (Mikroskopie) je Probe berechnet. Auffällige Veränderungen dieses Verhältnisses zeigen, dass die Detektion der Phytoplankter mit den beiden Methoden zwischen den Proben variiert, was z.B. mit einer Veränderung der Artzusammensetzung oder des physiologischen Zustands der Zellen in Zusammenhang stehen kann.

Abbildung 33 zeigt die Verhältnisse aus Chlorophyll a und Biovolumen je Probe.

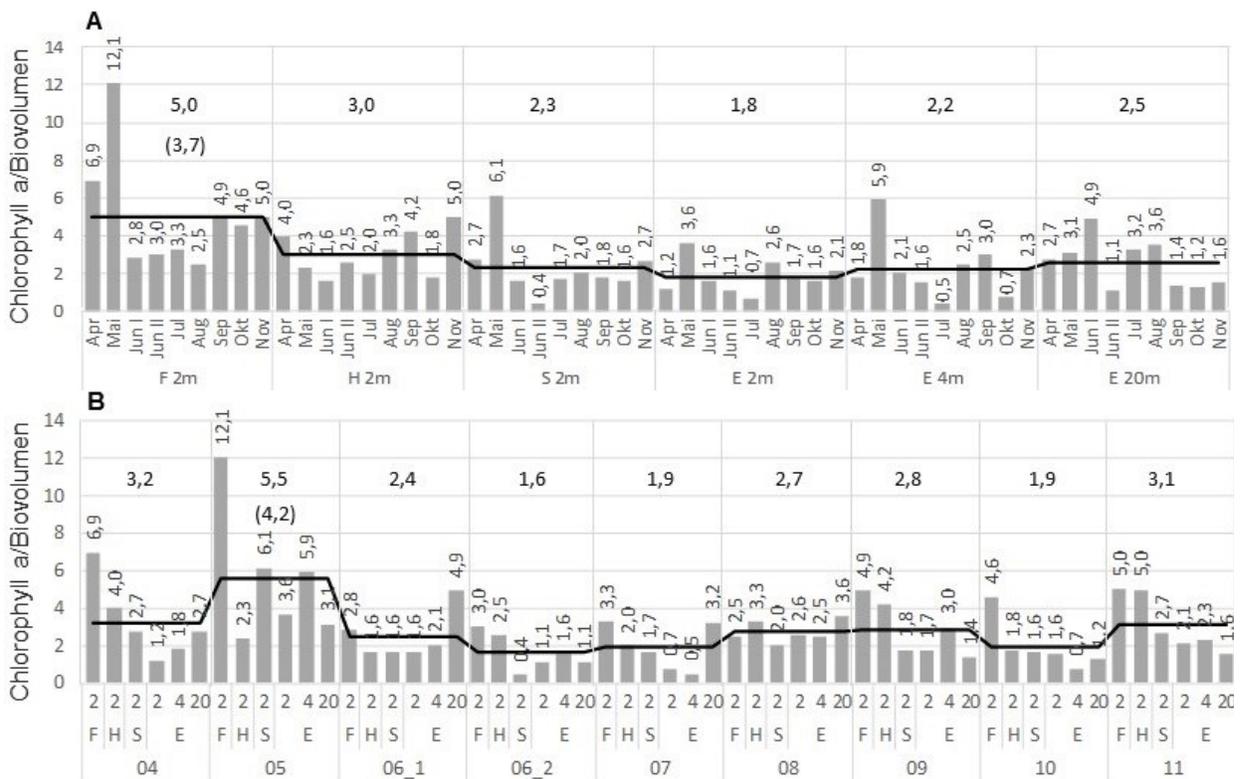


Abbildung 33: Verhältnisse aus Chlorophyll a-Konzentration und Biovolumen im Vergleich nach Probenahmestellen (A) und -zeitpunkt (B); vertikal: Einzelwerte je Probe, horizontal: Mittelwerte je Probenahmestelle bzw. Monat, Werte in Klammern entsprechen den Mittelwerten ohne den Extremwert für F 2m Mai

■ Chlorophyll a/ Biovolumen
 — Mittelwert je Probenahmestelle bzw. -monat

Es gibt deutliche Unterschiede zwischen den Proben, was darauf hindeutet, dass bei einigen Proben größere Diskrepanzen zwischen den beiden Methoden auftreten als bei anderen. Auffällig ist z.B. ein extrem hoher Wert für F 2 m im Mai (vgl. Kapitel 3.2.2.2). Um eventuelle Trends zu erkennen, wurden

3 Ergebnisse

Mittelwerte für Probenahmestellen bzw. –Monate gebildet. Auch wenn man den Extremwert für F 2 m Mai außer acht lässt, zeigt sich im Vergleich der Probenahmestellen eine Abnahme des Verhältnisses Chl a/BV in Fließrichtung für die Proben aus 2 m Wassertiefe. In den Proben aus 4 und 20 m Tiefe an der Entnahmestelle ist das Verhältnis wieder höher. Im jahrezeitlichen Vergleich ist das Verhältnis Chl a/BV im Mai deutlich höher als in den anderen Monaten.

Betrachtet man die Verhältnisse Chl a/BV für die einzelnen spektralen Gruppen (s. Tabelle 18), liegen die Werte im Mittel für Cyanobakterien deutlich am niedrigsten. Vor allem für Grünalgen, aber auch für Cryptophyta treten sehr hohe Extremwerte auf, in denen das durch die Sondenmessung erfasste Signal für die Gruppe deutlich über den entsprechenden Biovolumina liegt. Die höheren Mittelwerte für die Vorsperre Forchheim bzw. für die Proben aller Untersuchungsstellen im Mai sind vor allem durch sehr hohe Chl a/BV für die Gruppe der Grünalgen bedingt (Werte > 50 für F, H S 2 m, E 4 m Mai). Für Diatomeen treten solche starken Extremwerte nicht auf, was für eine stetigere Detektion dieser Gruppe im Vergleich zur Mikroskopie spricht. Der Mittelwert für Chl a/BV liegt nahe am Mittelwert für das Gesamtchlorophyll a, was auch in dem hohen Anteil der Gruppe am Phytoplankton insgesamt begründet ist.

Tabelle 18: Mittel- und Extremwerte des Verhältnisses von Chlorophyll a-Konzentration zu Biovolumen für die spektralen Gruppen, unterschieden nach Probenahmestellen bzw. -monaten

	Gesamt-Chl a / Gesamt-BV	Chl a / BV Diatomeen	Chl a / BV Grünalgen	Chl a / BV Cryptophyta	Chl a / BV Cyanobakterien
Mittelwert	2,9	2,8	23,5	13,2	0,5
Maximum	12,1	9,3	468,3	155,0	3,4
Minimum	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
F 2m	5,0	5,3	85,0	1,5	0,8
H 2m	3,0	4,0	25,9	2,5	0,3
S 2m	2,3	2,6	13,4	4,3	0,1
E2m	1,8	1,7	6,6	8,8	0,2
E4m	2,4	2,3	9,2	20,8	0,4
E20m	2,5	1,0	0,8	57,2	0,8
April	3,2	4,2	16,2	27,6	0,1
Mai	5,5	4,9	112,4	8,6	0,4
Juni I	2,4	1,6	26,1	18,6	0,0
Juni II	1,6	1,9	28,2	3,6	0,0
Juli	1,9	2,0	11,1	7,9	0,4
August	2,7	3,0	3,0	11,8	0,5
September	2,7	1,8	8,2	6,2	1,3
Oktober	2,4	2,9	2,4	34,7	1,1
November	3,1	2,9	3,9	10,1	0,1

Die stärksten Diskrepanzen im Sinne einer Überschätzung einer spektralen Gruppe relativ zur Mikroskopie treten demnach für Grünalgen und Cryptophyta auf, die vergleichsweise niedrigen mittleren Chl a/BV -

3 Ergebnisse

Werte für Cyanobakterien legen dagegen eine systematische Unterschätzung der Gruppe durch die Sondenmessung nahe.

Weitere Unterschiede zwischen den Methoden fallen bei einem Vergleich der relativen Anteile der einzelnen Phytoplanktongruppen am Gesamtbiovolumen bzw. Gesamtchlorophyll a (Abbildung 34) auf. Im Mittel aller Proben wird eine deutliche Diskrepanz hinsichtlich der Gruppen Cryptophyta und Cyanobakterien offensichtlich: Während die Cryptophyta im Mittel aller Proben nur einen Anteil von 15,7% am Gesamtbiovolumen haben, liegt ihr Anteil am Gesamtchlorophyll bei 41%. Cyanobakterien dagegen stellen nach den Ergebnissen der mikroskopischen Quantifizierung etwa ein Drittel des Gesamtbiovolumens, während ihr Anteil am Gesamt-Chlorophyll-a nach den Sondenmessungen nur bei ca. 5 % liegt. Nach Umrechnung der fluorometrisch ermittelten Chlorophyllkonzentrationen in Zellzahlen unter Verwendung der Korrekturfaktoren von bbe Moldaenke GmbH nähern sich die relativen Anteile der Cyanobakterien und Cryptophyta denen der mikroskopischen Analyse deutlich an. Der im Vergleich zur Mikroskopie überhöhte Anteil der Grünalgen wird durch die Verwendung der Korrekturfaktoren bei der Umrechnung in Zellzahlen jedoch nicht verringert.

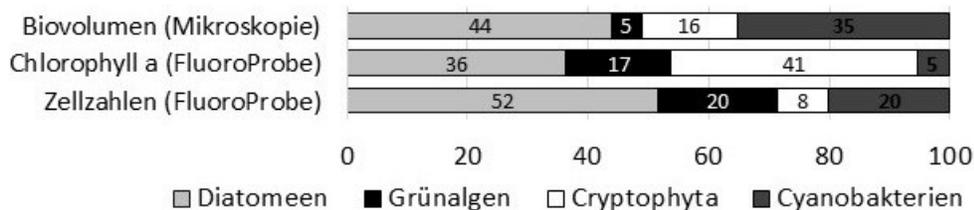


Abbildung 34: Relative Anteile der Phytoplanktongruppen am Gesamtbiovolumen bzw. Gesamtchlorophyll a

Wie dieser Vergleich zeigt, unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Quantifizierungsverfahren für einige Phytoplanktongruppen deutlich in den Mittelwerten aller Proben bzw. Proben einer Untersuchungsstelle. Für die Anwendung im Monitoring ist von wesentlicher Bedeutung, wie zuverlässig sich die saisonale Entwicklung der einzelnen Phytoplanktongruppen mit der Sondenmessung im Vergleich zu einer aufwändigeren mikroskopischen Analyse verfolgen lässt. Der jahreszeitliche Verlauf der Phytoplanktonzusammensetzung im Vergleich der beiden Methoden ist in Abbildung 35 dargestellt.

3 Ergebnisse

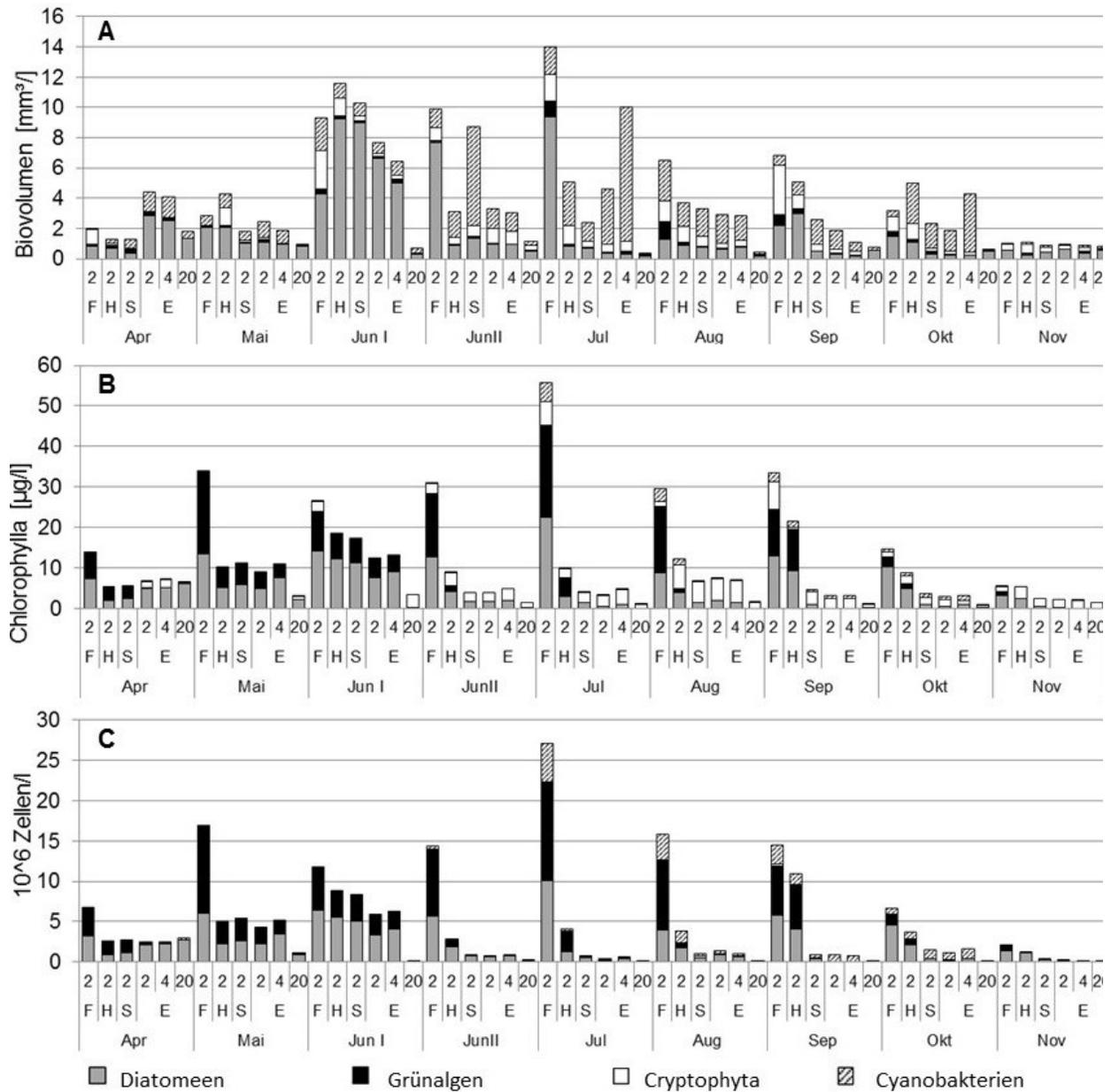


Abbildung 35: Zusammensetzung des Phytoplanktons im Jahresverlauf 2014 nach mikroskopischer Analyse (A) und fluorometrischer Messung (B und C)

Erwartungsgemäß zeigen die mikroskopischen Analysen die Dominanz von Diatomeen (Chrysophyceen, Haptophyceen und Dinophyceen) in den Frühjahrsmonaten bis Anfang Juni. Auch nach den Ergebnissen der FluoroProbe-Messungen hat diese spektrale Gruppe in den gleichen Monaten hohe Anteile am Gesamtchlorophyll. Im deutlichen Unterschied zu den Ergebnissen der Mikroskopie erreichen Grünalgen jedoch nach den Sondenmessungen ebenso hohe oder sogar höhere Anteile als die Diatomeen. Die Ableitung von Zellzahlen aus den Chlorophyllkonzentrationen unter Verwendung der Umrechnungsfaktoren hat darauf fast keinen Einfluss. Im weiteren Jahresverlauf zeigen die mikroskopischen Untersuchungen

3 Ergebnisse

einen steigenden Anteil von Cyanobakterien am Gesamtbiovolumen. Aus den FluoroProbe-Messungen geht jedoch kein nennenswerter Anstieg des Anteils dieser Gruppe an der Chlorophyll a-Konzentration hervor. In einigen Proben der Sommermonate, insbesondere im August, werden jedoch höhere Anteile Cryptophyceen durch die Sonde detektiert, die nicht in vergleichbarem Maße durch die mikroskopischen Analysen bestätigt wurden. Die Umrechnung der Chlorophyllkonzentration in Zellzahlen unter Berücksichtigung der Korrekturfaktoren steigert die Abundanz der Cyanobakterien leicht, während die Bedeutung der Cryptophyta deutlich nach unten korrigiert wird.

Der höchste Korrelationskoeffizient zwischen Biovolumina und gruppenspezifischen Chlorophyll a - Konzentrationen wurde für die Gruppe der Diatomeen festgestellt, die anteilig auch einen hohen Anteil an den Gesamtbiovolumina und Gesamt-Chlorophyll a - Konzentrationen hat. Für die anderen spektralen Gruppen sind die Korrelationskoeffizienten mit 0,41 bis 0,56 deutlich geringer (s. Tabelle 20).

Tabelle 19: Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman für gruppenspezifische und Gesamtbiovolumina und Chlorophyll a- Konzentrationen

	<i>Rho</i>
Gesamtchlorophyll und Gesamtbiovolumen	0.73 ***
Gruppe Diatomeen	0.84 ***
Gruppe Grünalgen	0.46***
Cyanobakterien	0.56***
Cryptophyta	0.41***

*** $p < 0,001$

3.2.2.1 Diatomeen, Chrysophyceen, Haptophyceen, Dinophyceen

Nach den Ergebnissen der mikroskopischen Analysen dominierte in der spektralen Gruppe der Diatomeen im April *Melosira italica* in der Hauptsperre, in der Vorsperre hatte *Asterionella formosa* höhere Anteile. Im Mai kam *Chrysochromulina parva* zum Artenspektrum hinzu, während Anfang Juni in der Hauptsperre die zuvor dominante *Melosira italica* durch kleine centrische Diatomeen (*Cyclotella radiosa*, *Stephanodiscus alpinus*) sowie die Goldalge *Dinobryon divergens* abgelöst wurde. In der Vorsperre hingegen dominierte zu diesem Zeitpunkt *Melosira italica*. Ab Ende Juni ging das Biovolumen der Diatomeen in der Hauptsperre insgesamt deutlich zurück, vorherrschende Arten waren u.a. *Fragilaria crotonensis* (August), verschiedene Chrysophyceen (*Chrysochromulina* und *Ochromonas*) und *Melosira italica*. In der Vorsperre erreichten Diatomeen Ende Juni und im Juli die höchsten Biovolumina der Saison, mit ähnlich hohen Werten wie Anfang Juni in der Hauptsperre. Daran hatte vor allem *Synedra*, im Juli auch *Chrysamoeba* hohe Anteile (Abbildung 36).

3 Ergebnisse

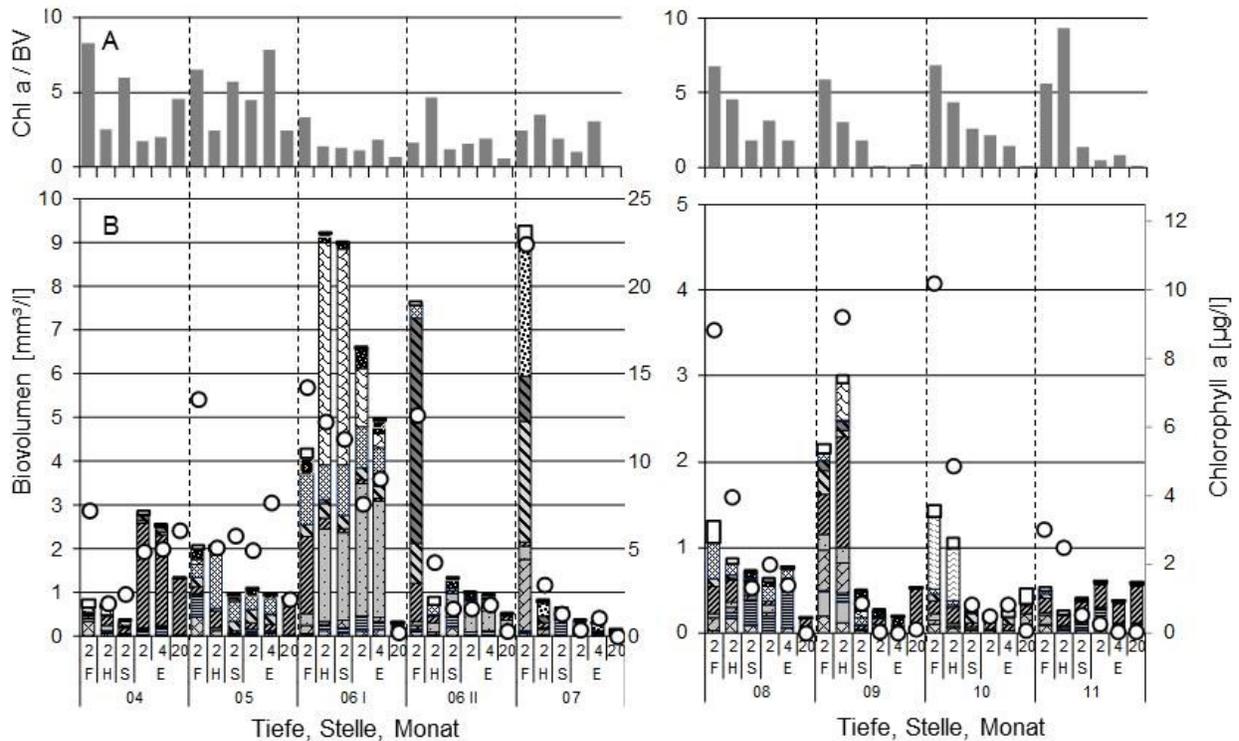


Abbildung 36: Artenszusammensetzung für die spektrale Gruppe der Diatomeen mit entsprechenden Biovolumina, Chlorophyll a-Konzentrationen dieser Gruppe und Verhältnisse aus Chl a/BV

- | | |
|------------------------------------|--|
| □ Arten < 1% BV | ▨ <i>Synedra acus var. radians</i> (120µm) |
| ■ <i>Peridinium cinctum/willei</i> | ▩ <i>Melosira italica</i> |
| ■ <i>Ceratium hirundinella</i> | ▧ Zentrale Diatomeen > 15µm |
| ▨ <i>Chrysophyceae</i> | ▦ Zentrale Diatomeen 5-15µm |
| ▨ <i>Dinobryon divergens</i> | ■ <i>Fragilaria crotonensis</i> |
| ▨ <i>Chrysochromulina parvae</i> | ▨ <i>Diatoma elongatum</i> |
| ▨ <i>Chrysamoeba sp.</i> | ▨ <i>Asterionella formosa</i> |
| ▨ <i>Synedra acus</i> (200µm) | ○ Diatomeen Chlorophyll a |

Der deutliche Anstieg des Biovolumens dieser Gruppe von Mai zu Anfang Juni geht nicht in gleichem Maße aus den Chlorophyll a-Konzentrationen der Sondenmessung für diese Gruppe hervor, was sich auch in den Verhältnissen von Chl a/BV zeigt, die Anfang Juni deutlich niedriger sind als im Mai. Für Proben aus der Vorsperre Forchheim treten häufig höhere Werte für das Verhältnis Chl a/BV auf als an den anderen Untersuchungspunkten, für August bis Oktober nimmt das Verhältnis generell in Fließrichtung ab. Nur in den beiden Proben der Vorsperre mit den höchsten Diatomeen-Biovolumina (30.6. und 28.7.) treten niedrigere Chl a/BV-Verhältnisse auf. Diese beiden Proben weisen deutlich abweichend von allen anderen Proben hohe Anteile von *Synedra*, im Juni auch *Chrysamoeba* auf. Bezogen auf den gesamten Datensatz liegt das berechnete Verhältnis für die spektrale Gruppe der Diatomeen immer unter 10 (0 bis 9,34) und innerhalb der betrachteten spektralen Gruppen wurde für diese Gruppe der höchsten Korrelationskoeffizient nach Spearman ($\rho=0,84^{***}$) zwischen Biovolumina und Chlorophyll a-Konzentrationen ermittelt.

3 Ergebnisse

3.2.2.2 Grünalgen

Die Detektion von Grünalgen durch die FP-Sonde in Relation zur Mikroskopie zeigte im Jahresverlauf große Unterschiede. Für diese Gruppe traten die höchsten Werte für das Verhältnis Chl a /BV im gesamten Datensatz auf (F 2m Mai, Juni II) (Abbildung 37).

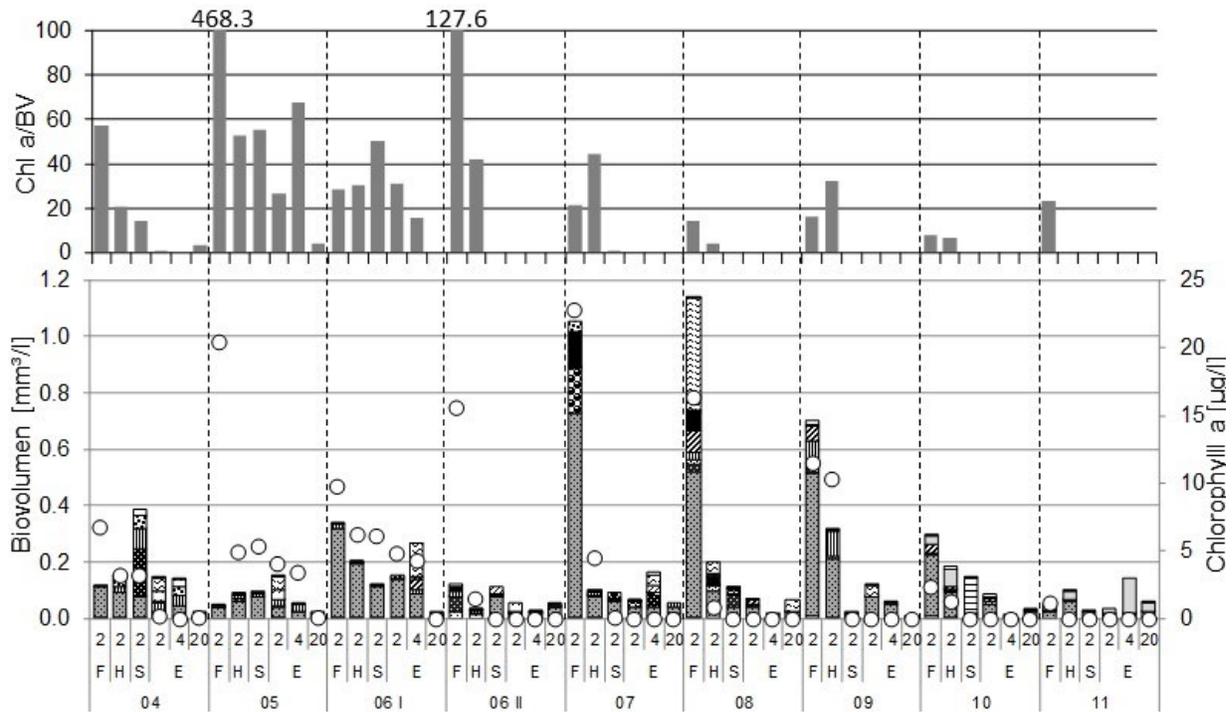


Abbildung 37: Artenzusammensetzung der Grünalgen mit entsprechenden Biovolumina, Chlorophyll a-Konzentrationen und Verhältnisse aus Chl a/BV

- | | |
|--|--|
| □ Arten < 1% BV | ▨ <i>Pandorina morum</i> |
| ▒ Grünalgen > 5µm | ▩ <i>Monoraphidium contortum</i> |
| ▤ <i>Staurastrum cingulum</i> | ▣ <i>Coenochloris polycocca</i> |
| ▥ <i>Cosmarium depressum</i> | ▧ <i>Chlorella sp.</i> |
| ▦ <i>Tetraedron minimum</i> | ▨ <i>Chlamydomonas spp.</i> < 20 µm |
| ■ <i>Scenedesmus sp.</i> | ▩ <i>Chlamydomonas spp.</i> 10 - 20 µm |
| ▧ <i>Pseudosphaerocystis lacustris</i> | ▨ <i>Chlamydomonas spp.</i> 5 - 10 µm |
| ▩ <i>Pediastrum duplex</i> | ▤ <i>Chlamydomonas spp.</i> < 5 µm |
| | ○ Grünalgen Chlorophyll a |

Im Mai und Anfang Juni wurden für alle Probenahmestellen deutlich höhere Chl a/BV-Verhältnisse ermittelt als in den Folgemonaten. Nur für die Stellen F und H wurden noch höhere Werte erreicht. In den Proben, für die mikroskopisch die höchsten Grünalgen-Biovolumina bestimmt wurden (F 2 m Juli, August, September), wurden auch höhere Sondensignale detektiert, die jedoch auf einem vergleichbaren Niveau mit Proben mit wesentlich geringere Grünalgen-Biovolumina (F 2 m Mai, Ende Juni) liegen. Die extremen Unterschiede der Verhältnisse Chlorophyll a zu Biovolumen zeigen dieses Missverhältnis in der Detektion der Gruppe durch die beiden Methoden deutlich.

3 Ergebnisse

Hinsichtlich des Artenspektrums zeigte die mikroskopische Analyse für die überwiegende Mehrheit der Proben eine Dominanz von *Chlamydomonas sp.* (Größenklasse 5-10µm), nur im Juni und August stellen andere Arten (*Coenochloris polycocca*, *Scenedesmus spp.*, *Staurastrum cingulum*) in der Vorsperre Forchheim etwa ein Drittel des Biovolumens. Das Artenspektrum liefert daher keine Erklärung für die deutlich unterschiedliche Detektion der Gruppe durch die FP-Sonde im Verhältnis zur Mikroskopie.

3.2.2.3 Cryptophyta

Ähnlich wie bei den Grünalgen traten für die Detektion der Cryptophyta starke Unterschiede zwischen Sondenmessung und Mikroskopie im Jahresverlauf auf (Abbildung 38).

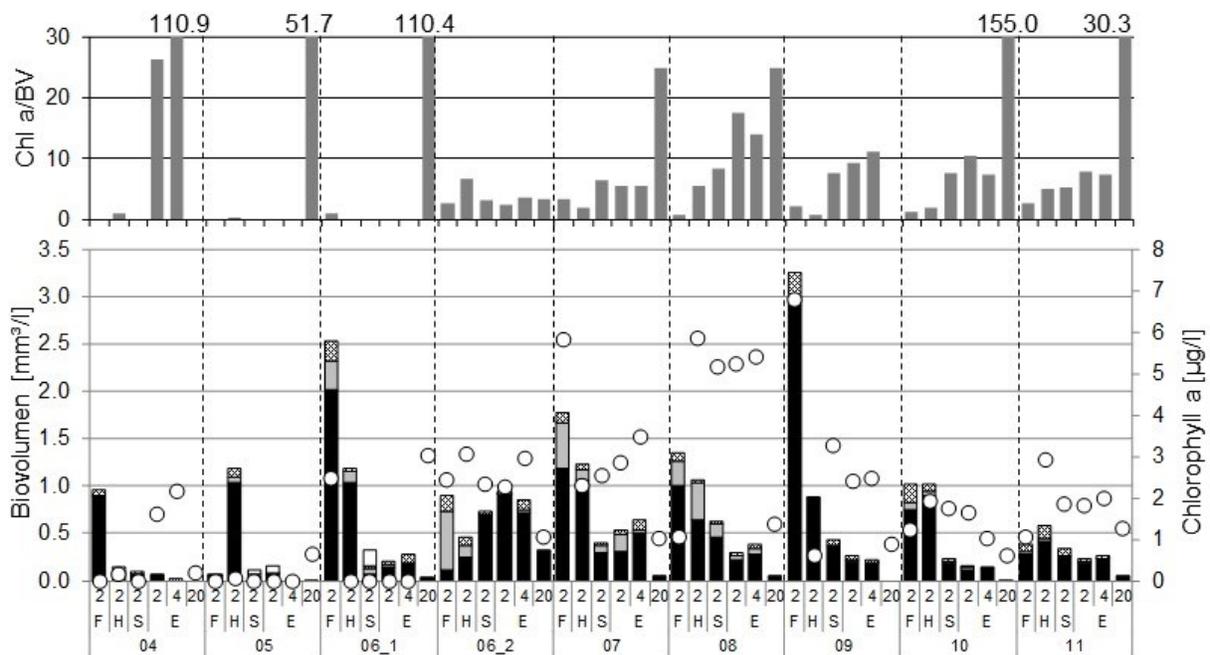


Abbildung 38: Artenszusammensetzung der *Cryptophyta* mit entsprechenden Biovolumina, Chlorophyll a-Konzentrationen und Verhältnisse aus Chl a/BV

- *Rhodomonas sp.* < 5µm
- ▨ *Rhodomonas pulsilla*
- ▒ *Cryptomonas marssonii*
- *Cryptomonas erosa*
- Cryptophyta Chlorophyll a

Die höchsten Werte für das Verhältnis Chlorophyll a zu Biovolumen traten für diese Gruppe in 20 m Tiefe an der Entnahmestelle auf. September bis November stehen für diese Probe niedrige Chlorophyllwerte extrem niedrigen Biovolumina gegenüber, in diesem Wertebereich können auch Messfehler bereits einen großen Einfluss auf das ermittelte Verhältnis haben und sollen daher nicht weiter betrachtet werden. Vor allem Anfang Juni ist jedoch das Missverhältnis zur Mikroskopie sehr deutlich, die Probe mit dem niedrigsten Cryptophyta-Biovolumen wies zugleich das höchste SONDENSIGNAL für die Gruppe auf. Betrachtet man den Datensatz über die gesamte Saison, so stimmten in keinem Monat Verhältnisse der Probenahmestellen

3 Ergebnisse

untereinander zwischen Mikroskopie und Sondenmessung überein. Insgesamt wurden vor allem ab Ende Juni regelmäßig höhere Sonden-signale für Crptophyta detektiert, während Anfang des Jahres neben vereinzelt höheren Werten häufig keine Signale für die Gruppe erfasst wurden. Da das Biovolumen in fast allen Proben zu über zwei Drittel deutlich durch *Cryptomonas erosa* dominiert wird, liefert auch für diese Gruppe die Artenzusammensetzung keine Erklärung für die Unstimmigkeiten zwischen den beiden Methoden.

3.2.2.4 Cyanobakterien

Zu Jahresbeginn (April, Mai) dominierte unter den Cyanobakterien *Tychonema* sp.. Das autotrophe Picoplankton (Einzelzellen < 2 µm Durchmesser) dominierte die Cyanobakterien-Biovolumina im Mai und Anfang Juni, *Synechococcus capitatus* trat in der Vorsperre im Juli und August auf. *Microcystis flos-aquae* hatte großen Anteil an den hohen Cyanobakterien-Biovolumina Ende Juni (S 2 m) und Juli (H 2 m, E 2 m, 4 m). In den gleichen Monaten erreichten auch *Cyanodictyon planctonicum* und *Chroococcus limneticus* höhere Biovolumina. Im Herbst trat *Woronichinia naegeliana* zum Artenspektrum hinzu und dominierte im Oktober in den Proben der Hauptsperre. Akineten von *Anabaena* sp. traten vorwiegend im August in den Proben der Hauptsperre auf (Abbildung 39).

3 Ergebnisse

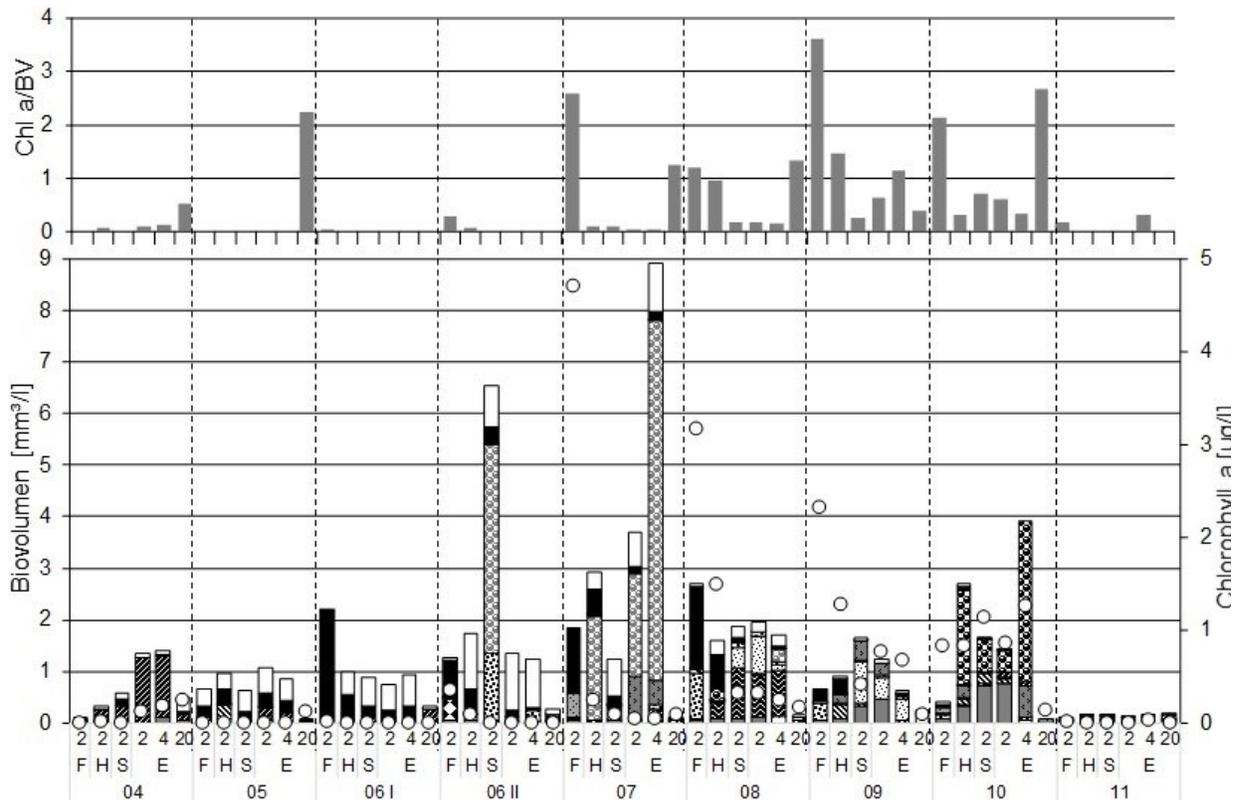
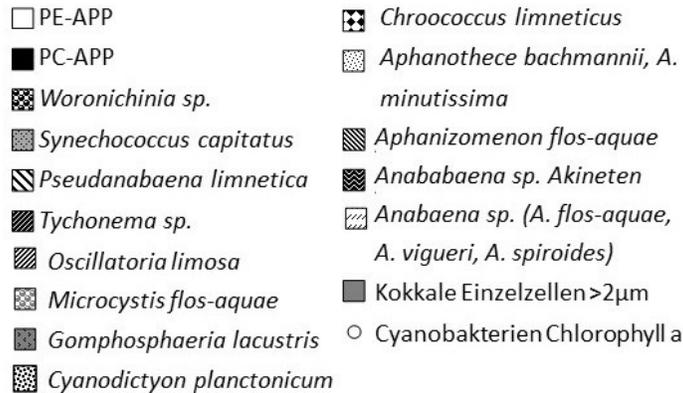


Abbildung 39: Artzusammensetzung der Cyanobakterien mit entsprechenden Biovolumina, Chlorophyll a-Konzentrationen und Verhältnisse aus Chl a/BV



Generell wurden für Cyanobakterien durch die FP-Sonde sehr geringe Chlorophyll a-Konzentrationen ermittelt, dies galt auch für die vollständigen Tiefenprofile der verschiedenen Untersuchungsstellen. Aufgrund der niedrigen Chlorophyll-Konzentrationen lagen die Verhältnisse aus Chlorophyll a zu Biovolumen für Cyanobakterien fast immer unter eins und erreichten maximal 3,6. Nur für neun von 54 Proben wurden Verhältnisse über eins ermittelt, die meisten davon stammen aus September und Oktober. Bis Ende Juni wurden fast keine Signale für Cyanobakterien durch die FP-Sonde detektiert. Cyanobakterielle Biovolumina waren in dieser Zeit ebenfalls meist sehr niedrig, die mikroskopische Analyse zeigte jedoch für einzelne Proben auch höhere Cyanobakterien-Biovolumina (F 2m Juni I, S2m Juni II), die sich nicht in den Sondenmessungen widerspiegeln. Auch im Juli traten deutliche Diskrepanzen zwischen Mikroskopie und Sondenmessung z.B. für die Untersuchungsstellen F und E auf: Für die Probe

3 Ergebnisse

aus der Vorsperre Forchheim registrierte die FP-Sonde die höchste Chlorophyllkonzentration für Cyanobakterien im gesamten Jahr, während die mikroskopische Auswertung nur ein geringes Cyanobakterien-Biovolumen ergab. Die Cyanobakterien-Population dieser Probe bestand vorwiegend aus PC-haltigen Picoplanktern sowie *Synechococcus capitatus*. Im Unterschied dazu wurden in 2 und 4 m Wassertiefe an der Entnahmestelle mikroskopisch sehr hohe Cyanobakterien-Biovolumina bestimmt, woran *Microcystis flos-aquae* (PC-haltig) den Hauptanteil hatte. Die Sondensignale zeigten dagegen fast kein Signal für Cyanobakterien an. Ähnliche Verhältnisse traten auch im Vormonat an der Probenahmestelle S auf. Für August und September zeigten die Sondenmessungen jeweils die höchsten Cyanobakterien-Abundanzen für die Vorsperre Forchheim und die in Fließrichtung folgende Untersuchungsstelle H an. Die Verhältnisse der Cyanobakterien-Biovolumina an den Probenahmestellen untereinander stellten sich jedoch vor allem im September anders dar.

Zusammenfassend gab es bei der Quantifizierung der Cyanobakterien zwischen Mikroskopie und Sondenmessung sehr starke Diskrepanzen mit unterschiedlichen Ergebnissen für die saisonalen Verläufe und Verhältnisse der Probenahmestellen untereinander sowie Proben, in denen trotz hoher Cyanobakterien-Biovolumina kein Sonden-signal für diese Gruppe erfasst wurde.

3 Ergebnisse

3.3 Quantifizierung und Differenzierung des autotrophen Picoplanktons anhand Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie

3.3.1 Mikroskopische Analyse der saisonalen Entwicklung des autotrophen Picoplanktons

Im Vergleich der Untersuchungsstellen werden im Metalimnion der Entnahmestelle, in 2 m Wassertiefe der Stellen H und S sowie in 4 m Wassertiefe an der Stelle S die höchsten Zellzahlen des APP erreicht (Abbildung 40, Tabelle 20). An der Entnahmestelle liegen die Zellzahlen für 2, 4 und 6 m Wassertiefe in einem ähnlichen Bereich, im Tiefenbereich des Metalimnions (12.5. und 3.6. 4,5 m; 30.6. 6,5 m; 28.7. 8,5m; 26.8. 11,5 m; 22.9. 12,5m; 20.10.17,5 m) jedoch deutlich höher. Da diese Schicht nur während der Sommermonate besteht und beprobt werden kann, gehen die meist niedrigen Zellzahlen von Frühjahr und Spätherbst nicht in den Mittelwert ein. Betrachtet man nur Monate, in denen eine entsprechende Probe für das Metalimnion genommen wurde, liegen die Mittelwerte für diesen Tiefenbereich aber dennoch höher als für 2, 4 und 20 m und in einem ähnlichen Bereich wie für 6 m Wassertiefe.

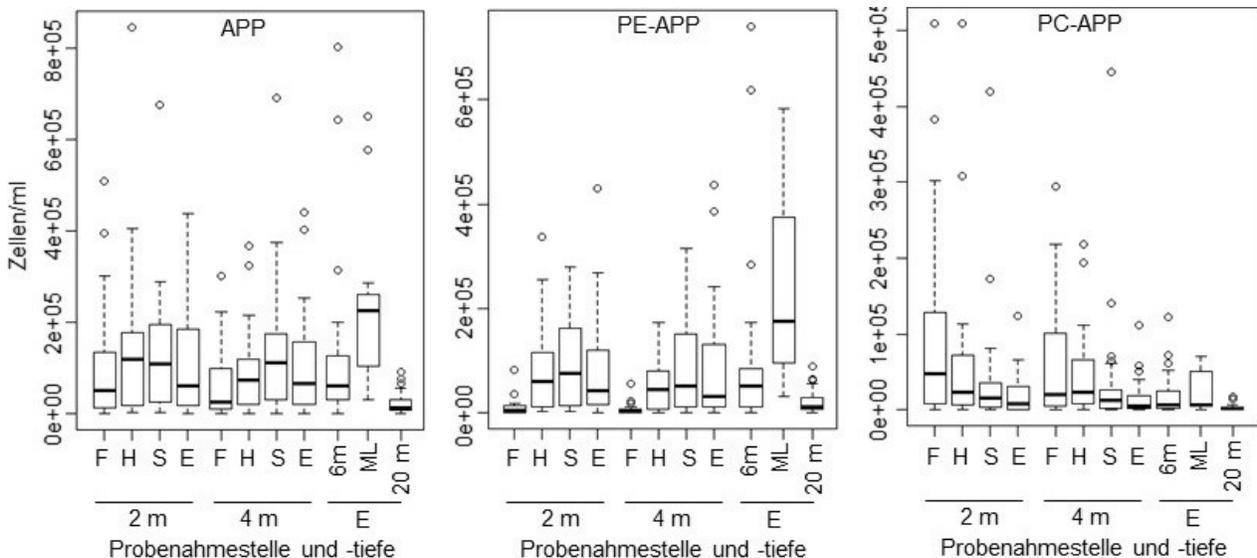


Abbildung 40: Zellzahlen von APP, PE-haltigen und PC-haltigen Picoplanktern an den Untersuchungsstellen- und tiefen 2013 bis September 2015; ML = Metalimnion

Tabelle 20: Mittel- und Extremwerte der Zellzahlen von APP, PE-haltigen und PC-haltigen Picoplanktern an den Untersuchungsstellen- und tiefen 2013 bis September 2015

		F2m	F4m	H2m	H4m	S2m	S4m	E2m	E4m	E6m	Emeta	E20m
APP/ml	Mittel	1,13E+05	6,67E+04	1,43E+05	9,50E+04	1,41E+05	1,35E+05	1,07E+05	1,08E+05	1,30E+05	2,41E+05	2,49E+04
	Max	5,10E+05	3,01E+05	8,47E+05	3,68E+05	6,76E+05	6,91E+05	4,38E+05	4,41E+05	8,02E+05	6,52E+05	9,13E+04
	Min	9,82E+02	7,36E+02	2,95E+03	1,72E+03	3,68E+03	2,21E+03	9,82E+02	2,45E+03	9,82E+02	3,24E+04	7,36E+02
PC/ml	Mittel	1,03E+05	5,95E+04	6,47E+04	4,60E+04	4,15E+04	3,92E+04	1,87E+04	1,62E+04	1,95E+04	2,41E+04	3,02E+03
	Max	5,09E+05	2,95E+05	5,10E+05	2,19E+05	4,20E+05	4,46E+05	1,24E+05	1,11E+05	1,23E+05	6,97E+04	1,67E+04
	Min	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,45E+02	0,00E+00						
PE/ml	Mittel	1,02E+04	7,21E+03	7,80E+04	4,89E+04	9,99E+04	9,55E+04	8,43E+04	9,17E+04	1,10E+05	2,43E+05	2,19E+04
	Max	8,32E+04	5,60E+04	3,38E+05	1,74E+05	2,80E+05	3,14E+05	4,29E+05	4,37E+05	7,41E+05	5,82E+05	8,84E+04
	Min	0,00E+00	0,00E+00	2,45E+03	7,36E+02	1,96E+03	7,36E+02	4,91E+02	1,47E+03	9,82E+02	3,14E+04	2,45E+02

3 Ergebnisse

Hinsichtlich der vorherrschenden Pigmentausrüstung wurden PE-haltige und PC-haltige Picoplankter differenziert. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich deutlich in ihrer Abundanz an den Untersuchungsstellen (Abbildung 40). PC-haltige Picoplankter dominieren in der Vorsperre, in Fließrichtung nimmt ihr Anteil kontinuierlich ab. Die PE-haltigen Picoplankter hingegen treten selten in der Vorsperre auf, erreichen im Metalimnion der Entnahmestelle sowie an den Stellen H und S die höchsten Zellzahlen. Ihr Anteil am Gesamt-APP nimmt in Fließrichtung kontinuierlich zu und beträgt an der Entnahmestelle fast 100%.

Die saisonale Entwicklung des APP erreichte ihr Maximum in allen drei Untersuchungsjahren in den Monaten Juni bis August (Abbildung 41, Abbildung 42). Die höchsten APP-Zellzahlen insgesamt wurden im Juni 2013 in 2 m Wassertiefe an der Stelle H sowie in 2 m und 4 m Wassertiefe an der Stelle S erreicht. Die entsprechende Probenahme fand 23 Tage nach Beginn starker Regenfälle (2. / 3. Juni 2013) statt. Die damit verbundene verstärkte Erosion spiegelte sich in erhöhten Trübungswerten, geringeren Sichttiefen und dem Eintrag von Nährstoffen wider (vgl. Kap. 3.1). In Hinblick auf die APP-Zellzahlen zeigen sich die Auswirkungen dieses Starkregenereignisses jedoch nur an den Stellen H und S, nicht aber in der Vorsperre oder der Entnahmestelle. Für die Entnahmestelle liegen entsprechende Daten zu Trübung, Sichttiefe, TP, SRP für den Zeitraum zwischen den starken Regenfällen und der Probenahme vor (Dr. L. Paul, Ökologische Station Neunzehnhain, TU Dresden). Die abspülungsbedingte Trübung schichtete sich im Wasserkörper etwa in 5 bis 15 m Tiefe ein und wurde dort als TP- und SRP-Maximum deutlich. Dieser Effekt war jedoch nach etwa zwei Wochen weitgehend abgebaut und zum Zeitpunkt der hier untersuchten Probenahme war an der Entnahmestelle kaum noch ein Einfluss der Nährstoffeinträge nachweisbar. Die entsprechenden APP-Zellzahlen an der Entnahmestelle liegen sogar auf niedrigerem Niveau als im Vormonat. An den Stellen H und S deuten die deutlich überdurchschnittlichen Zellzahlen jedoch darauf hin, dass noch ein verstärkter Nährstoffeintrag wirksam war. Abgesehen von dem Maximum im Juni wurden 2013 verglichen mit den anderen beiden Jahren geringere Zellzahlen erreicht. Auch zeigen die APP-Zellzahlen 2013 an der Entnahmestelle kein ausgeprägtes Sommermaximum, stattdessen wurden im Mai und im Juli die höchsten Zellzahlen dieses Jahres erreicht. Der saisonale Verlauf der Zellzahlen zeigte 2014 und 2015 gleichmäßigere Anstiege bzw. Rückgänge um das Sommermaximum an. In der Vorsperre wurde dieser Verlauf 2014 von einem lokalen Maximum im Juni unterbrochen. Im Vorfeld der Probenahme (14 Tage) wurden keine starken Regenfälle registriert [141], auch an den anderen Untersuchungsstellen wurde keine vergleichbare Steigerung der Abundanz verzeichnet. Daher kommen vermutlich lokale Ursachen für den Nährstoffeintrag, wie z.B. Bauarbeiten im Zulaufbereich in Frage.

3 Ergebnisse

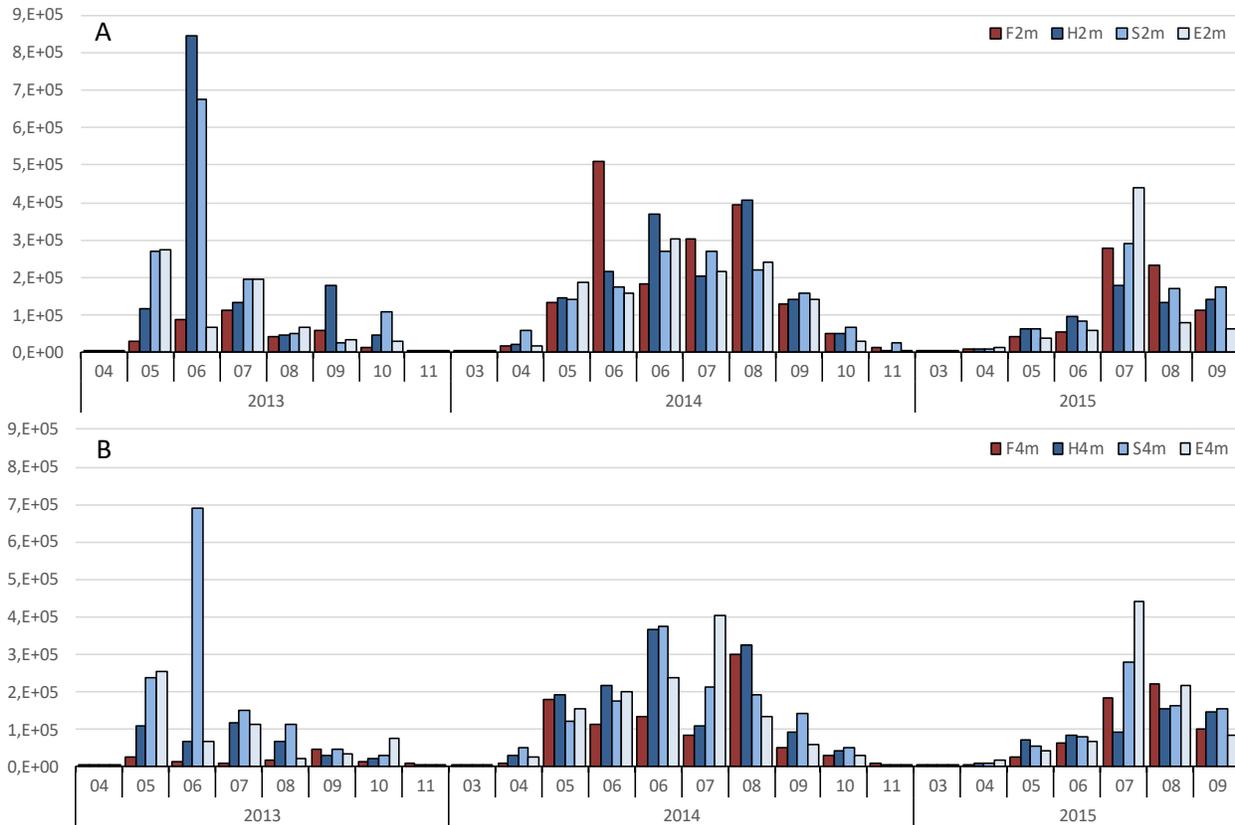


Abbildung 41: Saisonale Entwicklung des autotrophen Picoplanktons [Zellen / ml] an den vier Untersuchungsstellen in 2 m (A) und 4 m (B) Wassertiefe

In der Vorsperre Forchheim sowie an der Stelle H werden im Mittel höhere Zellzahlen in 2 m Wassertiefe als in 4 m Wassertiefe erreicht. In Fließrichtung gleichen sich die Werte zwischen diesen beiden Wassertiefen an und sind an der Untersuchungsstelle S sowie an der Entnahmestelle annähernd gleich.

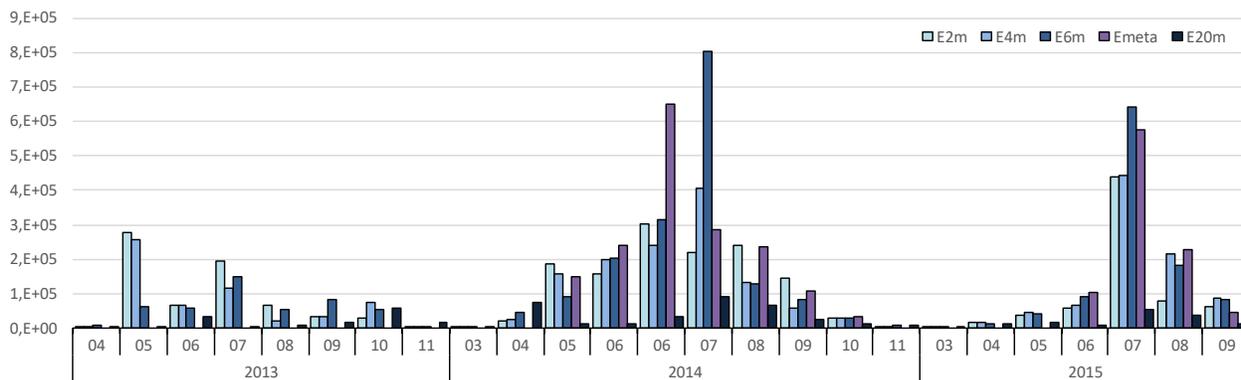


Abbildung 42: Saisonale Entwicklung des autotrophen Picoplanktons [Zellen / ml] an der Entnahmestelle in 2, 4, 6 und 20 m Wassertiefe sowie im Metalimnion

3 Ergebnisse

Hinsichtlich der Anteile PE- und PC-haltiger Picoplankter dominierte in der Vorsperre Forchheim ganzjährig das PC-APP, die Unterschiede zwischen beiden Gruppen fallen besonders während der Sommermonate deutlich aus (Abbildung 43).

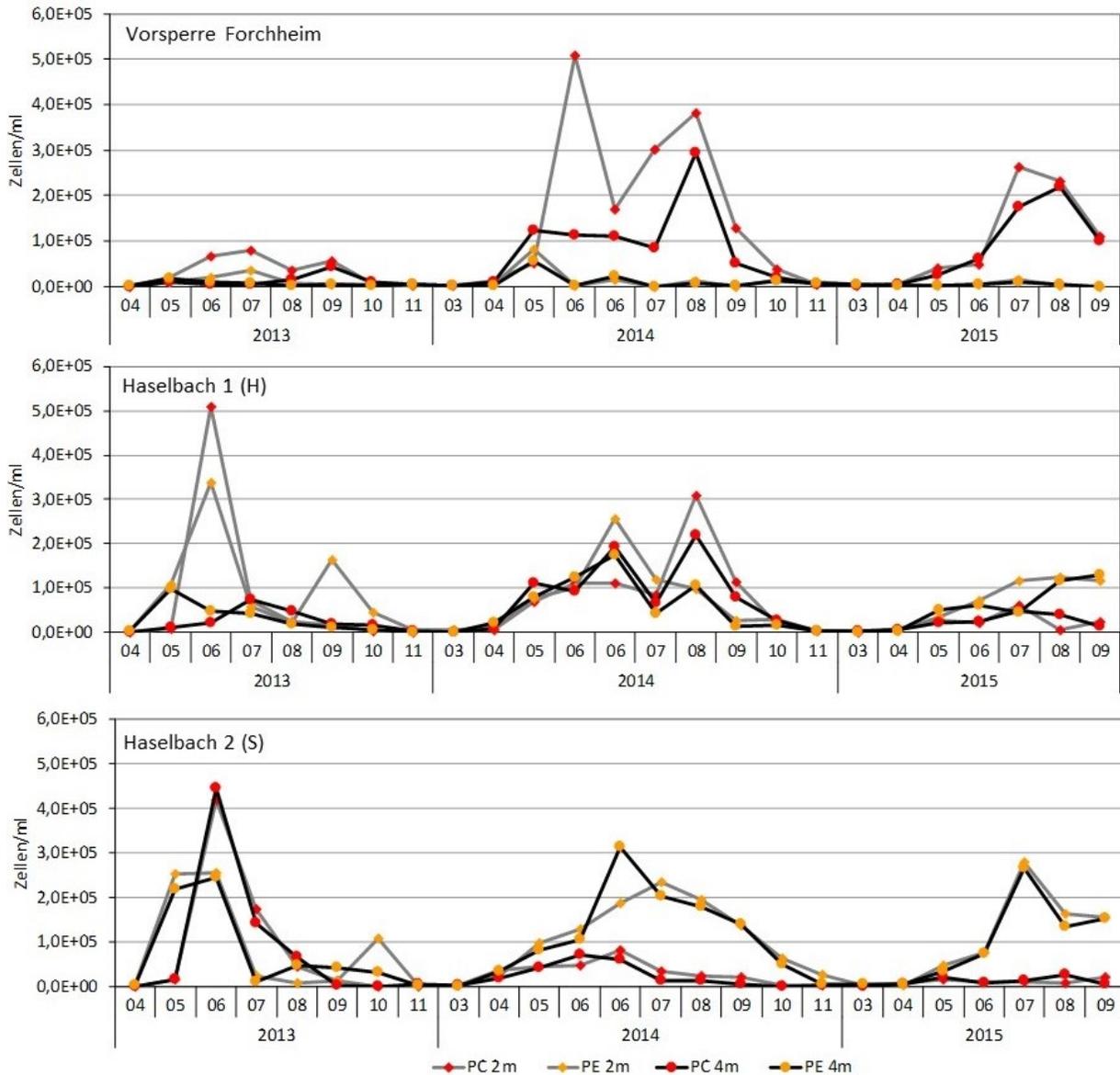


Abbildung 43: Zellzahlen des autotrophen Picoplanktons unterschieden in PE-haltige und PC-haltige Zellen für 2 und 4 m Wassertiefe der Untersuchungsstellen F, H und S

An der in Fließrichtung folgenden Untersuchungsstelle H erreichten beide Gruppen wechselnd die höchsten Zellzahlen. 2013 wurde der Spitzenwert im Juni mehrheitlich durch PC-APP gebildet, wobei das PE-APP ebenfalls sehr hohe Werte erreichte. Ein zweites Maximum 2013 wurde im September durch PE-APP gebildet. 2014 dominierten im Juni die PE-haltigen Zellen, im August wiederum das PC-APP. Nur im Jahr 2015 lagen die Zellzahlen des PE-APP an der Stelle H in allen Monaten über denen des PC-APP, wobei die Unterschiede der Zellzahlen weniger deutlich ausfallen als an den weiter in Fließrichtung folgenden

3 Ergebnisse

Untersuchungsstellen: An der Stelle S dominiert das PE-APP wesentlich deutlicher und nur in zwei Monaten (Juni und Juli 2013) wurden mehr PC-haltige als PE-haltige Zellen festgestellt. Bei den mehrheitlich durch PC-APP gebildeten Spitzenwerten im Juni und Juli 2013 an den Stellen H und S ist ein Zusammenhang zu erhöhter Trübung durch die starken Niederschläge Anfang Juni 2013 denkbar. An der Entnahmestelle liegen die Zellzahlen der PE-haltigen Picoplankter bis auf eine Ausnahme stets über denen der PC-haltigen Zellen (Abbildung 44). Nur im Juli 2013 erreichte das PC-APP an der Entnahmestelle in 2, 4 und 6 m Wassertiefe höhere Werte als das PE-APP. Hier ist ein Zusammenhang zum Vormonat an den Stellen H und S denkbar, die dort im Juni erreichten hohen Zellzahlen des PC-APP könnten sich in Fließrichtung zur Entnahmestelle hin verlagert haben.

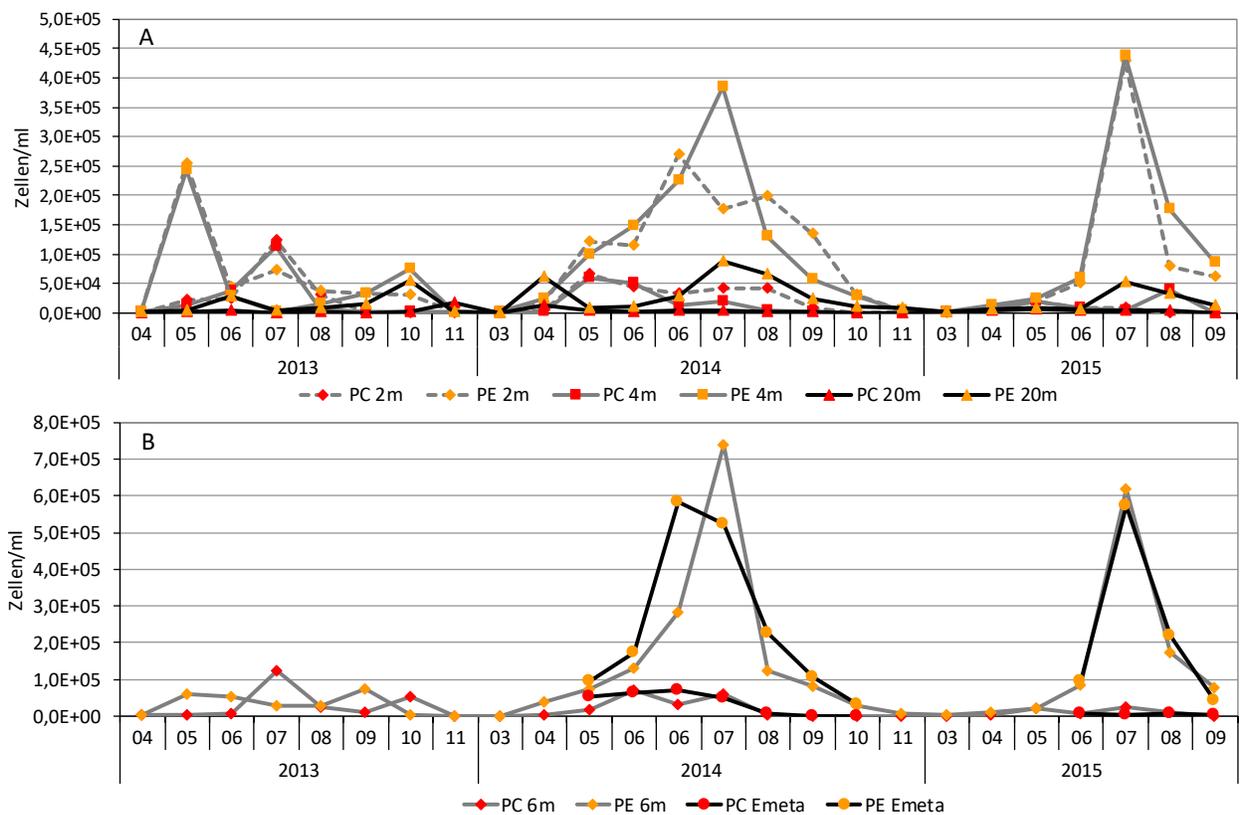


Abbildung 44: Zellzahlen des APP unterschieden in PE-haltige und PC-haltige Zellen an der Entnahmestelle in 2, 4 und 20m (A) Wassertiefe bzw. in 6 m Wassertiefe und im Metalimnion (B)

3 Ergebnisse

3.3.2 Quantifizierung und Differenzierung des APP mittels Durchflusszytometrie

Parallel zur mikroskopischen Auswertung wurden die Zellzahlen des APP 2014 und 2015 mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst. Je 50 µl der unfixierten, unverdünnten Proben wurden mit einer Flussrate von 35 µl / min in einem Probenstrom von 16 µm Durchmesser gemessen und dabei Signale mit einem Wert von unter 10.000 im forward scatter von der Detektion ausgeschlossen. Von den verbleibenden Signalen wurden phototrophe Zellen anhand ihres Chlorophyllgehaltes im Plot im Plot FL3-H/FSC-H separiert und diese Population im Plot count/width auf Partikel einer dem APP entsprechenden Größe eingegrenzt. Die Unterscheidung der picoplanktischen Zellen nach ihren vorherrschenden akzessorischen Photopigmenten PE oder PC erfolgt im Plot FL3-H (Chlorophyll) / FL4-H (Phycocyanin). Die Verwendung des Fluoreszenzkanals FL2-H (Phycoerythrin) in Kombination mit einem der anderen beiden erwies sich als nicht geeignet. Wie in der mikroskopischen Auswertung, zeigt der Vergleich der Probenahmestellen eine Verschiebung der Anteile von PE- und PC-APP mit einer zunehmenden Dominanz PE-haltiger Zellen in Fließrichtung (Abbildung 45).

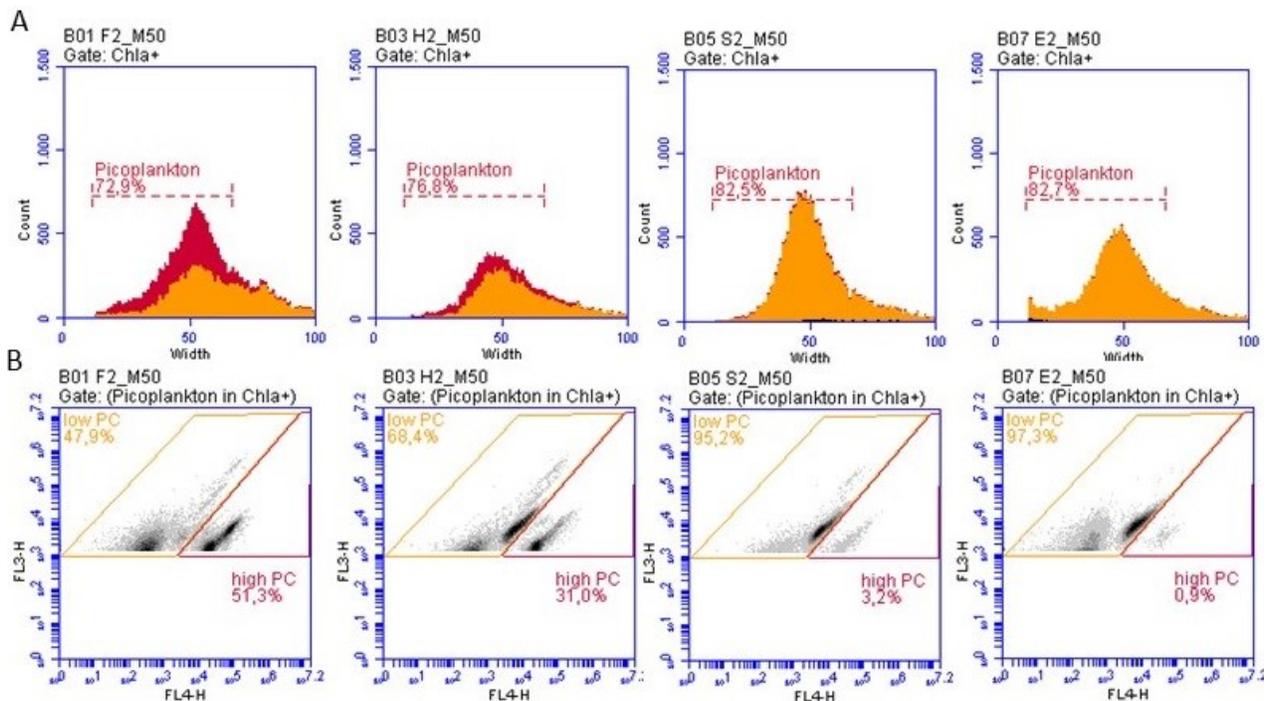


Abbildung 45 Plots für Proben von Juli 2015 aus 2m Wassertiefe der vier Probenahmestellen in Fließrichtung; Reihe A: Auftragung von Signalanzahl gegen Signalgröße zur Abgrenzung picoplanktischer Zellen; Reihe B: Auftragung der Chlorophyll-Fluoreszenz (FL3-H) gegen die Phycocyanin-Fluoreszenz (FL4-H) zur Unterscheidung PC-haltiger und PE-haltiger picoplanktischer Zellen; rot: Signale mit hohem PC-Gehalt; orange: Signale mit niedrigem PC-Gehalt

Für die Proben aus dem Jahr 2015 konnten sowohl die Gesamtzellzahl des APP als auch die Zellzahlen PE- und PC-haltiger Zellen in hoher Übereinstimmung zu den mikroskopisch ermittelten Werten quantifiziert

3 Ergebnisse

werden. Für die Proben des Jahres 2014 fiel hingegen die Korrelation zwischen den beiden Verfahren für die PE-haltigen Zellen geringer aus. Entsprechend lag auch die Korrelation für die APP-Gesamtzellzahl niedriger, während die PC-haltigen Zellen ähnlich gut wie 2015 quantifiziert werden konnten (Abbildung 46, Abbildung 47, Abbildung 48).

Tabelle 21: Korrelationskoeffizienten der Zellzahlen (Mikroskopie) und Eventzahlen (Durchflusszytometrie) für das APP

	PC/ml	PE/ml	APP/ml
2014 (n=100)	0,87	0,87	0,83
2015 (n=70)	0,84	0,59	0,64

Für diese Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen wurden die gates zunächst für alle Proben beibehalten um die Übertragbarkeit der Einstellung auf eine Vielzahl von Proben zu überprüfen. Für die Anwendung der Methode empfiehlt sich jedoch eine Überprüfung und gegebenenfalls Anpassung der gates für jede Probe.

[Hier eingeben]

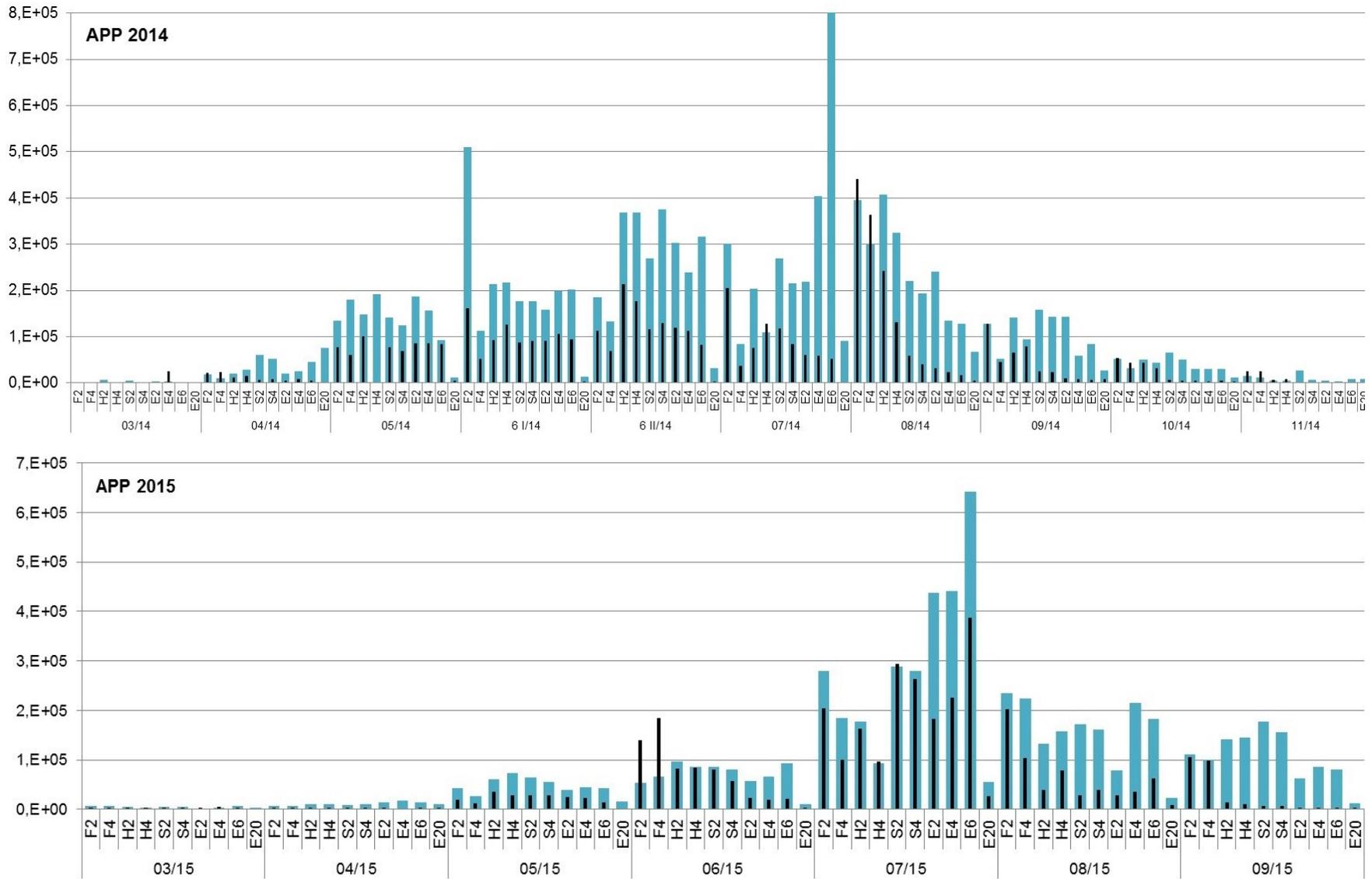
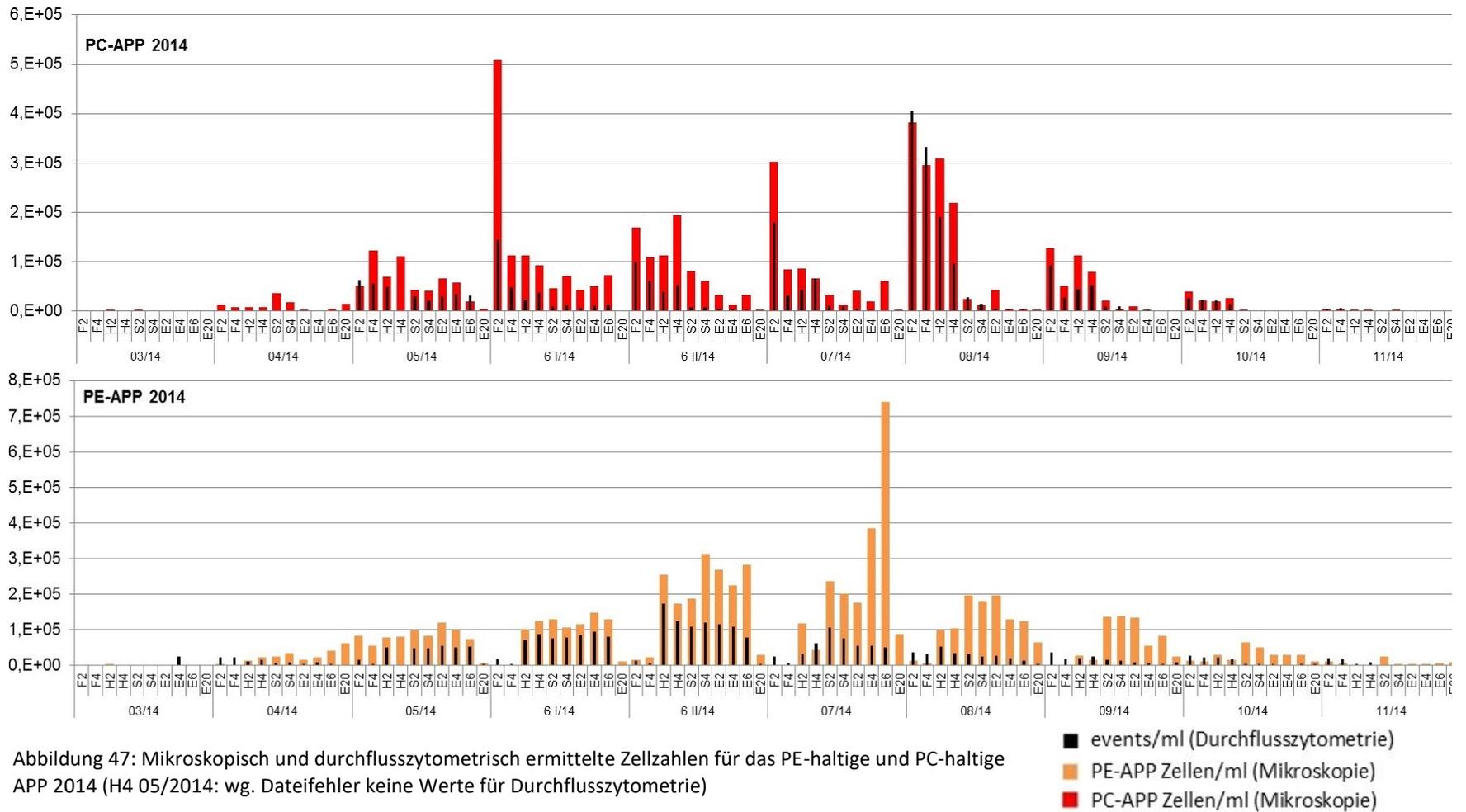
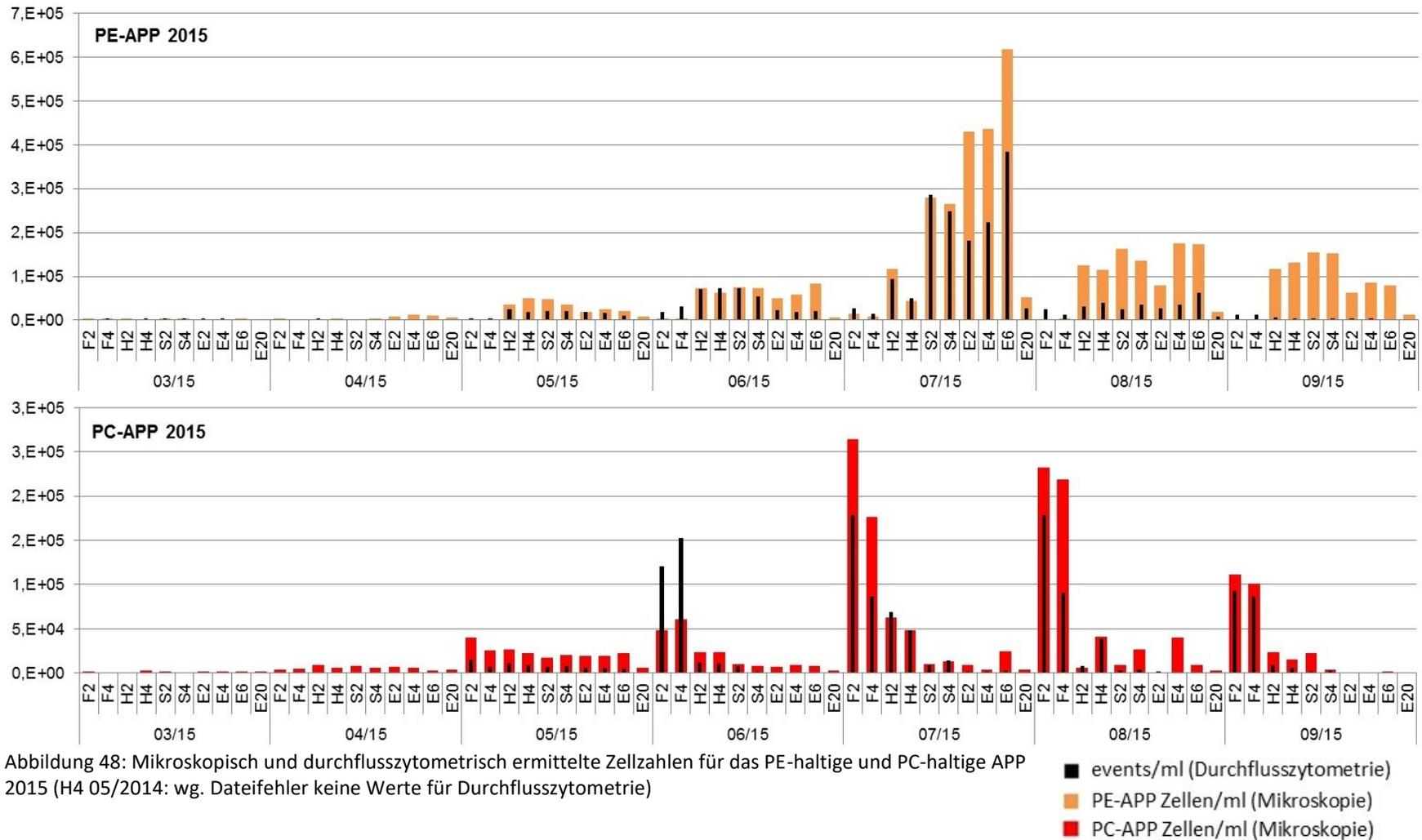


Abbildung 46: Mikroskopisch und durchflusszytometrisch ermittelte Zellzahlen für das APP 2014 und 2015 (H4 05/2014: wg. Dateifehler keine Werte für Durchflusszytometrie)

[Hier eingeben]



[Hier eingeben]



3 Ergebnisse

3.3.3 Einfluss von Umweltfaktoren auf die Abundanz des APP

Um die Einflüsse von Umweltfaktoren auf die Abundanz des APP aufzuklären, wurden Korrelationen zwischen den mikroskopisch ermittelten Zellzahlen und physikalischen, chemischen sowie meteorologischen Daten analysiert (Abbildung 49). Zur Unterscheidung saisonaler Einflussfaktoren von lokalen Unterschieden zwischen den Probenahmestellen wurde die Auswertung zusätzlich separat für die Proben der einzelnen Untersuchungsstellen sowie für den Tiefenbereich des Metalimnions (6 m Wassertiefe und Tiefe des Metalimnions nach Temperaturgradient) der Entnahmestelle durchgeführt.

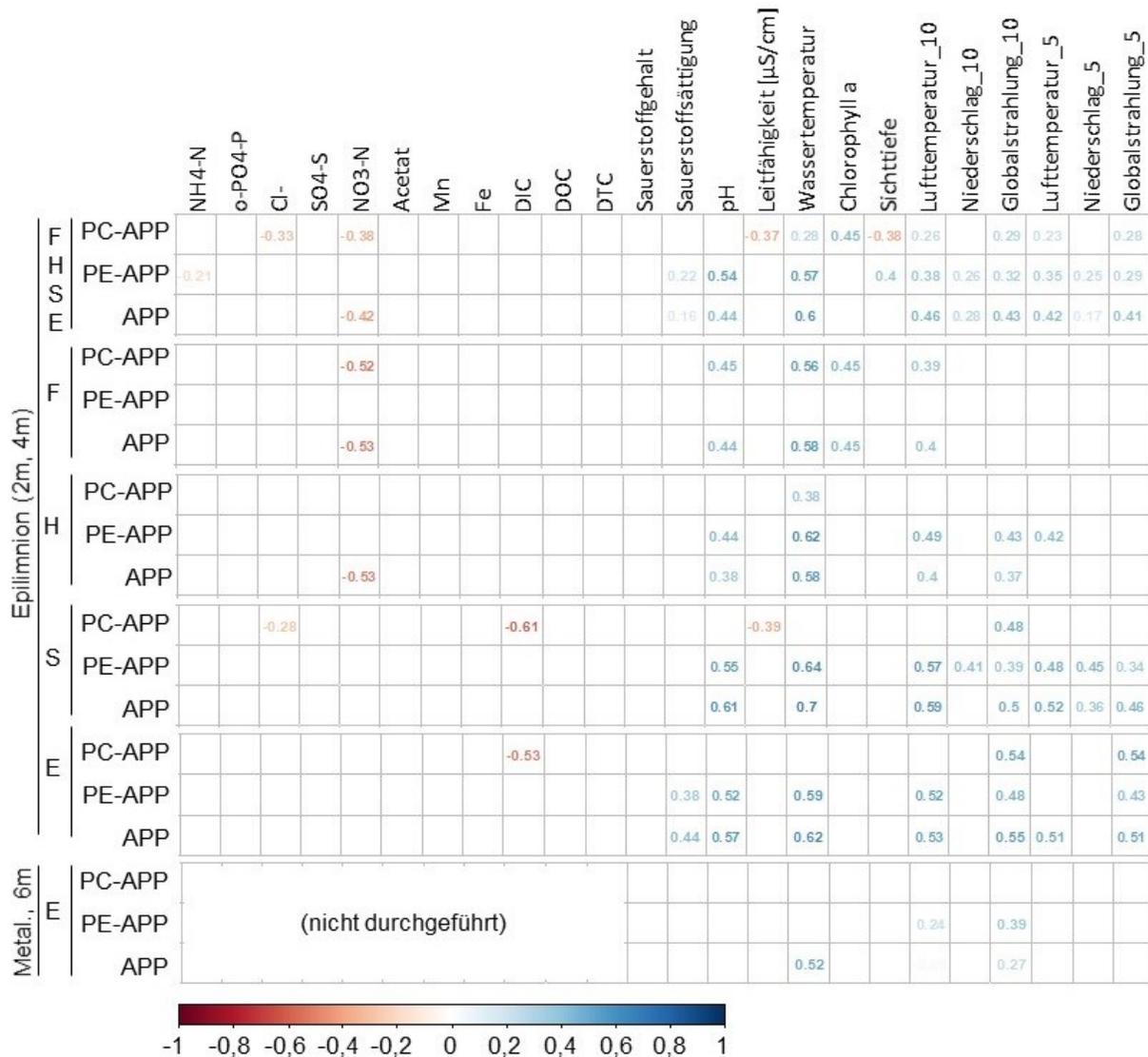


Abbildung 49: Darstellung signifikanter Zusammenhänge ($p < 0,005$, Korrelationskoeffizienten nach Pearson) von Umweltparametern mit den Zellzahlen von APP, PC-APP und PE-APP im Epilimnion (2m, 4m), sowie Metalimnion bzw. 6m Wassertiefe der Entnahmestelle; für die meteorologischen Parameter wurden jeweils die Mittelwerte bzw. Summe (Niederschlag) der 5 bzw. 10 Tage vor der Probenahme einbezogen

3 Ergebnisse

In den oberflächennahen Wasserschichten aller Untersuchungsstellen wird die Abundanz des APP generell am stärksten durch hydrophysikalische und meteorologische Parameter (Datengrundlage Agrarmeteorologisches Messnetz Sachsen [141]) beeinflusst. Unter den chemischen Gewässerkenngrößen weisen nur die Nitrat- und DIC-Konzentrationen einen Zusammenhang zu den Zellzahlen auf. Die separate Auswertung nach Probenahmestellen zeigt, dass ausschließlich in der Vorsperre und im Unterwasservorbecken ein negativer Zusammenhang zwischen Nitratkonzentrationen und Zellzahlen von PC-APP und APP besteht. Weiter stromaufwärts in der Hauptsperre, wo das PE-APP dominiert, korrelieren dagegen die Zellzahlen des weniger abundanten PC-APP negativ mit der DIC-Konzentration.

Unter den einbezogenen meteorologischen Parametern spielen vor allem die Lufttemperaturen und die Globalstrahlung eine Rolle für die Abundanz des APP, beide korrelieren positiv mit den Zellzahlen. Zwischen den 10-Tages- und 5-Tagesmitteln im Vorfeld der Probenahme zeigen sich kaum Unterschiede in Hinblick auf den Einfluss auf die Picoplankter. Die Korrelationskoeffizienten der 10-Tagesmittel sind geringfügig höher, was nahelegt, dass der Zeitraum, in dem die Faktoren im Gewässerhaushalt wirksam werden und die Picoplankter mit einer Wachstumsantwort reagieren, eher im Bereich von 10 Tagen liegt. Die Globalstrahlung zeigt vor allem an der Entnahmestelle einen Zusammenhang zur Abundanz der Picoplankter (Abbildung 50), nur in der Vorsperre zeigte die Analyse keinen Einfluss dieses Faktors. Dabei kann auch die Trübung bzw. Sichttiefe eine Rolle spielen, die die Eindringtiefe des Lichts beeinflusst. Höhere Sonneneinstrahlungen im Sommer treten parallel zur Hauptentwicklungszeit des APP auf, generell werden bei Werten über 140 W/m^2 höhere Zellzahlen erreicht, es besteht aber keine stetige Zunahme der Zellzahlen mit erhöhter Sonneneinstrahlung. Bei den maximal auftretenden Werten ist die Abundanz der PE-Picoplankter geringer als bei $140 - 180$ bzw. $220 - 260 \text{ W/m}^2$, was auf eine Photosynthesehemmung bei zu starker Sonneneinstrahlung hin deuten kann.

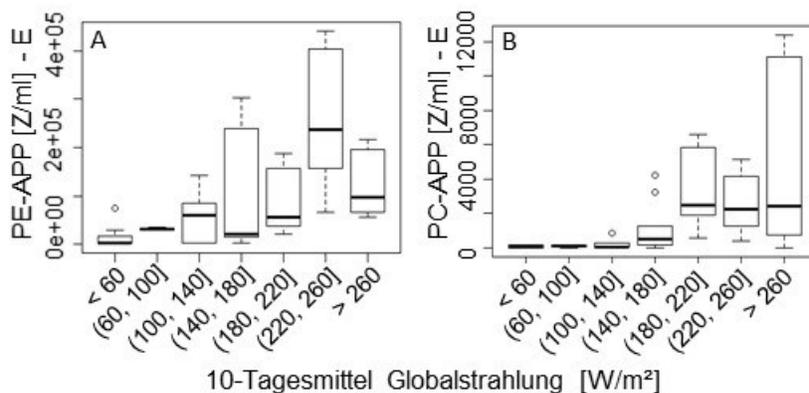


Abbildung 50: 10-Tagesmittel der Globalstrahlung im Vorfeld der Probenahme in Zusammenhang mit den Zellzahlen von PE-APP (A) und PC-APP (B) der Entnahmestelle in 2 und 4 m Wassertiefe

3 Ergebnisse

Während die PE-haltigen Picoplankter bei den höchsten Lufttemperaturen maximale Abundanzen erreichten, traten die höchsten Zellzahlen des PC-APP in einem etwas niedrigeren Temperaturbereich auf (Abbildung 51 A, B).

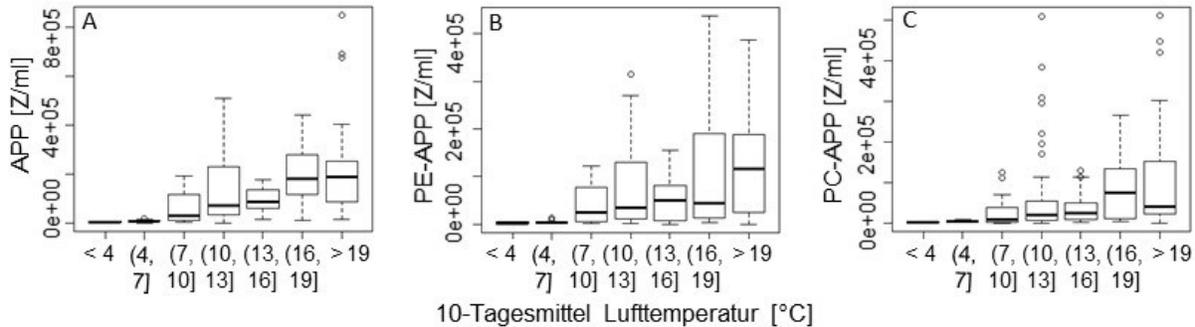


Abbildung 51: 10-Tagesmittel der Lufttemperaturen im Vorfeld der Probenahme in Zusammenhang mit den Zellzahlen von APP (A), PE-APP (B) und PC-APP (C) aller Untersuchungsstellen in 2 und 4 m Wassertiefe

Entsprechend der zunehmenden Lufttemperaturen treten auch höhere Zellzahlen bei steigender Wassertemperatur auf, dies zeigt die Analyse sowohl für alle Probenahmestellen gemeinsam als auch in der separaten Auswertung für das Gesamt-APP und die jeweils dominante Untergruppe (Abbildung 52). Im Bereich des Metalimnions ist die Wassertemperatur der Faktor mit der deutlichsten Korrelation zu den APP-Zellzahlen. Höhere Wachstumsraten für die Gattung *Synechococcus* bei höheren Temperaturen sind aus der Literatur bekannt (u.a [143]). Der Anstieg der Zellzahlen mit der Wassertemperatur verläuft jedoch nicht rein linear, wie Abbildung 52 für die Abundanz des PC-APP und PE-APP der oberflächennahen Wasserschichten zeigt. Weitere Einflussfaktoren im Gewässer können diesen Zusammenhang modifizieren, so können die lokalen Minima der Zellzahlen von PE-APP und PC-APP in Temperaturbereichen von 16-22 bzw. 19-22°C auf Konkurrenz anderer Phytoplankter unter diesen Temperaturbedingungen oder erhöhtem Fraßdruck zurückzuführen sein.

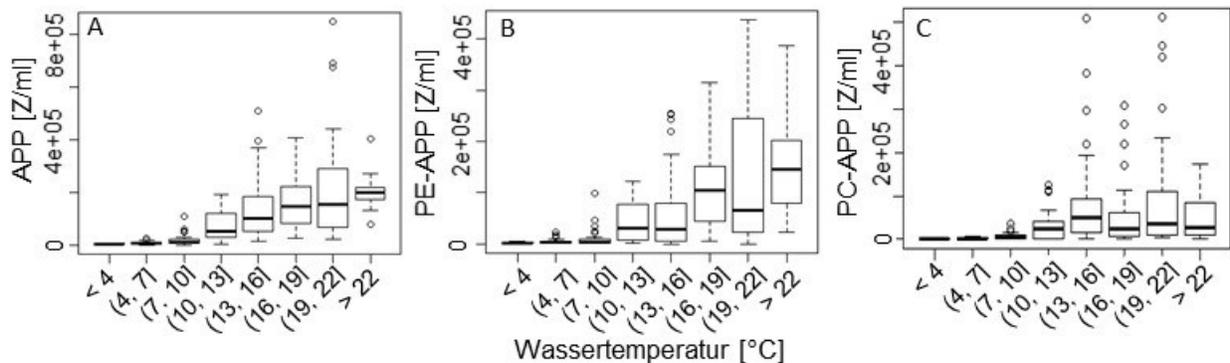
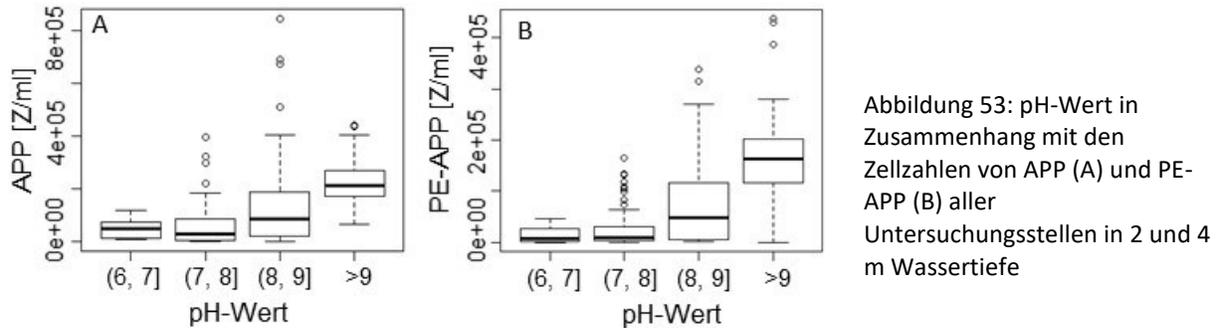


Abbildung 52: Wassertemperaturen in Zusammenhang mit den Zellzahlen von APP (A), PC-APP (B) und PE-APP (C) aller Untersuchungsstellen in 2 und 4 m Wassertiefe

3 Ergebnisse

Höhere pH-Werte korrelieren positiv mit den PE-APP- und APP-Zellzahlen, vor allem an den Stellen S und E ist dieser Zusammenhang ausgeprägt, im Metalimnion der Entnahmestelle besteht hingegen kein Zusammenhang mehr zwischen pH-Wert und Zellzahlen (Abbildung 53). Die höhere Photosyntheseaktivität in den oberen Wasserschichten könnte eine Erklärung für diese Zusammenhänge sein.

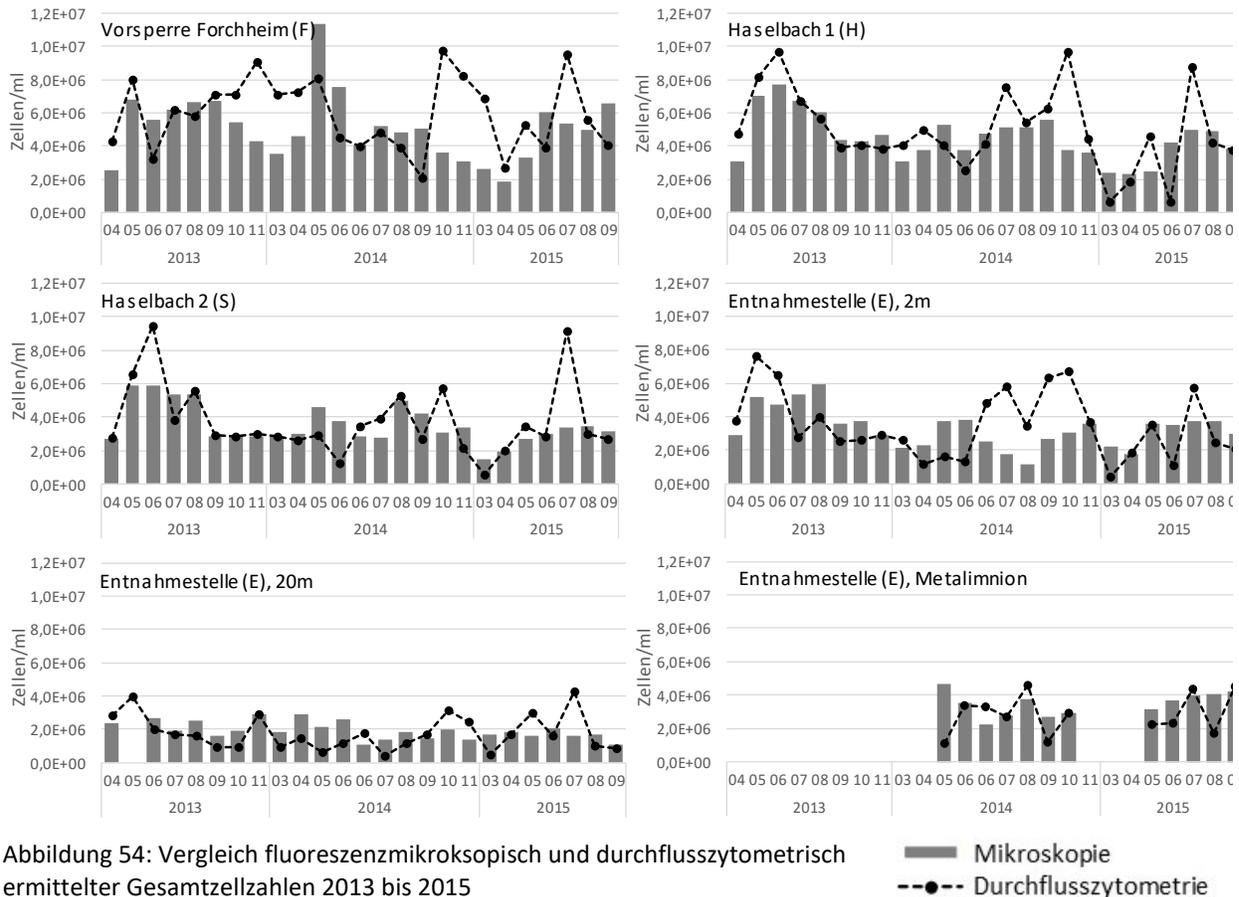


PE-APP und PC-APP zeigen bei der Auswertung aller Untersuchungsstellen gemeinsam gegenläufige Zusammenhänge zur Sichttiefe. Bei der separaten Auswertung für die jeweiligen Probenahmestellen tritt der Zusammenhang nicht auf, was dafür spricht, dass lokale statt saisonale Variationen hierbei eine Rolle spielen. Mit dem Anstieg der Sichttiefe in Fließrichtung von der Vorsperre zur Entnahmestelle steigt gleichzeitig der Anteil des PE-APP deutlich an während der des PC-APP zurückgeht. Dabei kann ein Zusammenhang mit den Lichtverhältnissen unter Wasser bestehen, die für die Pigmentausrüstung der Cyanobakterien eine wesentliche Rolle spielen [77]. Die elektrische Leitfähigkeit ist in der Vorsperre generell niedriger als in der Hauptsperre, sodass aufgrund der Veränderung der Pigmentzusammensetzung mit der Fließrichtung auch zu diesem Parameter eine Korrelation (PC-APP) besteht. Für einen ursächlichen Zusammenhang gibt es jedoch in der Literatur keine Hinweise. Die Sauerstoffsättigung korreliert nur an der Entnahmestelle schwach positiv mit der Abundanz des APP, was für einen saisonalen Einfluss des Faktors spricht, wozu jedoch auch die saisonale Photosyntheseaktivität anderer Phytoplankter beitragen kann. Ebenso tritt die positive Korrelation zwischen PC-APP sowie APP und Chlorophyll a in der Vorsperre auf. Dies spiegelt wider, dass parallel zu hohen Biomassenentwicklungen anderer Algen und Cyanobakterien wie im Frühjahr und Sommer auch hohe Abundanzen der PC-Picoplankter auftreten. Einen Einfluss auf die Pigmentausrüstung zeigt der Zusammenhang in diesem Fall nicht an, da in der Vorsperre ganzjährig das PC-APP deutlich dominiert.

3 Ergebnisse

3.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

Die Gesamtzellzahl der Proben 2013 bis 2015 wurde fluoreszenzmikroskopisch nach Anfärbung mit Propidiumjodid ermittelt und zum Vergleich mittels Durchflusszytometrie nach Anfärbung mit SYBRGreen bestimmt (Abbildung 54).



Zwischen den mikroskopisch und durchflusszytometrisch bestimmten Gesamtzellzahlen treten im Jahresverlauf z.T. deutliche Diskrepanzen auf. Am deutlichsten sind diese in der Vorsperre Forchheim, dabei besonders für die Probenahmen der Monate Oktober, November (2013/2014) und März (2014/2015). Die beste Übereinstimmung weisen die beiden Methoden für Stelle S auf, hier fallen nur die Monate Juni 2013 und Juli 2015 auf, in denen Ergebnisse der Durchflusszytometrie deutlich über denen der Mikroskopie lagen. Generell liegen die Zellzahlen der durchflusszytometrischen Analyse häufig über den mikroskopisch ermittelten. Dies kann durch das höhere Detektionslevel der Durchflusszytometrie bedingt sein, welche bereits Zellen mit einem Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ erfasst. Liegen in der Probe Detritusflocken mit Chloroplasten vor, so können diese in der Durchflusszytometrie als Partikel mit detektiert werden und zu einer Erhöhung der Gesamtzellzahl beitragen [144]. In der Mikroskopie hingegen

3 Ergebnisse

können Detritusflocken sogar Zellen verdecken, die in der Durchflusszytometrie im Probenstrom vereinzelt werden. Dieser Effekt könnte erklären, dass in der flachen Vorsperre Forchheim besonders während der Vollzirkulation am Jahresbeginn und –Ende häufig deutlich höhere Zellzahlen anhand der Durchflusszytometrie ermittelt wurden.

3 Ergebnisse

3.5 Differenzierung und Quantifizierung der bakteriellen Gemeinschaft mittels CARD-FISH

3.5.1 Anteil hybridisierbarer Bacteria

Der Anteil der *Eubacteria* an der Gesamtzellzahl (Propodiumiodid-Färbung, vgl. Kap. 3.4) wurde durch Fluoreszenzmarkierung mit den Sonden EUB I (*Bacteria*), EUB II (*Planctomycetes*) und EUB III (*Verrucomicrobia*) ermittelt (Abbildung 55). Der Anteil gibt auch Aufschluss über die Hybridisierbarkeit der Zellen in der jeweiligen Probe. Darüber hinaus spielt jedoch auch das Detektionsspektrum der jeweiligen Sonden eine entscheidende Rolle. Die Sonde EUB I bindet an 91 % der Datenbankeinträge für *Bacteria* (SILVA-Datenbank, Januar 2018, [122]) ohne Basenfehlpaarung. Für die Phyla mit den häufigsten Süßwassertaxa (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Alpha-* und *Betaproteobacteria*, *Cyanobacteria*) liegen die Anteile jeweils bei über 95%. Auf Grundlage der Datenbank rdp erfasst EUB I jedoch nur 75% der Einträge, was auch für die quantitativ hauptsächlich relevanten Phyla gilt (*Actinobacteria* 82 %, *Bacteroidetes* 79 %, *Alphaproteobacteria* 67 %; *Betaproteobacteria* 74 %; Klasse *Cyanobacteria* 77 %; rdp probe match tool ([131], Januar 2018). Ergänzend zu EUB I detektieren die Sonden EUB II 48 % bzw. 33 % der *Planctomycetes* und EUB III 94 % bzw. 71 % der *Verrucomicrobia* (Angaben entsprechen jeweils dem Anteil der Datenbankeinträge in SILVA bzw. rdp).

Der Anteil der mit dem Sondengemisch EUB I - III detektierbaren Zellen an der Gesamtzellzahl (Abbildung 55) lag im Mittel aller Proben bei 71 %. Mit 61 % bzw 64 % wurden für die Proben aus 20 m Wassertiefe sowie dem Metalimnion der Entnahmestelle niedrigere Anteile ermittelt, in 2 m Wassertiefe der Probenahmestellen F, H und E lagen die Werte dagegen deutlich höher (78, 76 und 77 %). Die Standardabweichungen für die zehn Parallelen je Probe lagen zwischen 6 und 8 %. An der Stelle S wurden vor allem aufgrund eines niedrigen Wertes von September 2014 (34,2%) im Mittel nur 69 % der Zellen mit dem Sondengemisch EUB I - III detektiert.

Das Auftreten großer Anteile extrem kleiner Zellen (*Ultramicobacteria*), die für verschiedene Taxa der mikrobiellen Gemeinschaft im Süßwasser sogar typisch sind, kann die mikroskopische Detektion der Zellen beeinträchtigen. Die Anteile der Hybridisierungssignale an der Gesamtzellzahl können in solchen Proben niedriger ausfallen, da die Zellen nach Sondenmarkierung schlechter erkennbar sind als nach Färbung mit PI. Dieser Effekt liegt z.B. den auffällig niedrigen EUB-Anteilen aller Proben von Juni 2015 zugrunde. Eine ausgeprägte Hintergrundmatrix, vor der insbesondere die Sondensignale schwerer erkennbar sind, trat z.B. häufig bei der Probe aus 20 m Tiefe der Entnahmestelle auf.

3 Ergebnisse

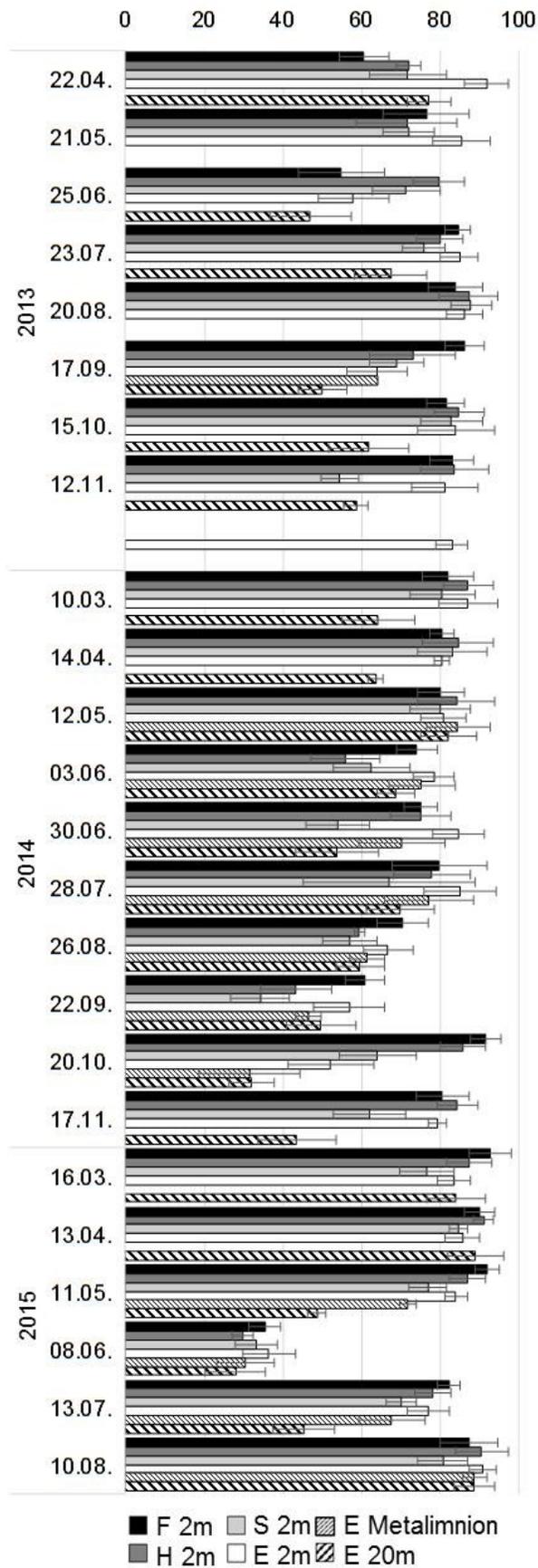


Abbildung 55: Anteile der Hybridisierungssignale der *Eubacteria* nach Markierung mit den Sonden EUB338 I, II und III an der Gesamtzellzahl nach Propidiumiodidfärbung

3 Ergebnisse

3.5.2 Alphaproteobacteria

Die Quantifizierung der *Alphaproteobacteria* mittels CARD-FISH wurde mit den Sonden A968 für *Alphaproteobacteria* und der Sonde LD12-121 für die Clade LD12/*Candidatus Pelagibacter* durchgeführt. Der Abgleich der Nukleotidsequenz der Sonde A968 mit den Datenbankeinträgen der 16S rDNA-Sequenzen (SILVA-Datenbank, Januar 2018, [122]) der Hauptordnungen der pelagischen Vertreter der *Alphaproteobacteria* zeigt unterschiedliche Ergebnisse. Während hohe Anteile der eingetragenen Vertreter der *Rhizobiales* 80%, *Caulobacterales* 87%, *Rhodobacterales* 97% und *Sphingomonadales* 97 % ohne Basenfehlpaarung von der Sonde gebunden werden können, trifft das nur auf 45% der *Rhodospirillales*, 3 % der *Rickettsiales* und 2 % der Clade SAR 11 zu. Die bindungsrelevante Nukleotidsequenz der quantitativ besonders bedeutsamen Gruppe SAR 11 weicht in einer Base am 5'-Ende von der zur Sonde komplementären Sequenz ab. Da eine Basenfehlpaarung am Ende der Sequenz die Bindung der Sonde deutlich weniger destabilisiert als in zentralen Bereichen, wird dieser mismatch vom Probe Match Tool der Datenbank SILVA nur mit einem niedrigen mismatch weight von 0,3 bewertet (SILVA Probe Match and Evaluation Tool - TestProbe 3.0, Januar 2018). Unspezifische Bindungen der Sonde A968 für im Süßwasser relevante Taxa können vor allem für Vertreter der *Planctomycetes* (12 %) und *Deltaproteobacteria* (34 %) auftreten. Zu weiteren quantitativ bedeutsamen Taxa (z.B. *Actinobacteria* / hgcl-clade, *Cyanobacteria* / *Synechococcales*) bestehen teilweise nur Sequenzunterschiede in einer Base. Diese liegen jedoch im Unterschied zur Sequenz der SAR 11-Clade zentral, sodass die Stabilität einer unspezifischen Bindung hier deutlich geringer ist (mismatch weight 1,5 (SILVA Probe Match and Evaluation Tool - TestProbe 3.0, Januar 2018)).

Die Sonde LD12-121 detektiert hingegen hochspezifisch fast ausschließlich die Zielgruppe SAR 11. Jedoch werden nur 24 % der eingetragenen Vertreter dieser Clade ohne Basenfehlpaarung durch die Sonde erkannt, die übrigen weisen an drittletzter Stelle einen Sequenzunterschied zur Sonde auf, der durch das Probe Match Tool der Datenbank SILVA mit 1,0 gewichtet wird.

3 Ergebnisse

Abbildung 56 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung von *Alphaproteobacteria* und SAR 11-Clade als Anteile an der Gesamtzellzahl für alle Untersuchungsstellen von 2013 bis 2015. Die für die Untergruppe SAR 11 ermittelten Werte sind sehr häufig höher als für *Alphaproteobacteria* insgesamt. Der Grund dafür ist möglicherweise die geringe Abdeckung einzelner Ordnungen der *Alphaproteobacteria* durch die Sonde A968 oder eine beeinträchtigte Bindung an bestimmte Nukleotidsequenzen der *Alphaproteobacteria* in den Proben unter den gewählten Bedingungen.

Im Vergleich der Proben fallen besonders die hohen Werte für SAR 11 in der ersten Jahreshälfte 2013 auf. 2014 erreicht die Gruppe in der Hauptsperre in den Sommermonaten die höchsten Anteile, die jedoch unter den Höchstwerten von 2013 liegen. 2015 wurden generell niedrigere Werte für SAR 11 ermittelt, mit einem Anstieg im Juli und August. Die Werte für *Alphaproteobacteria* zeigen eine weniger ausgeprägte Saisonalität und unterscheiden sich weniger zwischen den Jahren. Die Höchstwerte wurden im August 2015 erreicht. Sehr niedrige Anteile wurden mit beiden Sonden im Juli 2015 ermittelt, was auf die geringe Hybridsierbarkeit dieser Proben zurückzuführen ist, die sich auch in der Detektion mit den Sonden EUB I-III gezeigt hat.

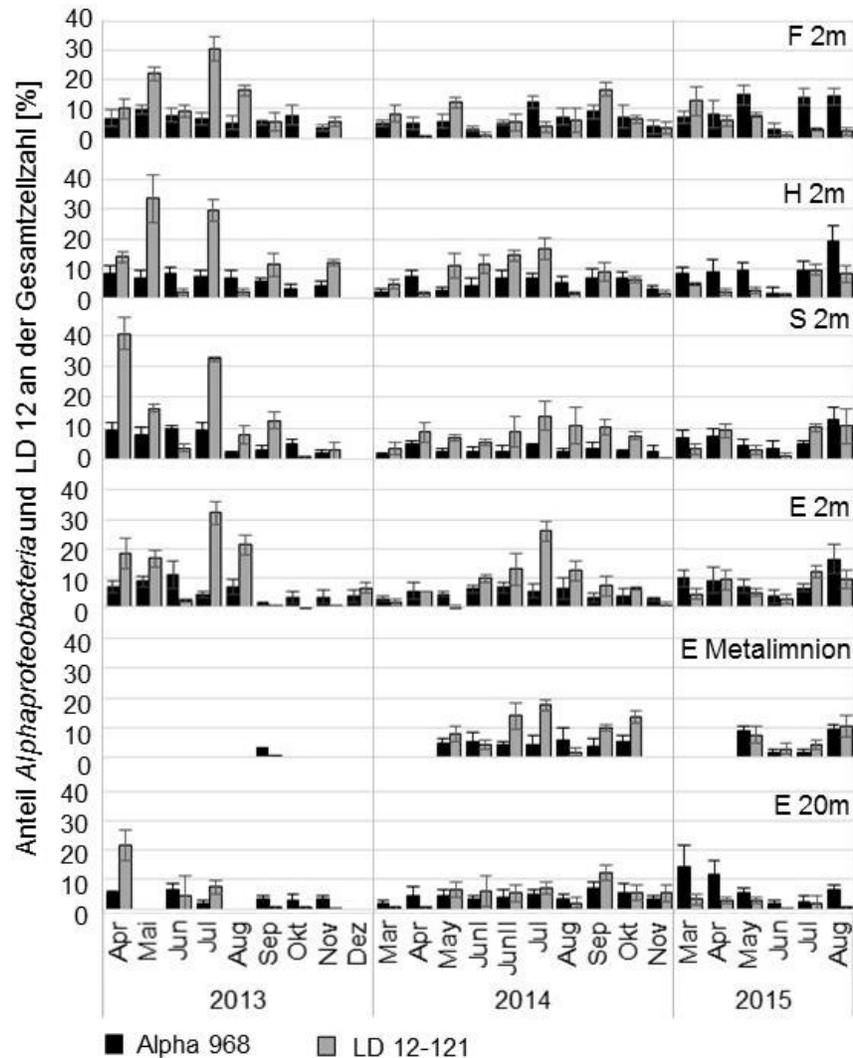


Abbildung 56: Anteile der Hybridisierungssignale von *Alphaproteobacteria* (Sonde A968) und SAR 11/LD12 clade/*C. Pelagibacter* (Sonde LD12-121) an der Gesamtzellzahl (PI-Färbung)

3 Ergebnisse

Als mögliche Alternative zur Sonde A968 wurde die Sonde Alpha688 getestet, deren Sequenz der des Primers A688 [112] entspricht. Gemäß Datenbankabgleich erfasst die Sonde die relevanten Ordnungen (*Acetobacterales*, *Caulobacterales*, *Sphingomonadales*, *Rhodobacterales*, *Rhizobiales*, SAR 11 clade) zu > 97 % mit Ausnahme der *Rhodospirillales* (90 %) und vor allem der *Rickettsiales* (22 %). Darüber hinaus werden auch 55 % der *Deltaproteobacteria* ohne Basefehlpaarung detektiert. Für diese Sonde sind noch keine Hybridisierungsbedingungen bekannt. Da für viele quantitativ relevante pelagische *Alphaproteobacteria* keine Reinkulturen zur Verfügung stehen (u.a. für LD12), konnten jedoch nur Wasserproben im Vergleich mit den Sonden A968 und LD12-121 hybridisiert werden. Abbildung 57 zeigt die Ergebnisse der Hybridisierung mit Alpha688 bei verschiedenen Formamidkonzentrationen für ausgewählte Proben im Vergleich mit den Resultaten für die Sonde A968 und LD12-121.

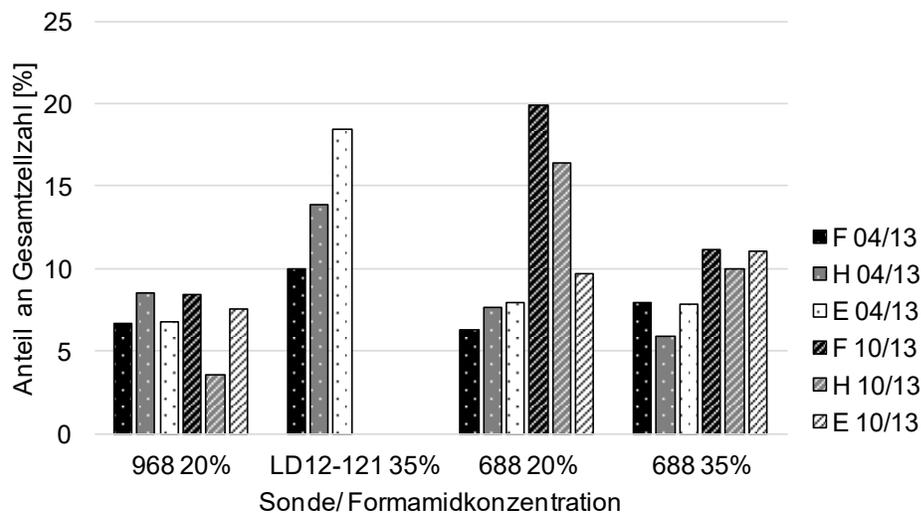


Abbildung 57: Anteile der Hybridisierungssignale von *Alphaproteobacteria* nach Markierung mit Sonde A968, LD12-121 und Alpha688 an der Gesamtzellzahl (PI-Färbung)

Bei Verwendung von 20 % Formamid liegen die ermittelten Anteile der *Alphaproteobacteria* nach Hybridisierung mit Alpha688 an der Gesamtzellzahl für einzelne Proben (F und H 10/13) deutlich höher als bei Hybridisierung mit A968. Ein Vergleich der entsprechenden Proben für die Hybridisierung mit LD12-121 ist leider nicht möglich, da der Anteil hybridisierter Zellen unterhalb der Hintergrundfluoreszenz lag. Der Vergleich zeigt insgesamt sehr inkonsistente Ergebnisse zwischen den Sonden. Die Ergebnisse der 16S rDNA-Amplikonsequenzierung können aufgrund der Größenfraktionierung sowie grundlegender methodischer Unterschiede der Quantifizierung von Sequenzanteilen anstelle von Zellzahlen nicht zur Validierung herangezogen werden. Die ermittelten Sequenzanteile der *Alphaproteobacteria* von 3-7% (April 2013) und 12-36 % (Oktober 2013) bzw. für LD12 von 0,5-4 % (April 2013) und 7-33 % (Oktober 2013) legen jedoch zumindest für Oktober höhere Zellzahlen nahe als sie z.B. durch Hybridisierung mit LD12-121 ermittelt wurden. Die durch die Hybridisierung mit Alpha688 (20 % Formamid) ermittelten Signalanteile liegen zwar näher an diesem Bereich als die anhand der Sonde A968 bestimmten, jedoch stellen sich im

3 Ergebnisse

Vergleich mit den Sequenzierungsdaten die Verhältnisse zwischen den Proben unterschiedlich dar. Die Sequenzanteile von LD12 an *Bacteria* stiegen im Oktober 2013 in Fließrichtung von 7% (F) auf 34 % (E) deutlich an, während die Zellzahlenanteile der *Alphaproteobacteria* nach Hybridisierung mit Alpha688 die umgekehrten Verhältnisse ergab. Die stark unterschiedlichen Ergebnisse der Hybridisierung mit den verschiedenen Sonden deutet darauf hin, dass die Detektion der Zielzellen durch die Sonden unter den gewählten Bedingungen optimiert werden muss, wozu idealerweise Reinkulturen verwendet werden sollten. Neben der Sequenzidentität von Sonde und Ziel-DNA, Eigenschaften der Probe sowie den Hybridisierungsbedingungen können auch Sekundärstrukturen in dem zur Anlagerung der Sonde genutzten Bereich der 16S rDNA die Detektion beeinflussen.

Abbildung 58 zeigt die jeweiligen postulierten Sekundärstrukturen an den Bindestellen der Sonden A688, LD12-121 und A968 in der 16S rDNA von *C. Pelagibacter* (web service mfold (<http://unafold.rna.albany.edu>) [145] [146], [147]). Die Bindung der Sonde LD12-121 umfasst direkt eine Hairpinstruktur und angrenzende Bereiche, die die Bindung der Sonde eventuell deutlich erschweren, dennoch lagen die Anteile der entsprechenden Hybridisierungssignale meist höher als mit der Sonde A968 für *Alphaproteobacteria* insgesamt. Der Bindungsbereich letztgenannter Sonde liegt gut zugänglich am Rand einer größeren Hairpin-Struktur. Für die Sonde A688 erschwert möglicherweise die benachbarte Hairpinstruktur die Anlagerung der Sonde.

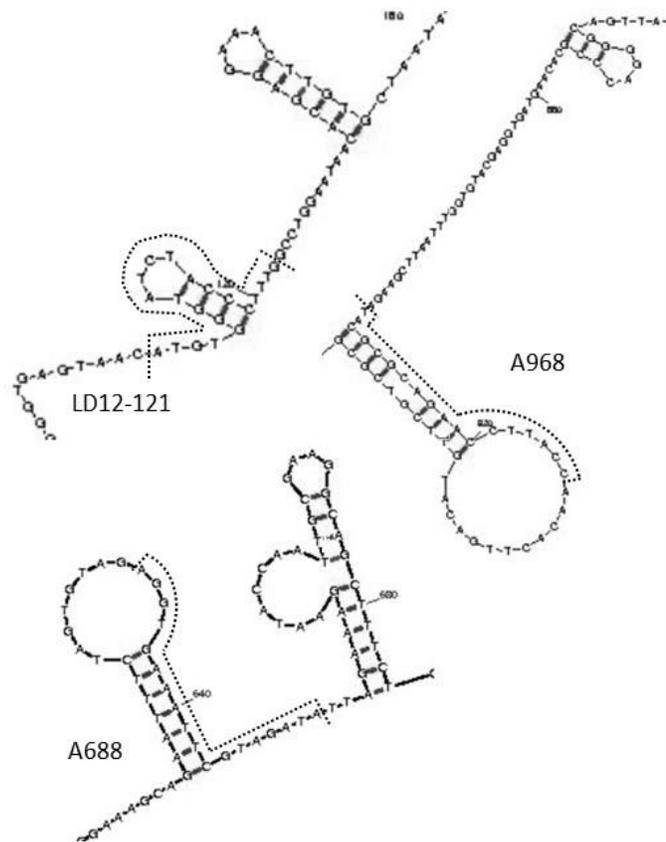


Abbildung 58: Bindestellen der Sonden A688, LD12-121 und A968 in der räumlichen Struktur der 16S rDNA von *C. Pelagibacter ubiquum* strain HTCC1062 (Accession-Nr. NR_074224.1)

In der Analyse mariner Ökosysteme wird zunehmend auf die Detektion der *Alphaproteobacteria* als Phylum verzichtet und stattdessen spezifische Sonden für die häufigsten Taxa *Roseobacter* und SAR 11 verwendet [148]. Ein analoges Vorgehen, z.B. mit Sonden für die Gruppe LD12/ *C. Pelagibacter* und die Gattung *Roseomonas*, könnte auch für die CARD-FISH-Analyse der *Alphaproteobacteria* von Süßwasserökosystemen aussagekräftige und verlässliche Ergebnisse ermöglichen.

3 Ergebnisse

3.5.3 Betaproteobacteria

Mit der Sonde Bet42a werden die in der Datenbank SILVA verzeichneten Vertreter der *Betaproteobacteria* zu 100% oder sehr hohen Anteilen ohne Basenfehlpaarung gebunden. Es gibt laut derzeitigen Datenbankeinträgen so gut wie keine unspezifischen Bindungen an andere im Süßwasser vorkommende Taxa (Ausnahme *Cyanobacteria/Prochlorothrix* 33%). Unter Einbeziehung einer Basenfehlpaarung erkennt die Sonde hohe Anteile der *Gammaproteobacteria*, die im Süßwasser jedoch in sehr niedriger Abundanz auftreten (u.a. [15]).

Die mittleren Anteile der Hybridisierungssignale für *Betaproteobacteria* an der Gesamtzellzahl (Abbildung 59) sind in der Vorsperre Forchheim mit 26 % am höchsten und gehen in Fließrichtung auf 21 % (H) bzw. 18 % (S und E) zurück. In der Vorsperre treten vor allem höhere Spitzenwerte (März 2014, April und Mai 2015) auf während für die übrigen Proben ähnliche Anteile wie an den anderen Probenahmestellen ermittelt wurden. Saisonal sind in der Hauptsperre die Anteile der *Betaproteobacteria* im Frühjahr am höchsten.

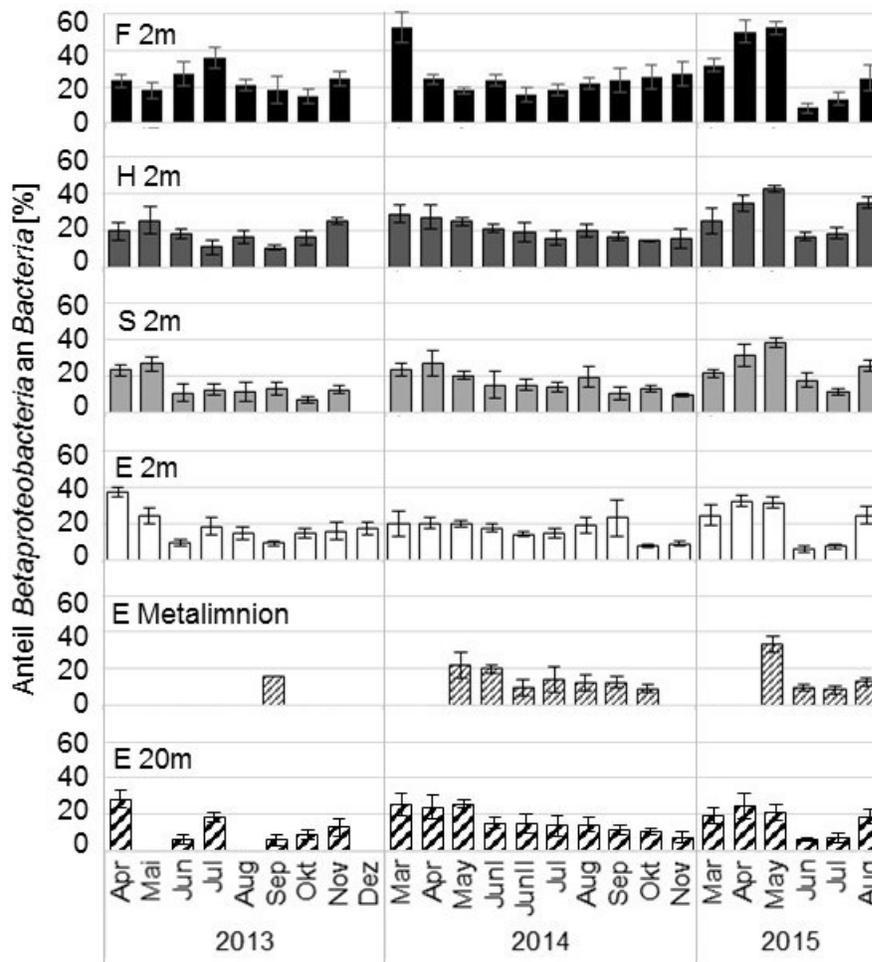


Abbildung 59: Anteil Hybridisierungssignale für *Betaproteobacteria* nach Sondenmarkierung mit Bet42a an Gesamtzellzahl (PI-Färbung)

3.6 Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft mittels 16S-Amplikon Pyrosequenzierung

3.6.1 Überblick über den Datensatz

Die Auswahl der untersuchten Jahre erfolgte anhand meteorologischer Parameter mit Einfluss auf die Schichtungs- und Zirkulationsverhältnisse im Wasserkörper. 2012 folgte auf extrem niedrige mittlere Lufttemperaturen im Februar ein sehr steiler Temperaturanstieg, der zu einer kurzen Frühjahrszirkulationsphase führte. 2014 unterschied sich von anderen Jahren durch das Fehlen einer geschlossenen Eisdecke. Der Temperaturanstieg im Frühjahr verlief relativ langsam, sodass eine ausgedehnte Frühjahrszirkulation bestand. 2013 bestand die Eisbedeckung im Frühjahr außergewöhnlich lange, gefolgt von einem ähnlich steilen Temperaturanstieg wie 2012. Darüber hinaus traten im Juni 2013 Starkniederschläge verbunden mit Sedimenteintrag auf (vgl. Kap. 3.1.2). Um die saisonale Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaft analysieren zu können, wurden jeweils eine Probe zum Zeitpunkt der Frühjahrszirkulation, mindestens zwei Proben aus der Sommerstagnationsphase (Früh- und Spätsommer) sowie eine Probe zur Herbstvollzirkulation in die Untersuchung einbezogen. Zur lokalen Differenzierung wurden jeweils Proben aus der Vorsperre, dem Unterwasservorbecken der Hauptsperre und der Entnahmestelle verwendet. Für alle Proben wurde die Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$ untersucht, die vorwiegend frei lebende Bakterien umfasst. Für die Proben aus dem Jahr 2013 wurde zusätzlich die Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$ einbezogen, um größere Organismen (eukaryotische Algen, Cyanobakterien) sowie partikelassoziierte Bakterien analysieren zu können.

Die taxonomische Zuordnung der repräsentativen OTUs wurde anhand der Silva reference files (release 128) vorgenommen. Die Erfassung der Diversität der Proben durch die Sequenzierung kann anhand der rarefaction curves sowie verschiedener Diversitätsindices abgeschätzt werden. Beide Methoden zeigen, dass die Diversität der Proben nicht vollständig erfasst werden konnte. Die Coverage der einzelnen Proben lag bis auf Probe H5Apr13 immer über 90%. Der Verlauf der rarefaction curves (Anzahl OTUs gegen Anzahl Sequenzen) nimmt für die meisten Proben noch keinen abflachenden Verlauf an, was zeigt, dass beim Generieren weiterer Sequenzen immer noch neue OTUs hinzukommen. Auch die Diversitätsindices Chao1 [149] und ACE (abundance-based coverage estimator, [150]) schätzen die theoretische Anzahl OTUs in den Proben teilweise noch deutlich höher ein (Tabelle 22, Tabelle 23).

3 Ergebnisse

Tabelle 22: Übersicht über die mit GS FLX Titanium-Technologie sequenzierten Proben des Jahres 2013 (Anzahl Sequenzen, OTUs, coverage und Diversitätsindices)

Probe	Anzahl Sequenzen	coverage (%)	Anzahl OTUs	inv simpson	Chao	ACE
<i>GS FLX Titanium series chemistry</i>						
FApr13	1691	95	163	21	334	390
FMay13	2066	92	296	25	683	1204
FJun13	2317	97	166	13	303	350
FOct13	2037	94	258	24	475	631
HApr13	1685	94	174	16	429	589
HMay13	1853	97	118	10	209	238
HJun13	787	95	85	8	139	144
HOct13	2333	95	212	12	408	503
EApr13	2526	97	170	14	266	399
EMay13	1382	96	112	9	198	281
EJun13	1674	97	122	14	174	175
EOct13	1915	96	141	6	248	335
F5Apr13	1718	93	242	25	421	622
F5May13	2218	93	285	22	584	920
F5Jun13	1770	93	255	32	480	628
F5Oct13	1906	91	316	27	740	1016
H5Apr13	447	83	125	27	258	492
H5May13	1670	92	241	21	542	815
H5Jun13	2595	94	277	23	737	989
H5Oct13	1986	91	311	22	595	953
E5Apr13	1505	92	202	15	453	734
E5May13	1477	94	185	18	332	438
E5Jun13	1465	95	154	8	276	415
E5Oct13	1846	92	261	24	460	808

3 Ergebnisse

Tabelle 23: Übersicht über die mit GS FLX++ Titanium-Technologie sequenzierten Proben des Jahres 2012² und 2014 (Anzahl Sequenzen, OTUs, coverage und Diversitätsindices)

Probe	Anzahl Sequenzen	coverage (%)	Anzahl OTUs	inv simpson	Chao	ACE
<i>GS FLX++ Titanium series chemistry</i>						
FMar12	7742	97	449	16	1167	1879
HMar12	8510	97	482	15	1065	1713
EMar12	7776	98	326	19	652	795
FMai12	25802	99	619	10	1366	2227
HMai12	5307	95	422	12	1077	1742
EMai12	10615	99	271	10	706	871
FJul12	8357	96	478	15	1318	2381
HJul12	11629	97	542	12	1365	2238
EJul12	8681	96	495	7	1471	2759
FNov12	10120	97	470	21	1207	2475
HNov12	13525	97	593	18	1822	2795
ENov12	6909	96	430	16	1060	1906
FMar14	5783	96	366	14	1094	1326
HMar14	2412	96	199	17	342	418
EMar14	6135	96	394	16	1215	1813
FMai14	8634	98	351	13	1091	1640
HMai14	4010	96	281	10	750	1234
EMai14	9646	98	412	16	990	1550
EMMai14	6339	98	288	18	483	660
FJul14	9520	97	435	10	1072	1400
HJul14	9630	98	389	13	795	1256
EJul14	10388	99	240	6	686	1004
EMJul14	8928	98	290	7	574	1014
FSep14	9568	96	651	25	1337	1997
HSep14	10578	96	649	19	1485	2667
ESep14	8654	98	386	11	730	1041
EMSep14	7003	97	387	20	848	1221
FNov14	10043	97	524	22	1147	1561
HNov14	10649	97	549	21	1111	1605
ENov14	12450	97	537	15	1554	2394

Von wesentlicher Bedeutung vor allem für die quantitative Interpretierbarkeit der Ergebnisse ist die Erfassung der unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen durch die verwendeten Primer (Tabelle 24).

² Die isolierte DNA aus Wasserproben des Jahres 2012 stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung

3 Ergebnisse

Tabelle 24: Erfassung phylogenetischer Gruppen durch die für die Pyrosequenzierung verwendeten Primer (rdp probe match tool ((Wang, et al., 2007)), am 30.01.2015)

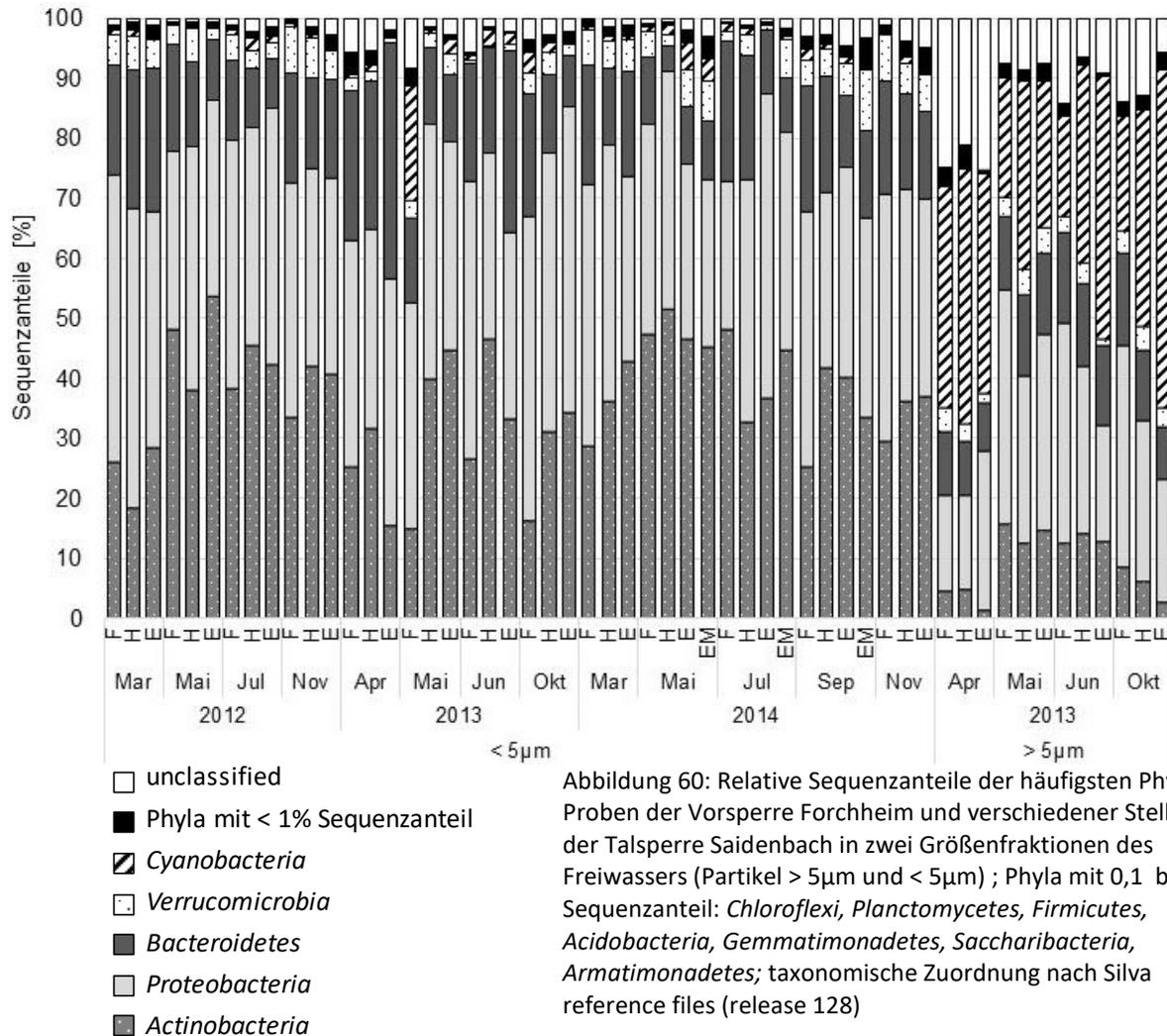
PHYLOGENETISCHE EINHEIT:	REVERSE PRIMER E1115			FORWARD PRIMER U529	
	Sequenzen in rdp	Übereinstimmende Sequenzen	Anteil erkannter Sequenzen (%)	Übereinstimmende Sequenzen	Anteil erkannter Sequenzen (%)
BACTERIA	2879170	1472990	51,2	2313255	80,3
ACIDOBACTERIA	71755	25082	35,0	54748	76,3
ACTINOBACTERIA	319456	236145	73,9	283825	88,8
ARMATIMONADETES	3021	1621	53,7	2388	79,0
BACTEROIDETES	367909	62880	17,1	288967	78,5
<i>Flavobacteriia</i>	76061	30359	39,9	66426	87,3
<i>Sphingobacteriia</i>	37864	21330	56,3	30002	79,2
CHLAMYDIAE	1126	983	87,3	12	1,1
CHLOROFLEXI	39509	9346	23,7	33225	84,1
CYANOBACTERIA/CHLOROPLAST	66092	37317	56,5	54548	82,5
CLASS CHLOROPLAST	18880	10725	56,8	13960	73,9
CLASS CYANBOBACTERIA	45866	25584	55,8	40013	87,2
<i>Family II</i>	11674	6501	55,7	9961	85,3
<i>GpIIa</i>	11631	6473	55,7	9923	85,3
<i>Family IV</i>	1665	889	53,4	1443	86,7
FIRMICUTES	789110	516218	65,4	656161	83,2
PROTEOBACTERIA	944978	478348	50,6	750706	79,4
<i>Alphaproteobacteria</i>	215572	121532	56,4	174812	81,1
<i>Betaproteobacteria</i>	199596	117511	58,9	162684	81,5
<i>Gammaproteobacteria</i>	415673	179038	43,1	329262	79,2
VERRUCOMICROBIA	26132	13329	51,0	20081	76,8

Die Erfassung von Vertretern der phylogenetischen Gruppen liegt beim forward primer für die meisten phylogenetischen Gruppen auf ähnlichem Niveau zwischen 75 und 85%. Durch den reverse primer werden mit 50-55% weniger Vertreter in den meisten Gruppen erfasst, auch hier ist dieser Anteil aber für die meisten Phyla ähnlich. Ausnahmen bilden die *Bacteroidetes*, welche vom reverse primer nur zu 17% erfasst werden, wodurch diese Gruppe im Datensatz je nach den auftretenden Arten unterrepräsentiert sein könnte. Innerhalb der *Bacteroidetes* werden zudem Vertreter der *Flavobacteriia* und *Sphingobacteriia* nicht in gleichem Maße erfasst, sodass die Zusammensetzung des Phylums verzerrt abgebildet werden kann. Ebenso werden Vertreter der *Acidobacteria* und *Chloroflexi* mit 35% bzw 23% in geringerem Maße erfasst als die der meisten anderen Phyla. Für die *Actinobacteria* liegt der Anteil erfasster Vertreter mit 74% höher, sodass diese Gruppe im Datensatz möglicherweise überrepräsentiert wird. Die Erfassung von *Chlamydiae* durch den forward primer ist mit 1% sehr gering, bereits bei einer zugelassenen Basenfehlpaarung steigt der Anteil erfasster Vertreter dieses Phylums jedoch auf 67%.

3 Ergebnisse

3.6.2 Überblick auf Phylumebene

Abbildung 60 zeigt die relativen Sequenzanteile der häufigsten Phyla in ausgewählten Proben der Vorsperre Forchheim und der Talsperre Saidenbach von 2012 bis 2013.



In der Größenfraktion < 5 µm entfallen die höchsten Sequenzanteile auf die *Actinobacteria*, *Proteobacteria* und *Bacteroidetes*. Die Anteile dieser drei Hauptgruppen variieren zwischen den Untersuchungsstellen und im Jahresverlauf deutlich zwischen 15 und 53 % (*Actinobacteria*), 25 und 51 % (*Proteobacteria*) bzw. 4 und 39 % (*Bacteroidetes*). Die mittleren Sequenzanteile dieser Phyla unterscheiden sich kaum zwischen den Untersuchungsstellen in der Talsperre. Auch saisonal bestanden hinsichtlich der mittleren Sequenzanteile der drei Hauptgruppen kaum Unterschiede zwischen Proben aus dem Frühjahr (März bis Mai), Sommer (Juni, Juli), Herbst (September, Oktober) sowie November. Die *Actinobacteria* erreichen in den Sommermonaten mit 13% etwas höhere Sequenzanteile als im Frühjahr und vor allem in den Proben aus dem Herbst, wo sie im Mittel nur 6% erreichen. In der Größenfraktion > 5 µm sind erwartungsgemäß

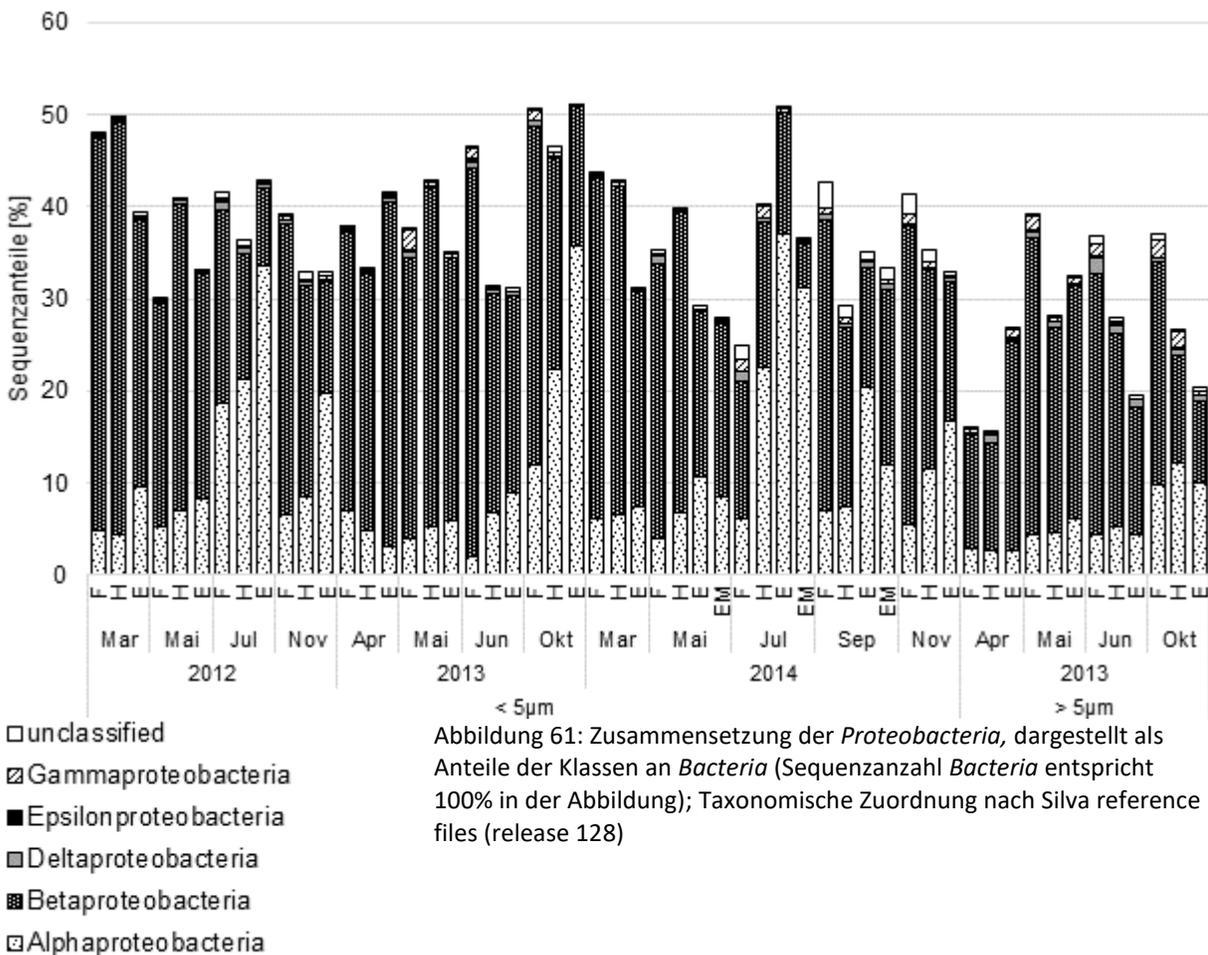
3 Ergebnisse

die Anteile des Phylums *Cyanobacteria/Chloroplast* mit 17 bis 56 % deutlich höher, aber auch der Anteil nicht klassifizierbarer Sequenzen (6 bis 26 %). Die mittleren Anteile des Phylums *Cyanobacteria/Chloroplast* steigen zwischen den Probenahmestellen in Fließrichtung von 23 % (F) über 36 % (H) bis hin zu 40 % (E) an, wozu vor allem die ungewöhnlich hohen Werte im Juni (E 44 %) und Oktober (E 56 %) in der Hauptsperre, insbesondere an der Entnahmestelle, beitragen. Für diese Größenfraktion unterscheiden sich die mittleren Anteile der *Bacteroidetes* und *Actinobacteria* zwischen den Untersuchungsstellen nicht, wogegen die *Proteobacteria* in der Vorsperre mit 32 % gegenüber 25 % in der Hauptsperre abundanter sind. Hohe Anteile partikelassoziiert lebender Bakterien, wie sie z.B. für die *Betaproteobacteria* bekannt sind, können dabei eine Rolle spielen. (vgl. Kap... 1.2.3.2.).

3.6.3 Proteobacteria

3.6.3.1 Klassen der Proteobacteria

Im Phylum *Proteobacteria* dominieren *Beta*- und *Alphaproteobacteria* (Abbildung 61).



Die mittleren Anteile der *Alphaproteobacteria* an den nicht-assoziiert lebenden *Bacteria* betragen 12 % (2 - 37 %), die der *Betaproteobacteria* erreichen 25 % (5 – 45 %). In Fließrichtung steigen die mittleren

3 Ergebnisse

Anteile der *Alphaproteobacteria* von 7 % in der Vorsperre über 10 % an der Stelle H bis zu 17 % an der Entnahmestelle an. Für die *Betaproteobacteria* gilt der umgekehrte Trend, sie erreichen mit 31 % in der Vorsperre die höchsten mittleren Sequenzanteile, an den Stellen H und E betragen sie nur 27 % bzw. 20 %. Saisonal weisen die Abundanzen der beiden Klassen ebenfalls deutlich unterschiedliche Trends auf: In den Frühjahrsmonaten März bis Mai sind die mittleren Sequenzanteile der *Alphaproteobacteria* mit 6 % deutlich am niedrigsten, im Sommer (Juni, Juli) und Herbst (September, Oktober) steigen ihre Anteile auf 17 bzw. 18 % und gehen im November wieder auf 11 % zurück. Die *Betaproteobacteria* erreichen im Gegensatz dazu im Frühjahr ihre höchsten Sequenzanteile an den frei lebenden *Bacteria* von 31 %, die danach auf 19 bis 23 % zurückgehen.

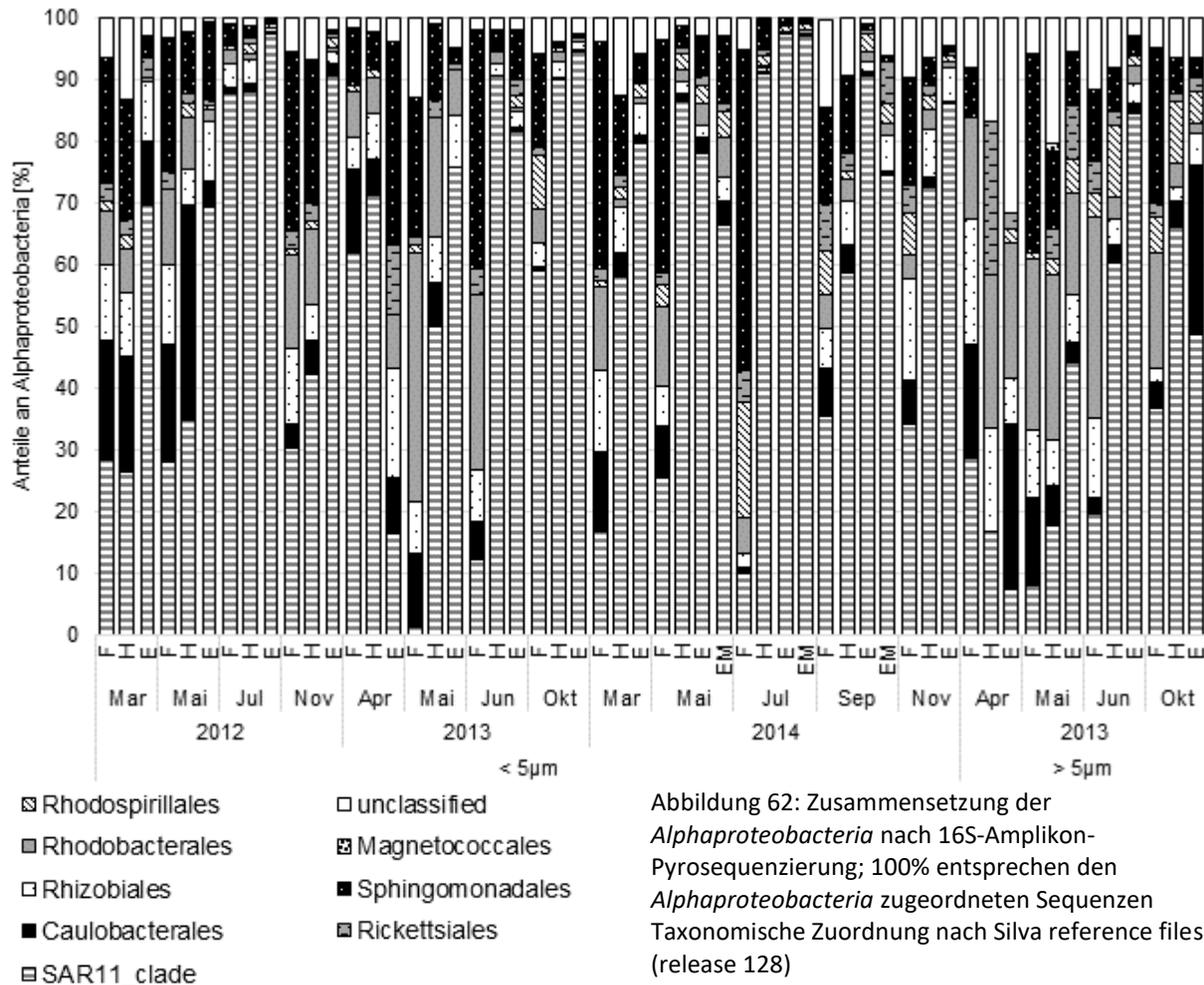
In der Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$, in der Cyanobakterien- und Chloroplasten-Sequenzen hohe Anteile einnehmen, liegen die Sequenzanteile der *Alphaproteobacteria* nur noch bei 6 %, während die der *Betaproteobacteria* noch 18 % erreichen. Die häufigsten Vertreter der *Alphaproteobacteria* sind gekennzeichnet durch eine geringe Zellgröße und vorwiegend nicht-assoziierte Lebensweise während unter den *Betaproteobacteria* auch verschiedene partikel-assoziiert lebenden Gattungen bekannt sind [15].

Die mittleren Sequenzanteile der *Gamma*-, *Delta*- und *Epsilonproteobacteria* liegen in beiden Größenfraktionen unter 1 %. Die *Gammaproteobacteria* erreichen in der Vorsperre Forchheim ihre höchsten Sequenzanteile, z.B. im Mai 2013 mit 2 % ($< 5\mu\text{m}$) bzw. 1,5 % ($> 5\mu\text{m}$). Diese Sequenzen wurden zum Großteil den *Xanthomonadales* zugeordnet, ca. ein Fünftel der Sequenzen wurden als *Enterobacteriaceae* (u.a. *Escherichia-Shigella*) identifiziert. In vielen Proben konnten die den *Gammaproebacteria* zugehörigen Sequenzen aber nicht näher taxonomisch identifiziert werden.

3.6.3.2 *Alphaproteobacteria*

Bei den *Alphaproteobacteria* dominiert in vielen Proben die sog. SAR11-clade (von 1- bis 98%, Mittelwert 61 %) darüber hinaus treten vor allem die Ordnungen *Sphingomodales*, *Rhizobiales*, *Caulobacterales* und *Rhodobacterales* in höheren Abundanzen auf (Abbildung 62). Die relativen Anteile aller Ordnungen der *Alphaproteobacteria* sind starken lokalen und saisonalen Schwankungen unterworfen, selbst die dominante SAR 11-clade erreicht in einigen Proben nur unter 10 % Sequenzanteile.

3 Ergebnisse



Die Zusammensetzung der nicht-assoziierten *Alphaproteobacteria* unterscheidet sich deutlich zwischen der Vorsperre Forchheim und den beiden Probenahmestellen in der Hauptsperre. In der Vorsperre fallen die Anteile der SAR11-clade mit 33 % deutlich geringer aus als in der Hauptsperre, wo sie in Fließrichtung weiter ansteigen (H: 66 %, E: 79 %). Vertreter der Ordnungen der *Rhodobacterales* (*Rhodobacter* und nicht weiter klassifizierte *Rhodobacteraceae*), *Rhizobiales* (alpha I-cluster), *Sphingomonadales* (v.a. *Sphingopyxis*) und die *Rhodospirillales* (*Roseomonas* und nicht weiter klassifizierte *Acetobacteraceae*) nehmen in der Vorsperre höhere Sequenzanteile ein, die in Fließrichtung zurückgehen. Auch saisonal unterscheidet sich die Zusammensetzung der frei lebenden *Alphaproteobacteria* deutlich. Die SAR11-clade erreicht im Sommer (Juni, Juli) und Herbst (September, Oktober) die höchsten Sequenzanteile (73 bzw. 71 %). Im Frühjahr (März bis Mai) fallen die Sequenzanteile der *Rhodobacterales* und der *Caulobacterales* (*Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Phenylobacterium* und nicht weiter klassifizierte *Caulobacteraceae*) mit 9 bzw. 10 % höher aus als im übrigen Jahr (3 - 6 % bzw. 1 - 3 %). Die Zusammensetzung der partikel-assoziierten *Alphaproteobacteria* zeigt im Mittel niedrigere Sequenzanteile für die SAR11-clade, während

3 Ergebnisse

die Sequenzanteile aller anderen Ordnungen höher ausfallen als unter den frei lebenden *Alphaproteobacteria*.

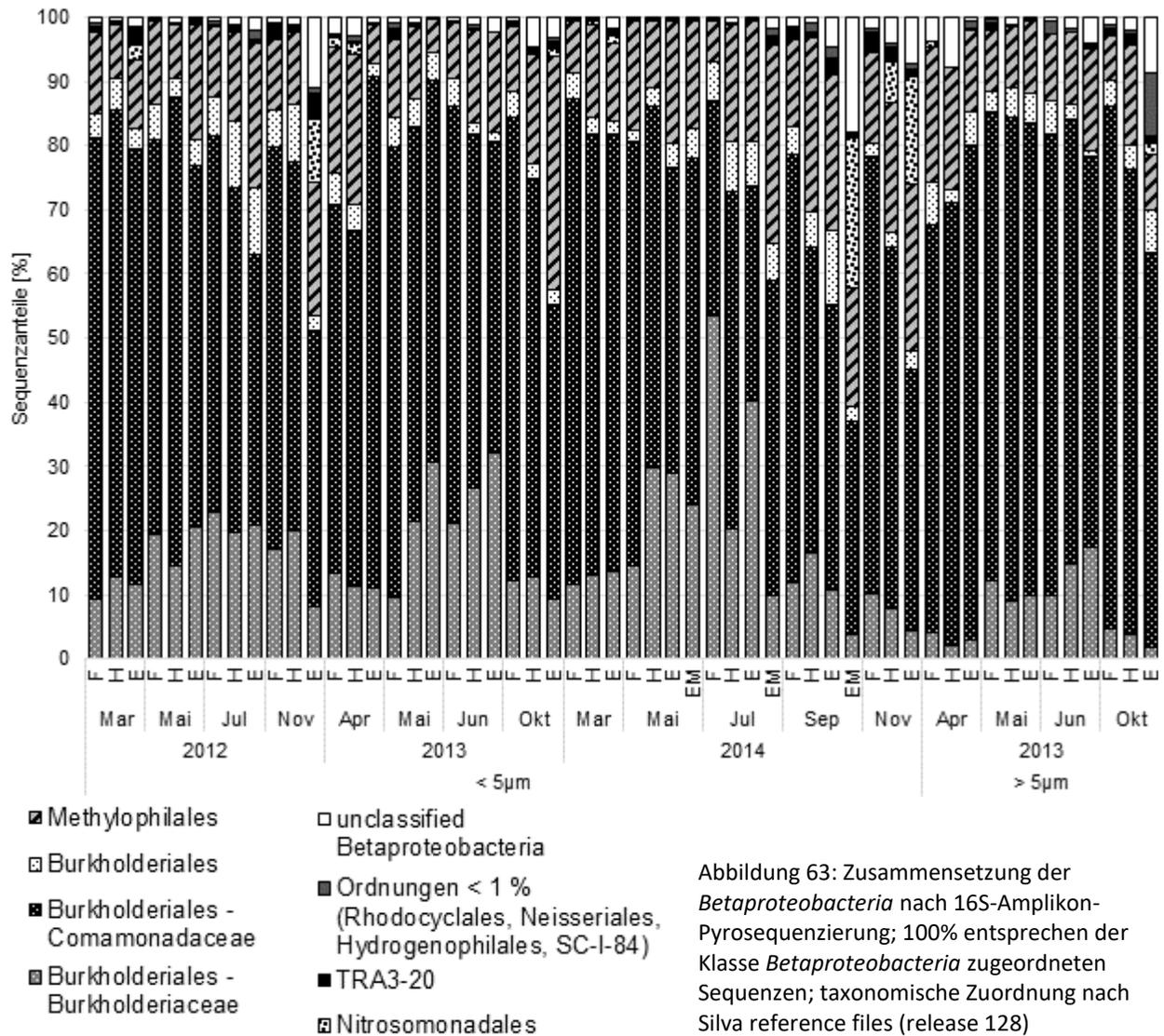
In der Vorsperre sowie unter den partikel-assoziierten *Alphaproteobacteria* ist die Diversität der Klasse am höchsten, während vor allem in den Sommer- und Herbstmonaten an der Entnahmestelle die SAR11-clade die frei lebenden *Alphaproteobacteria* deutlich dominiert.

3.6.3.3 Betaproteobacteria

Unter den *Betaproteobacteria* dominieren die Vertreter der *Comamonadaceae* (*Burkholderiales*), auf die mittlere Sequenzanteile von 58 % (< 5 µm) bzw. 71 % (> 5 µm) der Klasse entfallen (Abbildung 63). Etwa die Hälfte (< 5 µm) bzw. ein Drittel (> 5 µm) dieser Sequenzen wurden der Gattung *Limnohabitans* zugeordnet, geringere Sequenzanteile gehören zu den Gattungen *Polaromonas* und *Acidovorax*. In der Größenfraktion > 5 µm konnte die Hälfte der Sequenzen der *Comamonadaceae* nicht weiter identifiziert werden, in der Fraktion < 5 µm traf dies nur auf etwa ein Drittel der Sequenzen zu. Bei den *Burkholderiaceae* wurden im Unterschied zu den *Comamonadaceae* fast alle Sequenzen bis auf Gattungsebene zugeordnet. Die überwiegende Mehrheit davon entfällt auf die Gattung *Polynucleobacter*, die Sequenzanteile von 17 % der *Betaproteobacteria* < 5 µm, aber nur 7 % in der Größenfraktion > 5 µm einnimmt. Die *Methylophilales* sind die quantitativ bedeutendste Ordnung nach den *Burkholderiales* mit Sequenzanteilen von 16 % (< 5 µm) bzw. 13 % (> 5 µm) der *Betaproteobacteria*. Alle Sequenzen dieser Ordnung gehören zu den *Methylophilaceae* und teilen sich fast vollständig zwischen den Gattungen *Candidatus Methylopumilus* und *Methylotenera* auf. In der Größenfraktion < 5 µm überwiegen die Anteile von *C. Methylopumilus* deutlich, in der Fraktion > 5 µm entfallen etwas höhere Sequenzanteile auf die Gattung *Methylotenera*. Hinsichtlich der Probenahmestellen verhalten sich die Gattungen in der Größenfraktion < 5 µm gegensätzlich, während die Sequenzanteile von *C. Methylopumilus* in Fließrichtung ansteigen (F: 6 %, H: 11 %, E: 17 %), gehen die von *Methylotenera* zurück (F: 5 %, H: 4 %, E: 1 %). Saisonal ist ein Anstieg der Sequenzanteile von *C. Methylopumilus* von 8 % im Frühjahr auf 15 % ab September zu beobachten. Beide Trends treten in der Größenfraktion > 5 µm nicht auf. Die Gattung *Nitrospira* (*Nitrosomonadales*) spielt in den meisten Proben eine untergeordnete Rolle, im September und November 2014 erreicht sie aber in den Proben der Entnahmestelle 23 % (E Metalimnion Sep 2014) und 16 % (E 2m Nov 2014) der Sequenzen der *Betaproteobacteria* < 5 µm.

Die meisten innerhalb der *Betaproteobacteria* nicht identifizierbaren Sequenzen traten in den Proben der Entnahmestelle aus 2 m Tiefe von November 2012 und dem Metalimnion der Entnahmestelle von September 2014 auf.

3 Ergebnisse

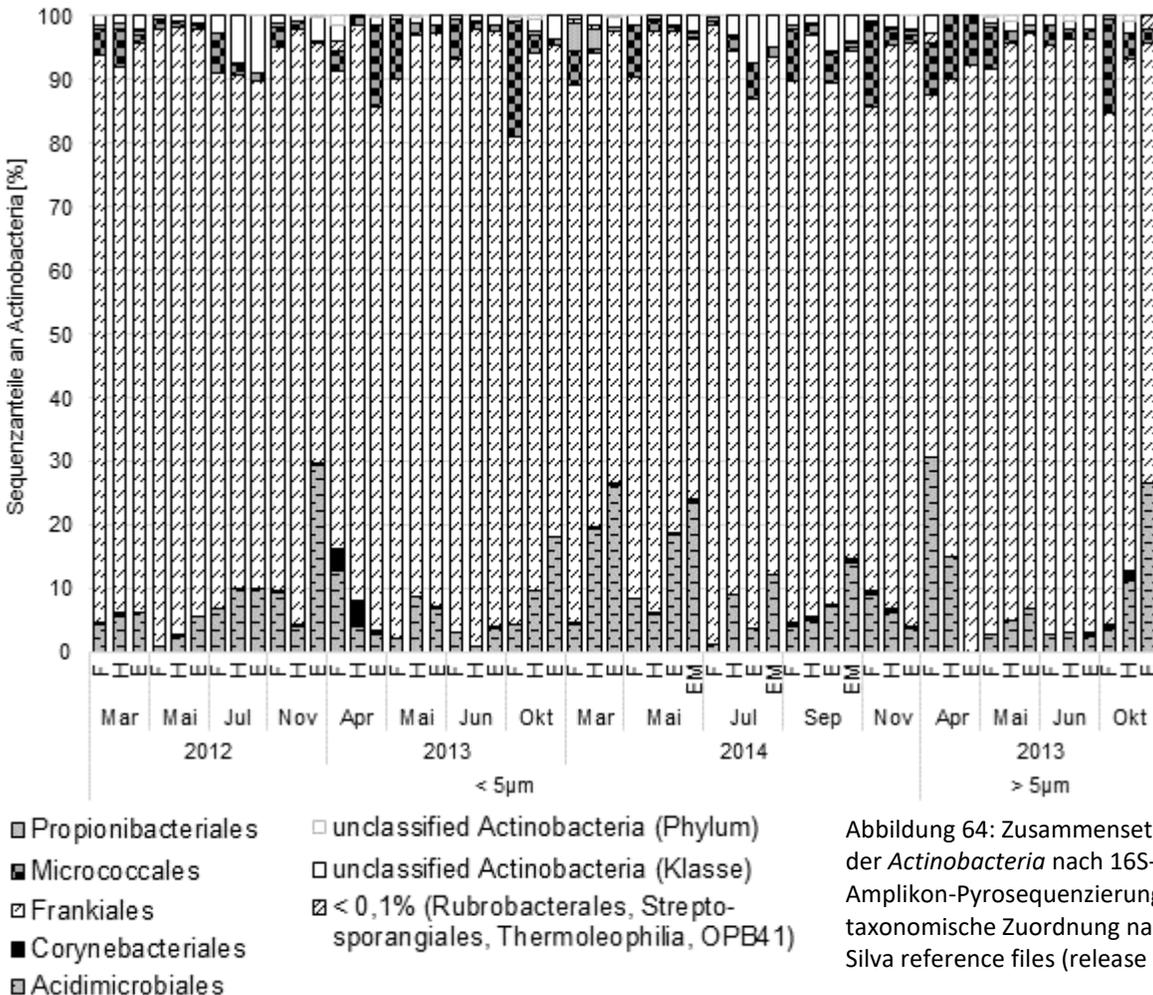


3.6.4 Actinobacteria

Mit Sequenzanteilen von 85 % (< 5µm) bzw. 83 % dominieren die Vertreter der Ordnung *Frankiales* deutlich beide Größenfraktionen der *Actinobacteria* (Abbildung 64). 80 bis 90 % dieser Sequenzen konnten der *hgcl-clade* (*Sporichthyaceae*) zugeordnet werden. Die Vertreter dieser Gruppe weisen ohne wesentliche lokale oder saisonale Unterschiede gleichmäßig hohe Anteile an den *Actinobacteria* in fast allen untersuchten Proben auf. Nur vereinzelt erreichen auch Vertreter anderer Ordnungen höhere Sequenzanteile. Dazu zählen u.a. die *Acidimicrobiales*, deren Vertreter zum Großteil der CL500-29_marine_group zugeordnet wurden. In der Größenfraktion < 5 µm steigen deren Sequenzanteile an den *Actinobacteria* leicht in Fließrichtung an (F: 4 %, H: 6 %, E: 10 %). Darüber hinaus spielen vor allem in der Vorsperre Forchheim noch Vertreter der *Micrococcales* eine Rolle, die dort Sequenzanteile der

3 Ergebnisse

Actinobacteria von 8 bis 9 % erreichen, im Unterschied zu 2 bis 3 % in der Hauptsperre. Die häufigste Gattung der *Micrococcales* ist *Candidatus Rhodoluna* (*Microbacteriaceae*).



3.6.5 Bacteroidetes

Das Phylum *Bacteroidetes* setzt sich vor allem aus *Sphingobacteriales*, *Flavobacteriales* und *Cytophagales* zusammen, wobei die *Sphingobacteriales* mit Anteilen um 60 % innerhalb des Phylums dominieren (Abbildung 65). In der Größenfraktion < 5 µm liegen die Sequenzanteile der *Sphingobacteriales* mit 47 % in der Vorsperre deutlich unter denen in der Hauptsperre (63 %). Die Anteile der *Flavobacteriales* und *Cytophagales* nehmen dagegen in Fließrichtung ab. Sie liegen in der Vorsperre bei 28 % (*Cytophagales*) bzw. 17 % (*Flavobacteriales*), an der Entnahmestelle dagegen bei 16 bzw. 12 %. Unter den *Flavobacteriales* konnte die Mehrheit der Sequenzen der Gattung *Fluviicola* (*Cryomorpaceae*) zugeordnet werden, der Anteil nichtklassifizierbarer Sequenzen innerhalb dieser Ordnung war sehr gering. Bei den *Cytophagales* konnte ebenfalls ein großer Teil der Sequenzen auf Gattungsebene zugeordnet werden, wobei die überwiegende Mehrheit zur Gattung *Pseudarcicella* (*Cytophagaceae*) zählt.

3 Ergebnisse

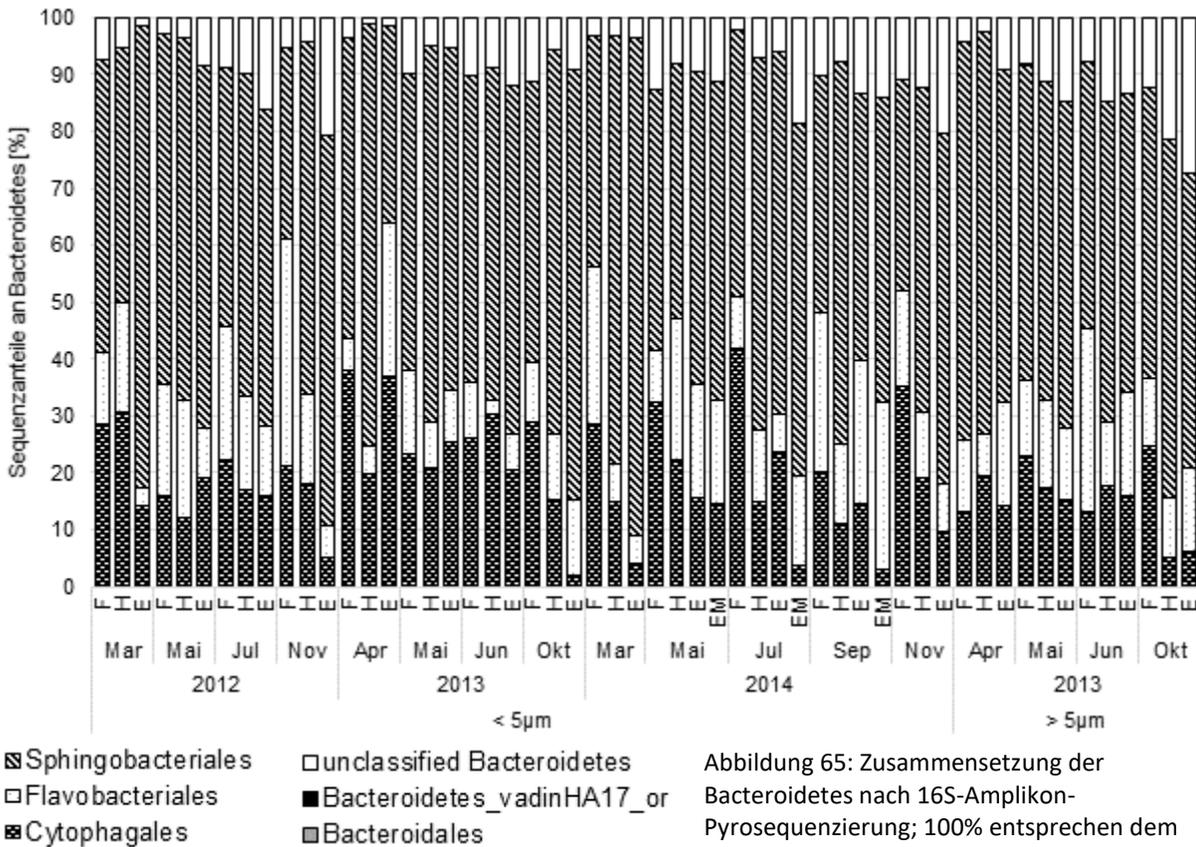
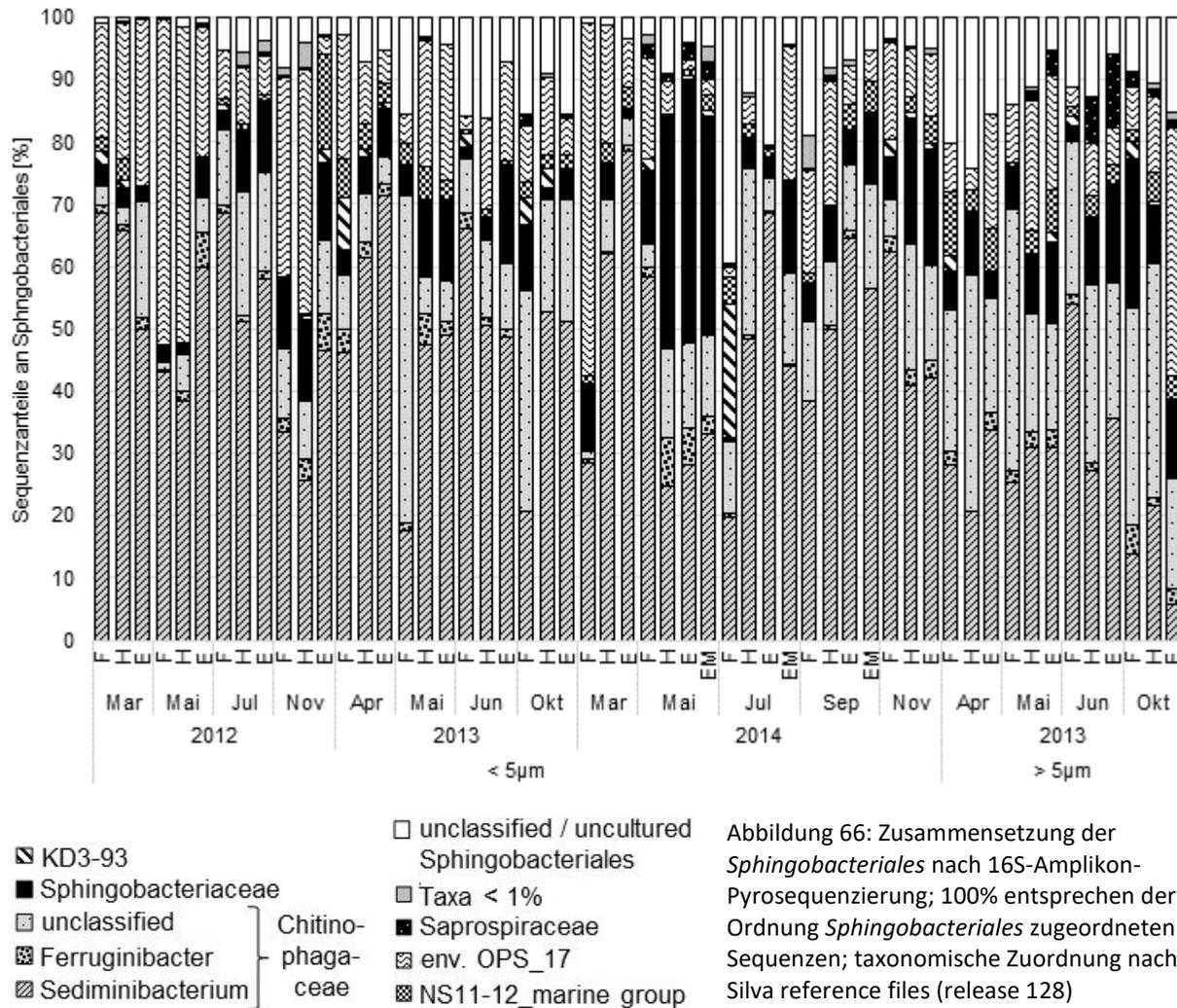


Abbildung 65: Zusammensetzung der Bacteroidetes nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; 100% entsprechen dem Phylum Bacteroidetes zugeordneten Sequenzen; Taxonomische Zuordnung nach Silva reference files (release 128)

Die Zusammensetzung der *Spingobacteria* variiert stark im Jahresverlauf. Die Hauptanteile der Ordnung entfallen auf die *Chitinophagaceae* und darin auf die Gattung *Sediminibacterium* und nicht weiter klassifizierbare Sequenzen. In der Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$ ist der Anteil der nicht klassifizierbaren Sequenzen der Familie mit 10 - 19 % etwa doppelt so hoch wie in der Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$, wobei der Anteil von *Sediminibacterium* höher ausfällt. Die *Spingobacteriaceae* haben vor allem in den Proben der Hauptsperre von Mai 2013 ($< 5\mu\text{m}$) hohe Anteile, in diesen Proben konnten die Sequenzen nicht weiter klassifiziert werden, was auch auf die Mehrheit der Sequenzen dieser Familie in anderen Proben zutrifft. Ein geringerer Teil der Sequenzen konnte der Gattung *Pedobacter* zugeordnet werden. Höhere Anteile erreicht in mehreren Proben die Familie env. OPS_17.

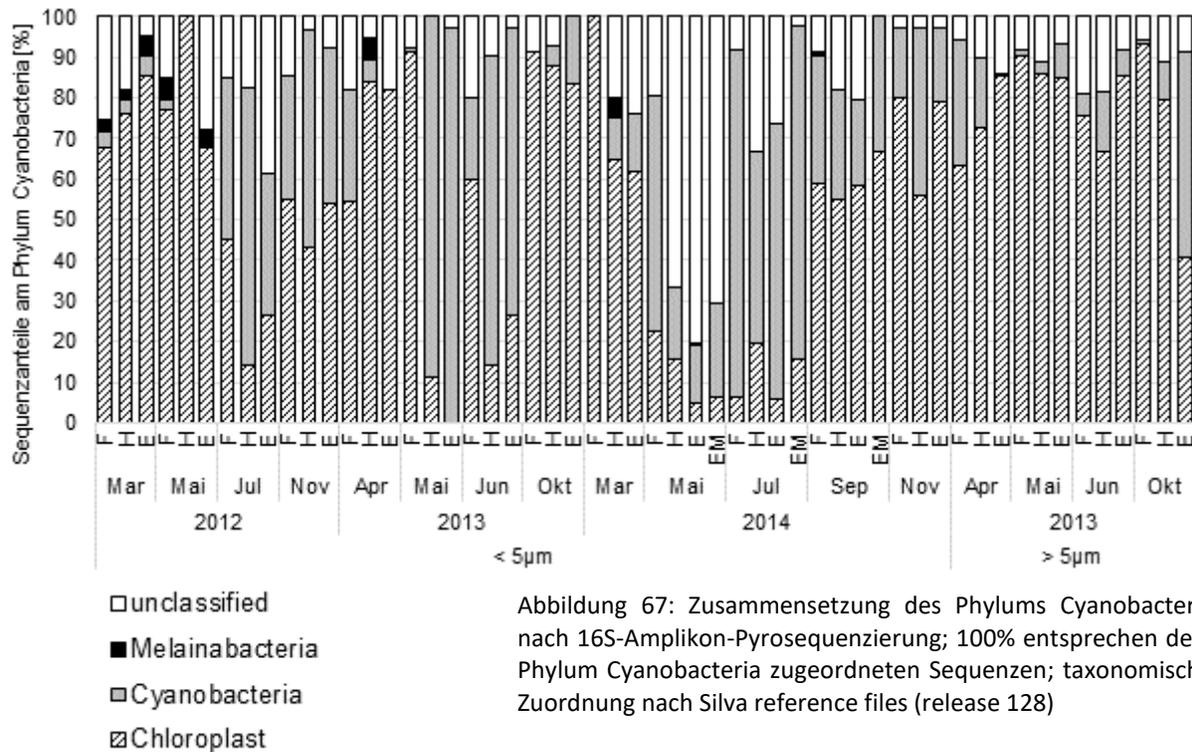
3 Ergebnisse



3.6.6 Cyanobacteria/Chloroplast

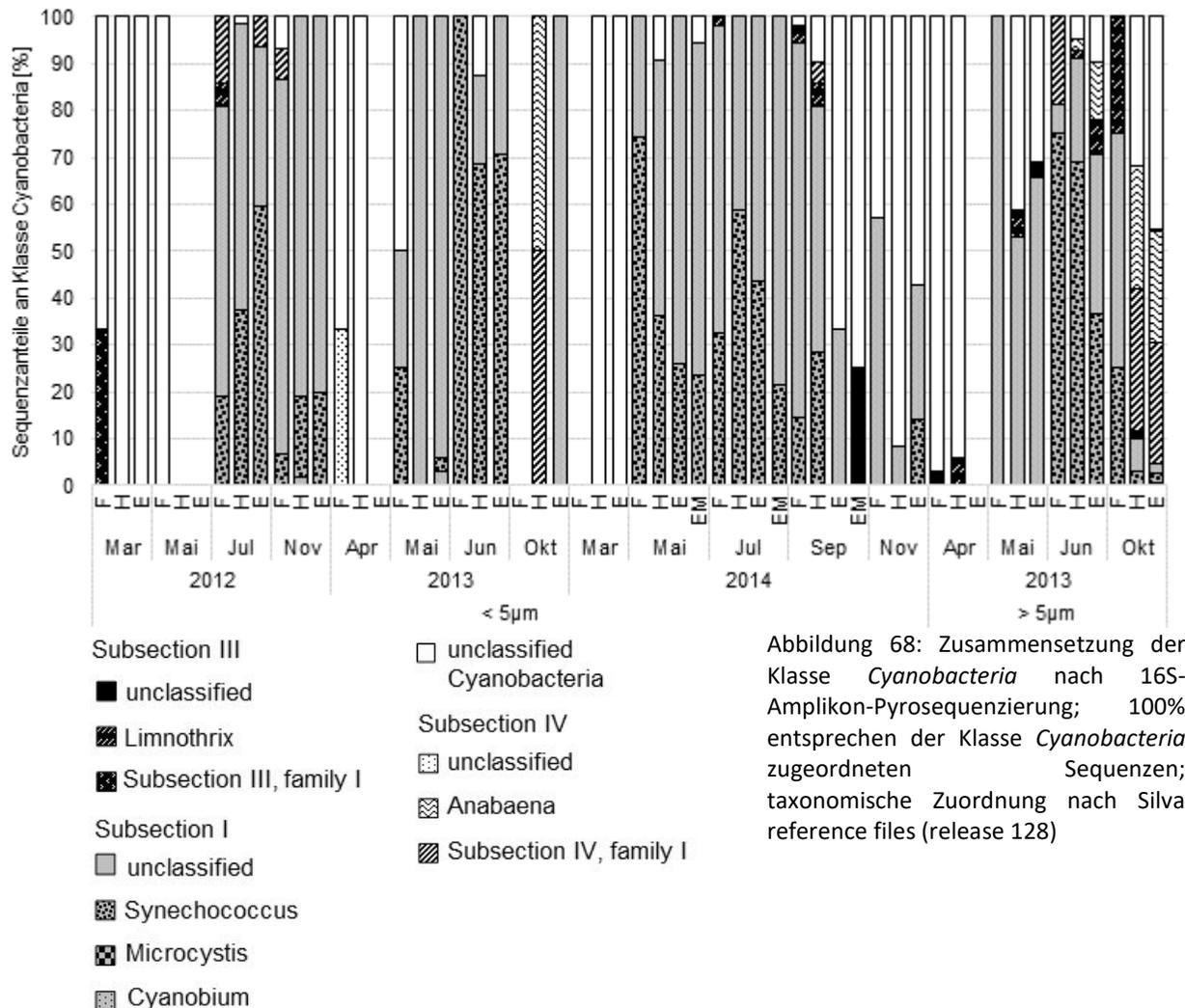
Im Phylum *Cyanobacteria* nehmen Sequenzen von Chloroplasten eukaryotischer Algen 52 % (< 5 µm) bzw. 77 % (> 5 µm) der Sequenzanteile ein (Abbildung 67). Zur Klasse *Cyanobacteria* wurden 31 % (< 5 µm) bzw. 12 % (> 5 µm) zugeordnet. 16 % (< 5 µm) bzw. 11 % (> 5 µm) der Sequenzen konnten nur bis auf Phylum-Ebene klassifiziert werden. Sehr geringe Sequenzanteile (< 1%) wurden den *Melainobacteria* [151] zugeordnet. In beiden Größenfraktionen nimmt der Anteil der Klasse *Cyanobacteria* am Phylum in Fließrichtung zu, während die Sequenzanteile der Klasse Chloroplast in der Vorsperre am höchsten sind.

3 Ergebnisse



In der Klasse der Cyanobakterien konnte im Durchschnitt ein Drittel der Sequenzanteile nicht weiter klassifiziert werden, besonders in Proben aus dem Frühjahr (März bis Mai) war dieser Anteil noch höher (44 - 42%) (Abbildung 68). Etwa 50 % der Sequenzanteile entfallen auf die Subsection I und darin hauptsächlich auf die Gattung *Synechococcus* sowie nicht weiter klassifizierbare Sequenzen. Der Anteil der Subsection I erreichte in den Sommermonaten (Juni, Juli) die höchsten Sequenzanteile von 95 % (< 5µm) bzw. 81 % (> 5 µm). Die Sequenzanteile der hier vorwiegend Picoplankter umfassenden Subsection I sind in der Größenfraktion < 5µm mit 55 % etwas höher als in der Fraktion > 5µm (46 %). Im Gegensatz dazu fallen die Sequenzanteile der Subsections III und IV mit vorwiegend fädigen Cyanobakterien in der Größenfraktion > 5µm höher aus. Der Hauptanteil der Sequenzen in der Subsection III wurde als *Limnothrix* identifiziert. In der Subsection IV konnte ca. die Hälfte der Sequenzanteile der Gattung *Anabaena* zugeordnet werden, die andere Hälfte konnte nur bis auf die Ebene der Familie I klassifiziert werden, die u.a. Vertreter der Gattungen *Anabaena*, *Aphanizomenon* und *Nostoc* beinhaltet. In einigen Proben vorwiegend der Größenfraktion < 5µm wurden keine Sequenzen der Klasse *Cyanobacteria* zugeordnet, obwohl mikroskopisch in allen Proben zumindest autotrophes Picoplankton nachgewiesen wurden. Diese teilweise in Kolonien vorliegenden Zellen können jedoch auch in der Größenfraktion >5µm enthalten sein, zudem können unter den nicht klassifizierten Sequenzen des Phylums oder der *Bacteria* zur Klasse *Cyanobacteria* zugehörige Sequenzen sein.

3 Ergebnisse



3.6.7 Verrucomicrobia

In der Zusammensetzung der *Verrucomicrobia* treten deutliche Unterschiede zwischen den Größenfraktionen, Probenahmestellen sowie Jahreszeiten auf (Abbildung 69). Die Klasse OPB35_soil group dominiert mit 43 % der Sequenzanteile die Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$, dabei erreicht sie in der Hauptsperre mit 53 bzw. 47 % deutlich höhere Anteile als in der Vorsperre Forchheim (31 %). In den Sommermonaten sind ihre Sequenzanteile mit 55 % am höchsten im Vergleich zu 43 und 33 % im Frühjahr und Herbst. Der letztere Trend ist ebenfalls für die Größenfraktion $< 5 \mu\text{m}$ zu beobachten, wo auf die OPB35_soil group im Mittel nur 20 % der Sequenzen entfallen. In dieser Größenfraktion haben die Klassen *Opitutae* und *Spartobacteria* mit 29 bzw. 28 % die höchsten Sequenzanteile. Ihre relativen Abundanzen weisen hinsichtlich der Probenahmestellen gegensätzliche Trends auf: Während die Anteile der *Opitutae* in Fließrichtung zurückgehen (F: 39 %, H: 28 %, E: 20 %), steigen die der *Spartobacteria* an (F: 24 %, H: 29 %, E: 20 %).

3 Ergebnisse

E: 31 %). Die *Opitutae* weisen im Jahresverlauf abnehmende Sequenzanteile auf (März – Mai: 31 %, Juni / Juli: 28 %, September / Oktober: 17 %), die *Spartobacteria* haben im Frühjahr (31 %) und im Herbst (45 %) deutlich höhere Anteile als im Sommer (9 %). Beide Klassen haben in der Größenfraktion >5 µm mit 11 (*Opitutae*) bzw. 13 % (*Spartobacteria*) deutlich geringere Anteile, die für die Größenfraktion < 5 µm beschriebenen saisonalen Trend sind schwächer ausgeprägt. Im Unterschied zu den relativen Abundanz in der Fraktion < 5 µm haben beide Klassen in der Größenfraktion > 5 µm in der Vorsperre höhere Anteile als in der Hauptsperre. Die *Verrucomicrobiaceae* nehmen 12 (< 5 µm) bzw. 15 % (> 5 µm) der Sequenzanteile ein, im Frühjahr sowie an der Entnahmestelle sind die Anteile dieser Klasse am höchsten.

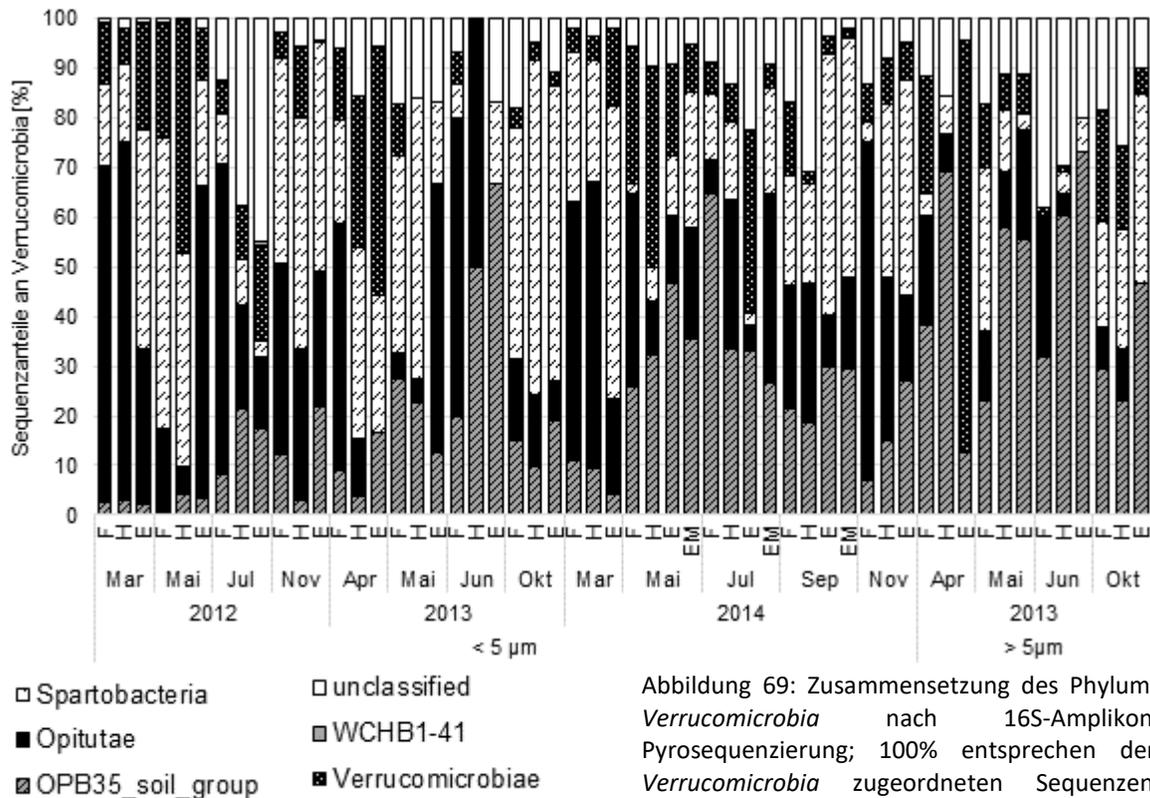


Abbildung 69: Zusammensetzung des Phylums *Verrucomicrobia* nach 16S-Amplikon-Pyrosequenzierung; 100% entsprechen den *Verrucomicrobia* zugeordneten Sequenzen; taxonomische Zuordnung nach Silva reference files (release 128)

3 Ergebnisse

3.6.8 Clusteranalyse und Einfluss von Umweltparametern auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft

Die Ähnlichkeit der Proben untereinander hinsichtlich ihrer biotischen Struktur wurde auf Grundlage der relativen Häufigkeiten der OTUs (3% Sequenzunterschied) mittels hierarchischer Clusteranalyse untersucht (Abbildung 70).

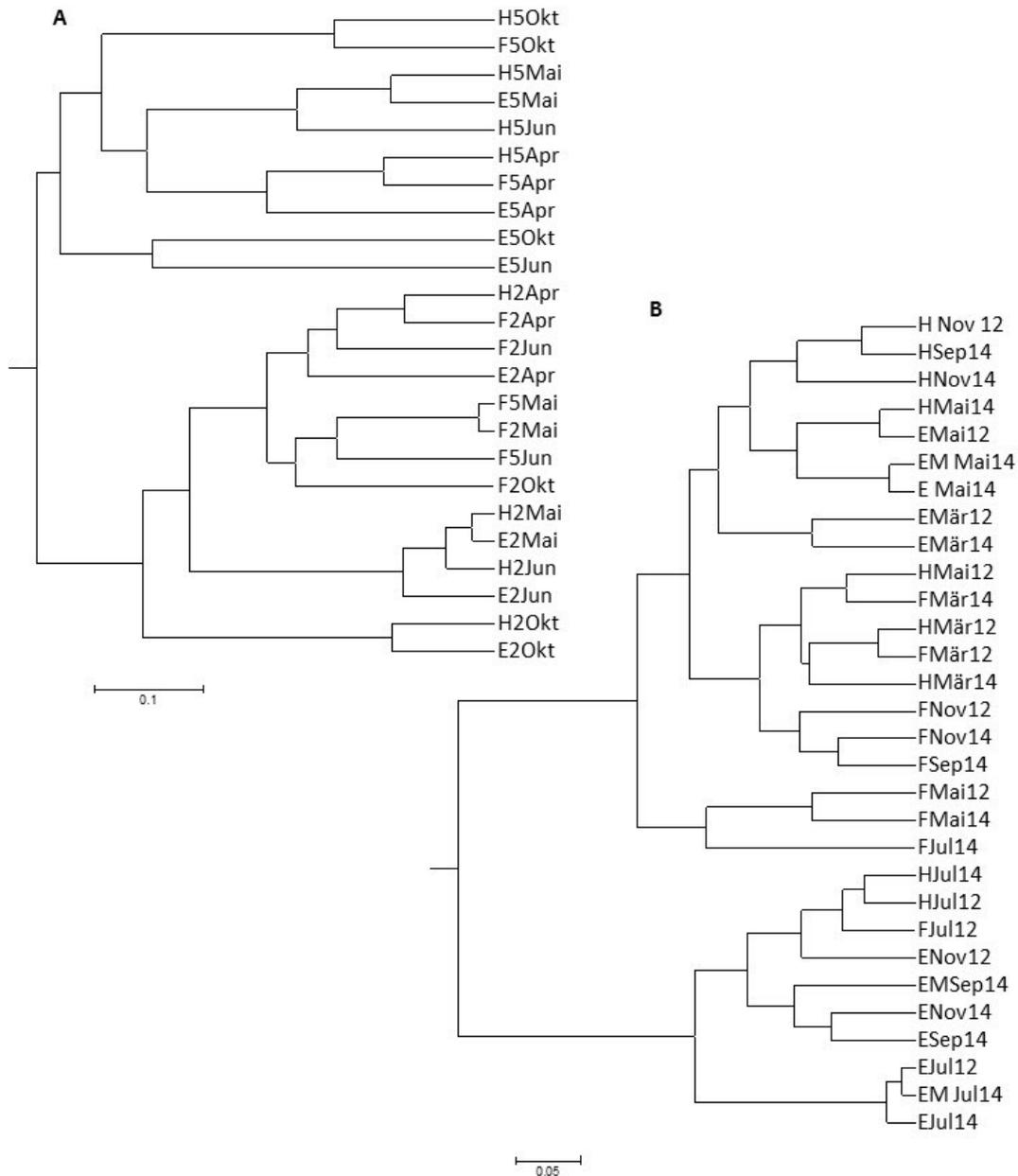


Abbildung 70: Dendrogrammdarstellung der hierarchischen Clusteranalyse für normalisierte Häufigkeiten von OTUs; Proben von 2013 (A) mit Größenfraktionen $>5\mu\text{m}$ (5) und $<5\mu\text{m}$ (2); Proben von 2012 und 2014 (B) nur Größenfraktion $<5\mu\text{m}$

3 Ergebnisse

Die Zusammensetzung der Proben zeigt deutliche jahreszeitliche Zusammenhänge. Auch Proben der gleichen Jahreszeit der Jahre 2012 und 2014 bilden häufig Cluster. Darin zeigen oft Proben aus der Vorsperre Forchheim und dem Unterwasservorbecken der Talsperre (H) mehr Ähnlichkeit zueinander als zu den Proben der Entnahmestelle. Anhand der Proben des Jahres 2013 wird auch die unterschiedliche Zusammensetzung der Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$ und $> 5\mu\text{m}$ deutlich. Nur für die Proben der Stelle F von Mai und Oktober, sowie der Stelle E im Juni bilden beide Größenfraktionen ein Cluster.

Die statistische Untersuchung des Einflusses verschiedener Umweltfaktoren auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft erfolgte anhand der Anteile der OTUs an den Gesamtsequenzen der jeweiligen Probe. Singletons wurden für diese Analyse aus dem Datensatz entfernt, um den Einfluss seltener Phyla und durch Sequenzierfehler gebildeter OTUs auf das Gesamtergebnis zu reduzieren. Die statistische Analyse wurde getrennt für die Untersuchungsjahre durchgeführt, da die Proben von 2013 und die von 2012 und 2014 in separaten Ansätzen sequenziert wurden. Auf eine Auswertung getrennt nach Untersuchungsstellen wurde aufgrund der jeweils zu geringen Probenanzahl verzichtet. Tabelle 25 zeigt, dass in den verschiedenen Untersuchungs Jahren sowie für die beiden Größenklassen unterschiedliche Umweltparameter relevanten Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft hatten.

3 Ergebnisse

Tabelle 25: Einfluss von Umweltfaktoren auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft auf Grundlage relativer Abundanzen von OTUs mit mindestens 2 Sequenzen

		2012 < 5µm		2013 < 5µm		2013 > 5µm		2014 < 5µm	
		n=12		n=12		n=12		n=18	
		R ²	Sig.	R ²	Sig.	R ²	Sig.	R ²	Sig.
chemische Parameter	NH ₄ -N								
	o-PO ₄ -P					0,704	*		
	Chlorid								
	SO ₄ -S							0,498	*
	NO ₃ -N					0,821	**	0,704	**
	Acetat					0,536	.	0,643	**
	Mn					0,574	.		
	Fe								
	DIC								
	DOC					0,657	*	0,51	*
	DTC								
physikalische Parameter	Sauerstoff (mg/l)	0,8	***			0,83	**		
	Sauerstoff (%)	0,5	*			0,729	*	0,488	*
	pH	0,6	*	0,5	.	0,625	*	0,473	*
	Leitfähigkeit	0,5	.						
	Wassertemperatur	0,4	.			0,648	*	0,889	**
	Chlorophyll a	0,4	.	0,9	**			0,367	.
	Sichttiefe	0,4	.	0,9	**				
meteorologische Parameter	10-Tages-Mittel Lufttemperatur	0,5	.					0,89	***
	10-Tages-Summe Niederschlag	0,5	.			0,864	**		
	10-Tages-Mittel Globalstrahlung							0,853	***
	5-Tages-Mittel Lufttemperatur							0,88	**
	5-Tages-Summe Niederschlag					0,863	**	0,556	*
	5-Tages-Mittel Globalstrahlung					0,534		0,83	***
	Phytoplankton	Diatomeen ¹							0,35
Grünalgen ¹								0,539	*
Cryptophyta									
Cyanobakterien								0,72	***
Gesamtbiovolumen								0,652	***

¹: als spektrale Gruppe: Diatomeen incl. Chrysophyceen, Haptophyceen, Dinophyceen und Chlorophyta incl. Desmidiaceen

Chemische Parameter, insbesondere die Nitrat- und Orthophosphat-Konzentrationen zeigten Zusammenhänge zur Zusammensetzung der Größenfraktion >5µm im Jahr 2013, nicht hingegen zu der freilebender Bakterien. Ein möglicher Grund dafür ist das Vorkommen von Chloroplasten-Sequenzen

3 Ergebnisse

eukaryotischer Algen in der Fraktion $> 5 \mu\text{m}$, deren Abundanz durch die verfügbaren Nährstoffe beeinflusst wird. Dafür spricht auch der Zusammenhang mit Sauerstoffkonzentration- und -sättigung, die durch photosynthetische Aktivität erhöht werden, der in diesem Jahr ebenfalls nur für die Fraktion $> 5 \mu\text{m}$ besteht. 2012 hingegen zeigte die Sauerstoffkonzentration auch zur Zusammensetzung der freilebenden Bakterien einen deutlichen Zusammenhang. Die Chlorophyll-a-Konzentration und die damit in Zusammenhang stehende Sichttiefe wiesen 2013 nur einen Zusammenhang zur Zusammensetzung der freilebenden Bakterien auf, nicht jedoch zur der Fraktion $> 5 \mu\text{m}$, was aufgrund der enthaltenen Sequenzanteile von Chloroplasten zu erwarten wäre. pH-Wert und Wassertemperatur zeigten in allen Jahren eine Relation mit der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft, mit Ausnahme der Wassertemperatur 2013 nur für die Fraktion $> 5 \mu\text{m}$. Die meteorologischen Gegebenheiten im Vorfeld (10 bzw. 5 Tage) den jeweiligen Probenahmen hatten vor allem im Jahr 2014 deutlichen Einfluss auf die Bakterioplanktonzusammensetzung, dieses Jahr war gekennzeichnet durch einen milden Winter ohne Eisbedeckung der Talsperre sowie ein warmes Frühjahr. Der Einfluss der Globalstrahlung war 2014 in allen Monaten höher als 2013, wurde jedoch für die Monate bis Mai im Jahr 2012 übertroffen. Hinsichtlich der Niederschläge waren die Jahre 2012 und 2014 vergleichbar, die Relation des Parameters zur Bakterioplanktonzusammensetzung hat zumeist auch nur geringe Signifikanz. 2013 hingegen ist diese deutlich höher, was auf die Starkniederschläge Ende Mai/Anfang Juni des Jahres zurückzuführen sein kann. Insgesamt zeigt die Analyse, dass sehr unterschiedliche Parameter Zusammenhänge zur Bakterioplanktonzusammensetzung aufweisen können und anhand der Untersuchung ausgewählter Proben aus drei Jahren keine durchgängigen Trends ablesbar sind.

3.6.9 Einfluss von Umweltparametern auf einzelne Taxa

Für einzelne Taxa wurde mittels Korrelationsanalyse untersucht, welche der erfassten Umweltparameter von Bedeutung für die Abundanz der jeweiligen phylogenetischen Einheit sind (Abbildung 71, Abbildung 72). Darüber hinaus wurden die Korrelationen der untersuchten Taxa miteinander betrachtet, um Gruppen mit ähnlichen oder sehr verschiedenem ökologischen Verhalten zu identifizieren.

3 Ergebnisse

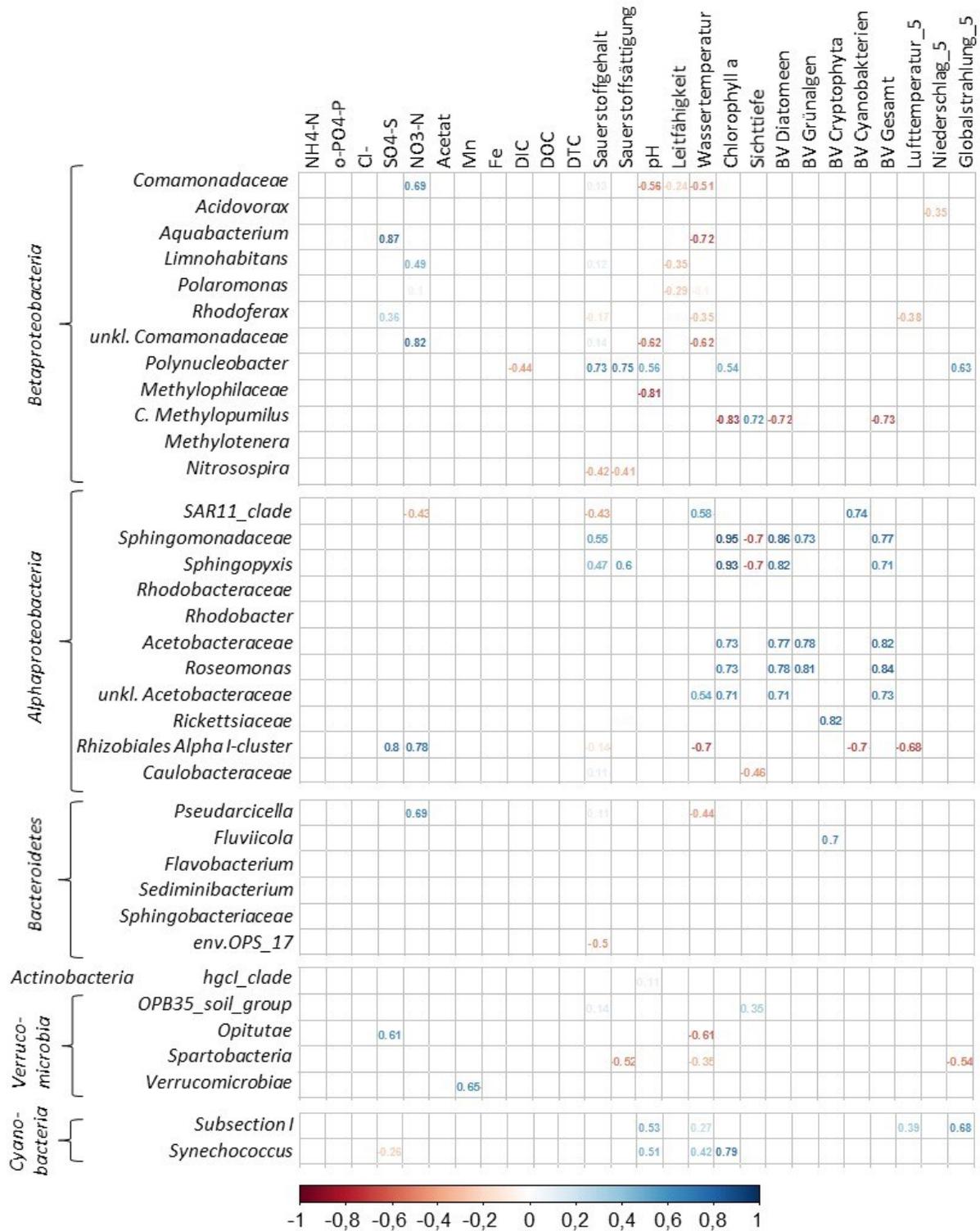


Abbildung 71: Darstellung signifikanter Korrelationen (c Korrelationskoeffizienten nach Pearson) von Umweltparametern mit relativen Häufigkeiten ausgewählter Taxa in der Größenfraktion <5µm, n=42; Daten zu Phytoplanktonbiovolumina nur für Proben von 2014

3 Ergebnisse

Die *Comamonadaceae* zeigen in der Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$ insgesamt eine positive Korrelation mit der Nitratkonzentration ($R^2=0,69$), was vor allem auf die Beiträge der unklassifizierten *Comamonadaceae* ($R^2 = 0,82$) sowie der Gattung *Limnohabitans* ($R^2 = 0,49$) zurückgeht. Die Sequenzanteile der Gattung *Aquabacterium* korrelieren dagegen deutlich positiv mit der Sulfatkonzentration ($R^2 = 0,87$) und darüber hinaus negativ mit der Wassertemperatur ($R^2 = 0,72$). Der letztgenannte Trend besteht auch für die unklassifizierten *Comamonadaceae*, deren Abundanz gleichermaßen negativ mit Wassertemperatur und pH-Wert korreliert ($R^2 = -0,62$). Für die Gattung *Polynucleobacter* ergab die Analyse deutlich positive Zusammenhänge zu Sauerstoffkonzentration und -sättigung ($R^2 = 0,73$ bzw. $0,76$), pH-Wert ($R^2 = 0,68$) und Chlorophyll a-Konzentration ($R^2 = 0,64$) sowie der Globalstrahlung ($R^2 = 0,63$). Für die *Methylophilaceae* bestand ein deutlicher negativer Zusammenhang zum pH-Wert ($R^2 = 0,81$), der jedoch nicht für die beiden häufigsten Gattungen *Candidatus Methylopumilus* und *Methylotenera* nachgewiesen werden konnte. Die Häufigkeit von *C. Methylopumilus* korreliert jedoch deutlich negativ mit der Chlorophyll a – Konzentration ($R^2 = -0,83$), dem Biovolumen der Diatomeen ($R^2 = -0,72$) und dem Gesamtbiovolumen ($R^2=-0,73$).

Für die untersuchten Taxa der *Alphaproteobacteria* erwiesen sich die Biovolumina der verschiedenen Phytoplanktongruppen als wichtigste Parameter. Als einziges Taxon wies dabei die SAR11-clade eine deutliche positive Korrelation zum Cyanobakterien-Biovolumen auf ($R^2 = 0,74$), darüber hinaus auch zur Wassertemperatur. Die Abundanz der *Rickettsiaceae* korrelierte hingegen positiv mit dem Biovolumen der *Cryptophyta* ($R^2 = 0,82$). Für *Sphingopyxis* und *Roseomonas* hingegen zeigte die Analyse positive Korrelationen zur Chlorophyll-a-Konzentration ($R^2 = 0,93$ bzw. $0,73$), zum Diatomeen-Biovolumen ($R^2 = 0,82$ bzw. $0,78$), dem Grünalgen-Biovolumen (nur *Roseomonas* $R^2 = 0,81$) und zum Gesamtbiovolumen ($R^2 = 0,84$ bzw. $0,71$). Beide Gattungen treten deutlich häufiger in der Vorsperre Forchheim auf, in der auch höhere Phytoplankton-Biovolumina erreicht werden als in der Hauptsperre. Die Abundanz des *Rhizobiales_alpha_cluster* korrelierte negativ mit der Wasser- und Lufttemperatur und mit dem Biovolumen an Cyanobakterien, welches selbst einen deutlichen Zusammenhang zu den Wassertemperaturen aufweist. Starke positive Korrelationen der Sequenzanteile des *Rhizobiales_alpha_cluster* bestanden dagegen zu den Sulfat- und Nitratkonzentrationen, die im Frühjahr und Herbst generell niedriger ausfallen als im Sommer.

Unter den Vertretern der *Bacteroidetes* wiesen in der Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$ nur die Abundanzen der Gattungen *Pseudarcicella* und *Fluviicola* stärkere Zusammenhänge zu den Umweltfaktoren auf. Ähnlich wie einige Vertreter der *Comamonadaceae* korreliert die Häufigkeit von *Pseudarcicella* positiv mit der

3 Ergebnisse

Nitratkonzentration ($R^2 = 0,69$). Für die Gattung *Fluviicola* hingegen zeigte die statistische Analyse eine positive Korrelation zum Biovolumen der Cryptophyta ($R^2 = 0,70$).

Die relative Abundanz der hgcl-clade, welche das Phylum *Actinobacteria* dominiert, zeigt keine signifikanten Zusammenhänge zu den hier einbezogenen Umweltparametern, die Abundanz dieser Gruppe weist im Jahresverlauf und zwischen den Untersuchungsstellen im Vergleich zu anderen Gruppen auch nur geringe Schwankungen auf. Auch unter den relevanten Taxa der *Verrucomicrobia* gab es keine Korrelationen mit $R^2 > 0,65$. Für die relative Häufigkeit der *Opitutae* zeigte die Analyse eine positive Korrelation zur Acetatkonzentration ($R^2 = 0,61$) und negative zur Wassertemperatur ($R^2 = -0,61$). Die Abundanz der *Verrucomicrobiae* korrelierte dagegen positiv mit der Mangankonzentration ($R^2 = 0,65$).

Unter den *Cyanobacteria* korrelieren die Abundanzen der Subsection I positiv mit dem pH-Wert ($R^2 = 0,53$) und der Globalstrahlung (5-Tages-Mittel im Vorfeld der Probenahme, $R^2 = 0,68$). Diese Gruppe umfasst vorwiegend Vertreter des autotrophen Picoplanktons, für die auf Grundlage mikroskopischer Quantifizierung ebenfalls statistische Zusammenhänge zu Umweltparametern untersucht wurden. Positive Korrelationen zu pH-Wert und Globalstrahlung wurden auch dort festgestellt, jedoch waren darüber hinaus auch u.a. Wasser- und Lufttemperatur wesentliche Einflussfaktoren für die Abundanz des APP, die auf Grundlage der Sequenzierungsergebnisse nicht auftreten. Für die Gattung *Synechococcus* bestand eine deutlich positive Korrelation zur Chlorophyll a-Konzentration.

Vor allem für einige Gattungen der *Bacteroidetes* und *Betaproteobacteria* ist eine vorwiegend partikelassoziierte Lebensweise bekannt, Abbildung 72 zeigt die Korrelationen der Sequenzanteile verschiedener Gattungen in der Größenfraktion $>5\mu\text{m}$. Die statistische Auswertung für diese Größenfraktion basiert auf lediglich 12 Proben aus dem Jahr 2013. Wesentliche Gattungen der *Comamonadaceae* zeigen in diesem Datensatz deutlichere Korrelationen zu den Umweltparametern, so korrelieren die Sequenzanteile von *Limnohabitans* deutlich negativ mit DIC, DOC und DTC ($R^2 = -0,87$; $0,79$ und $0,87$) und die von *Acidovorax* positiv mit Chlorophyll a ($R^2 = 0,79$). Die Sequenzanteile von *Aquabacterium* korrelieren wie in der Fraktion $< 5\mu\text{m}$ positiv mit der Sulfatkonzentration ($R^2 = 0,72$), darüber hinaus besteht in der Größenklasse $> 5\mu\text{m}$ auch zur Nitratkonzentration ein positiver Zusammenhang ($R^2 = 0,76$). Die negative Korrelation von *Polynucleobacter* mit der DIC-Konzentration ist in dieser Größenfraktion stärker ausgeprägt ($R^2 = -0,85$), positive Zusammenhänge mit Wasser- und Lufttemperatur ($R^2 = 0,67$ bzw. $0,71$) sind darüber hinaus nur in dieser Größenfraktion signifikant ausgeprägt ($p < 0,01$). Die relativen Abundanzen von *C. Methylopusillus* korrelieren deutlich negativ mit

3 Ergebnisse

DOC und DTC ($R^2 = 0,86$ und $0,84$), ein negativer Zusammenhang zur Chlorophyll a-Konzentration ist in der Größenklasse $> 5 \mu\text{m}$ nicht ausgeprägt. Für die *Bacteroidetes* wurden unter den frei lebenden Bacteria nur für *Pseudarcicella* und *Fluviicola* Zusammenhänge zu Umweltparametern nachgewiesen, in der Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$ dagegen korrelieren die relativen Abundanzen von *Sediminibacterium* positiv mit Lufttemperatur und Globalstrahlung ($R^2 = 0,85$ und $0,72$) sowie die der *Sphingobacteriaceae* mit der Chlorophyll a-Konzentration ($R^2 = 0,84$).

Alphaproteobacteria haben in der Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$ generell geringere Sequenzanteile, darüber hinaus sind die saisonalen Schwankungen weniger ausgeprägt. Daher sind Korrelationen der Vertreter in der Fraktion $> 5 \mu\text{m}$, z.B. von *C. Pelagibacter* und *Roseomonas* zur Mangankonzentration, die in der anderen Größenklasse nicht auftreten, eventuell nicht sicher interpretierbar. Ähnliches gilt möglicherweise für die Vertreter der hgcl-clade, die als freilebende Ultramicrobacteria beschrieben werden und deren Sequenzanteile in der Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$ vergleichsweise gering sind. Im Gegensatz dazu haben die vorwiegend fädigen Cyanobakterien der Subsections III und IV in der Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$ deutlich höhere Sequenzanteile. Die relativen Abundanzen der Subsection III (v.a. *Limnothrix*) zeigen hier eine deutliche Korrelation zur Phosphatkonzentration ($R^2 = 0,94$), ein etwas weniger stark ausgeprägter Zusammenhang zwischen der Subsection IV (u.a. *Anabaena*) und der Sichtiefe ($R^2 = 0,73$).

3 Ergebnisse

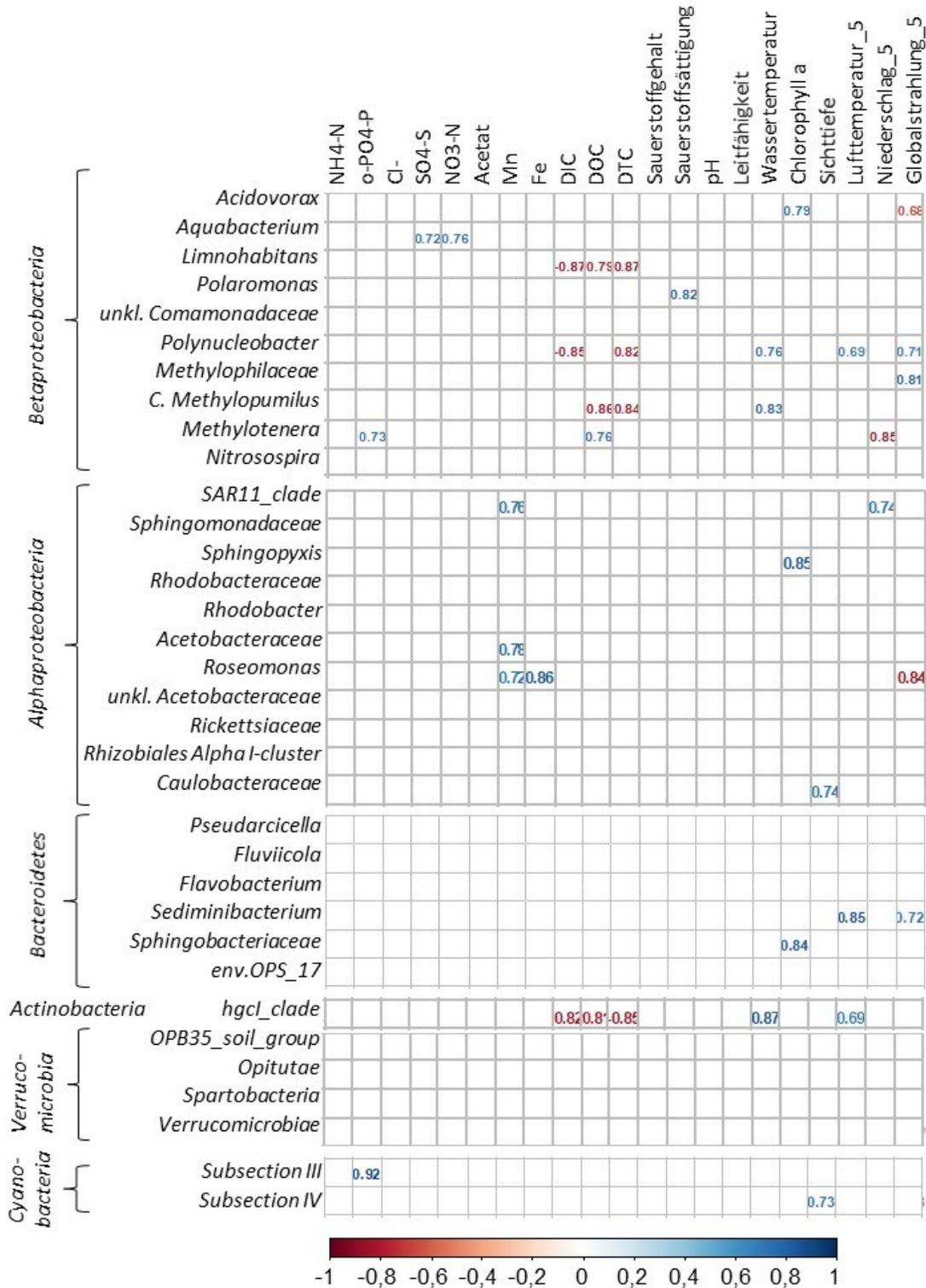


Abbildung 72: Darstellung signifikanter Korrelationen ($p < 0,01$, Korrelationskoeffizienten nach Pearson) von Umweltparametern mit relativen Häufigkeiten ausgewählter Taxa in der Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$, $n=12$

3 Ergebnisse

Abbildung 73 zeigt die Korrelationen zwischen den Häufigkeiten der untersuchten Taxa (Größenfraktionen $> 5 \mu\text{m}$ und $< 5 \mu\text{m}$). Starke positive Korrelationen, die auf ähnliche Umweltansprüche der Gruppen hindeuten können, bestehen zwischen den Sequenzanteilen von *Acidovorax* (*Betaproteobacteria*) und *Roseomonas* (*Alphaproteobacteria*) ($R^2 = 0,75$), zwischen *Polaromonas* und *Rhodoferrax* (beide *Comamonadaceae*) ($R^2 = 0,66$) und zwischen den unklassifizierten *Comamonadaceae* (*Betaproteobacteria*) und *Pseudarcicella* (*Bacteroidetes*) ($R^2 = 0,64$). Negative Korrelationen zwischen Taxa, die durch sehr unterschiedliche Umweltansprüche bedingt sein können, waren insgesamt schwächer ausgeprägt. Die deutlichsten negativen Korrelationen bestanden zwischen der SAR 11 clade (*Alphaproteobacteria*) und den unklassifizierten *Comamonadaceae* ($R^2 = -0,59$) sowie zwischen der hgcl-clade (*Actinobacteria*) und *Aquabacterium* (*Betaproteobacteria*) ($R^2 = -0,57$).

3 Ergebnisse

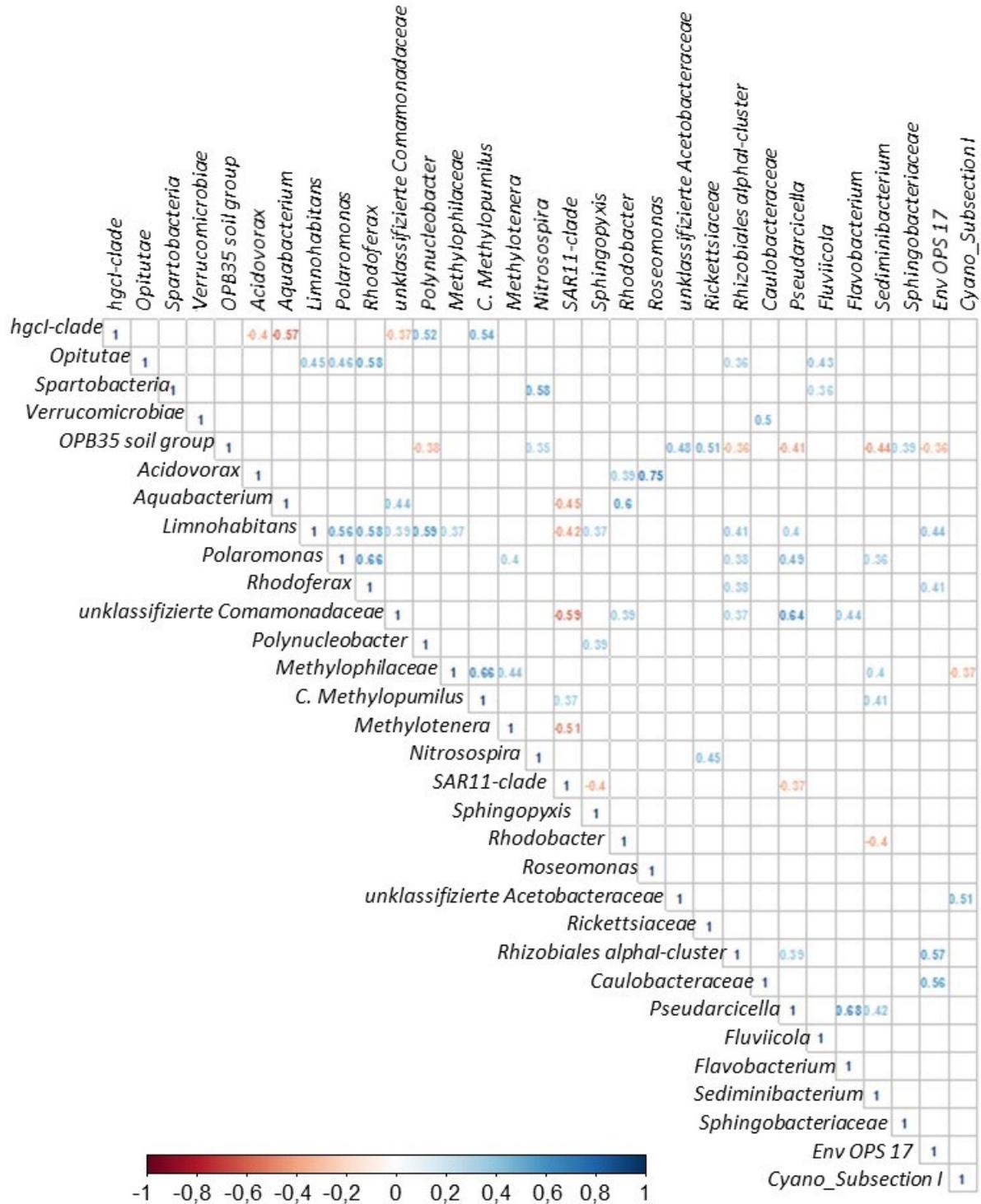


Abbildung 73: Darstellung signifikanter Korrelationen ($p < 0,01$, Korrelationskoeffizienten nach Pearson) zwischen relativen Häufigkeiten ausgewählter Taxa in der Größenfraktion $<5\mu\text{m}$

3 Ergebnisse

3.7 Die bakterielle Diversität anhand von DGGE und Klonierung

3.7.1 Klonierung und Zuordnung von DGGE-Banden

Die bakterielle Diversität der Wasserproben wurde mittels DGGE anhand eines 177 bp langen Teilfragmentes der 16S rDNA untersucht. Ergänzend dazu wurde aus einer Probe (Entnahmestelle, April 2013, < 5 µm) ein deutlich längeres Fragment (1506 bp) kloniert und sequenziert (Abbildung 74). Da der für die DGGE verwendete DNA-Abschnitt in diesem klonierten Fragment enthalten ist, können in einer DGGE das entsprechende Fragment der sequenzierten Klone gemeinsam mit Wasserproben aufgetrennt und die Signale der Klone denen in den Proben zugeordnet werden.

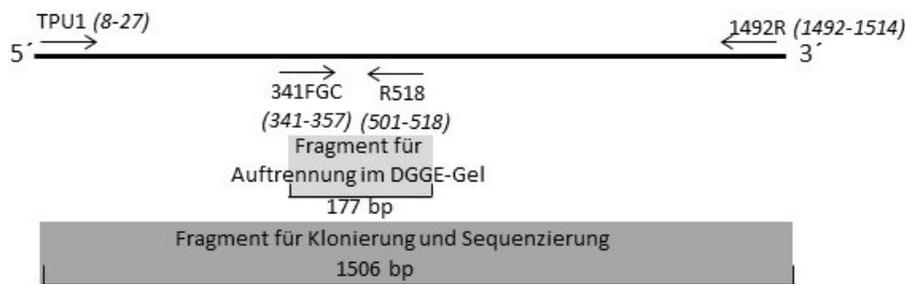


Abbildung 74:
Schematische Darstellung
der für DGGE und
Klonierung verwendeten
Primerkombinationen und
resultierender DNA-
Fragmente; kursiv:
Bindepotion der Primer
in der 16S rDNA;
bp=Basenpaare

Ein Ziel dieser ergänzenden Klonierung war die Überprüfung der Abbildung der bakteriellen Diversität durch die DGGE in Hinblick darauf, ob einzelne Signale ausschließlich bestimmte Gattungen oder Arten repräsentieren bzw. ob mehrere Signale durch eine taxonomische Einheit gebildet werden. Diese Untersuchung ist auch durch Sequenzierung der aus dem Gel entnommenen Signale möglich, aufgrund der begrenzten Länge der für die Auftrennung geeigneten DNA-Fragmente kann mittels Klonierung aber deutlich mehr Sequenzinformation gewonnen und eine genauere taxonomische Zuordnung vorgenommen werden. Insgesamt wurden 96 Klone untersucht. Die Auswahl erfolgte so, dass möglichst viele verschiedene DGGE-Signale integriert werden konnten und stellt somit keine quantitativ für die Probe repräsentative Zusammensetzung dar. Tabelle 26 zeigt die Zuordnung von Banden der Probe (a-m) zu den DGGE-Signalen der Klone auf gleicher Höhe im Gel und die taxonomische Identifikation der DNA-Sequenz der Klone.

3 Ergebnisse

Tabelle 26: Taxonomische Identifikation von DGGE-Banden der Probe E 04/2013 <5µm nach Klonierung, Sequenzierung und Vergleich der Laufhöhen von Banden der Klone und Banden der Probe

Bande	Taxonomische Zuordnung	Klon Nr.
a	<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Cryomorphaceae;Fluviicola;</i>	23, 32
b	<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Flavobacterium;</i>	46
c	<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Flavobacterium;</i>	67
d	<i>Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae;</i> <i>Sediminibacterium;</i>	26, 39
	<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae;</i> <i>Limnohabitans;</i>	42, 43, 65, 100, 106
e	<i>Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae;</i> <i>Sediminibacterium;</i>	63, 81, 88
	<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Methylophilales;Methylophilaceae; LD28</i> <i>freshwater group;</i>	22, 75
f	<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;SAR11 clade;LD12 freshwater group;</i>	84
	<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Flavobacterium;</i>	97
g	<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Flavobacterium;</i>	17, 19, 24, 66, 70, 90
h	<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Cytophagaceae;Arcicella;</i>	76, 69, 294, 47, 41, 6, 37, 77, 78, 20
	<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Flavobacterium;</i>	5, 83
i	<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Cytophagaceae;Arcicella;</i>	9, 61, 99
j	<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Burkholderiaceae;</i> <i>Polynucleobacter;</i>	58
	<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Sporichthyaceae;hgcl clade;</i>	49, 50, 36, 89, 56, 8, 14, 103,
k	<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Sporichthyaceae;hgcl clade;</i>	101, 64, 55,
l	<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Sporichthyaceae;hgcl clade;</i>	52
m	<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Sporichthyaceae;hgcl clade;</i>	105, 25

Die DGGE-Signale zweier abundanter Vertreter der *Bacteroidetes*, *Arcicella* und *Flavobacterium* zeigt Abbildung 75.

3 Ergebnisse

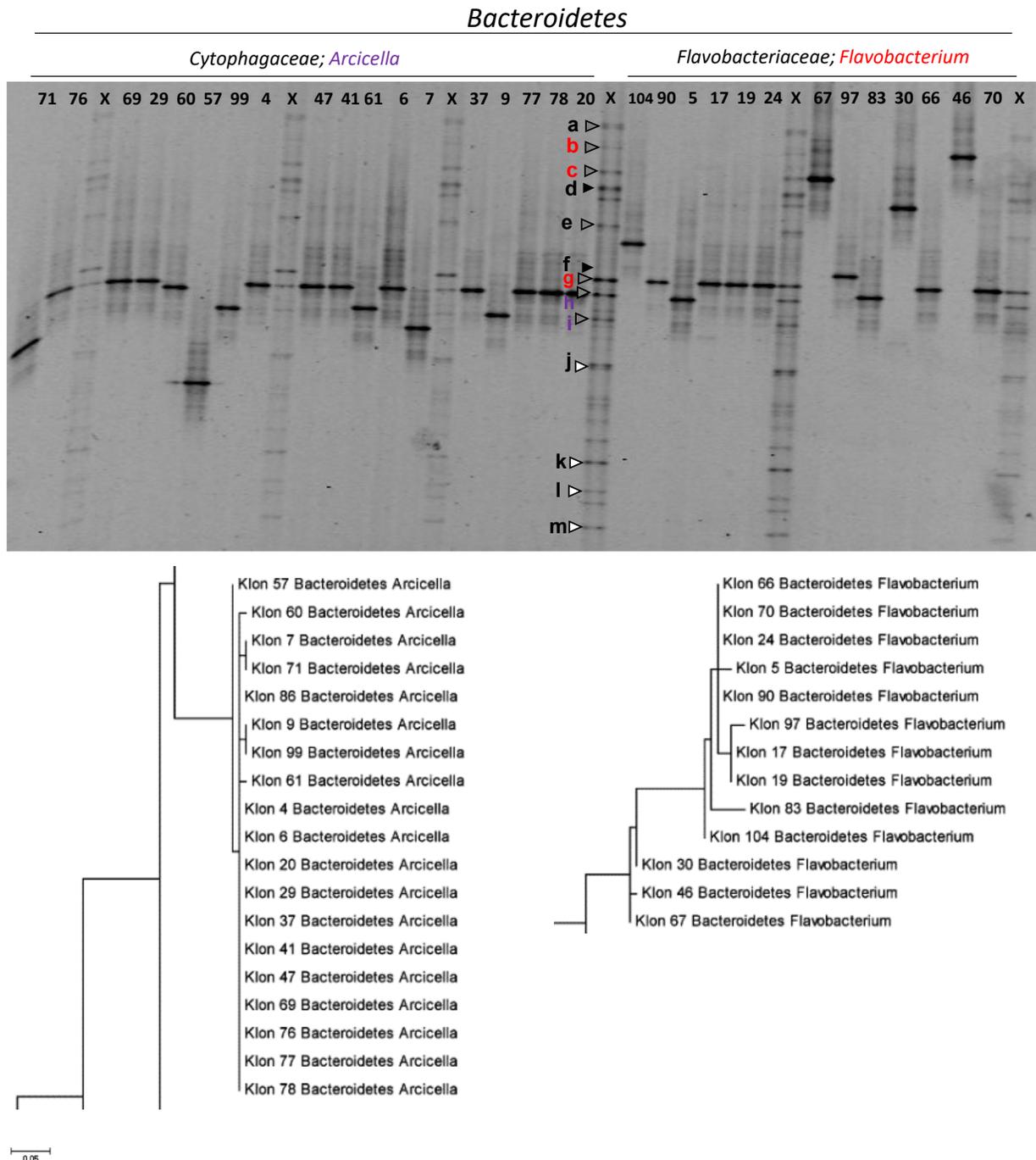


Abbildung 75: DGGE-Signale von Klonen der *Bacteroidetes* (*Arcicella*, *Flavobacterium*); X=klonierte Probe E <5µm, April 2013; Ausschnitte aus dem Maximum-Likelihood-tree auf Grundlage der Sequenzdaten des DGGE-Fragments der als *Arcicella* bzw. *Flavobacterium* identifizierten Klone

Bande h wurde anhand der Signale der Klone 76, 69, 294, 47, 41, 6, 37, 77, 78, 20 als *Arcicella* (*Cytophagaceae*) identifiziert, Klone 5 und 83 (*Flavobacterium*, *Flavobacteriaceae*) zeigen jedoch ein DGGE-Signal auf gleicher Höhe. Darüber hinaus weisen mehrere ebenfalls als *Arcicella* identifizierte Klone DGGE-Signale auf anderer Höhe auf. Klone 99, 61 und 9 wurden zur Zuordnung von Bande i verwendet. In

3 Ergebnisse

dieser Höhe gibt es kein DGGE-Signal von Klonen anderer Arten, Signale der *Verrucomicrobia* (Klone 74, 91) migrieren im Gel etwas unterhalb des entsprechenden Signals in der klonierten Probe (Abbildung 77). Die unterschiedlichen Laufhöhen der als *Arcicella* identifizierten Klone entsprechen den Sequenzunterschieden zwischen den Klonen im DGGE-Fragment (Abbildung 75). Klone mit hoher Sequenzidentität ergeben auch Banden auf gleicher Höhe im DGGE-Gel, so z.B. die Mehrheit der Klone dieser Gattung 4, 6, 20, 29, 37, 41, 47, 96, 76, 77, 78. Auch für Klone mit davon abweichender Laufhöhe ist der Zusammenhang zur Sequenzidentität eindeutig (Klone 7 und 71, 9 und 99, 57, 60, 86, 61).

Als *Flavobacterium* identifizierte Klone zeigen DGGE-Signale auf sehr unterschiedlichen Höhen im Gel, die meisten Klone (17, 19, 24, 66, 70, 90) entsprechen der Höhe von Bande g. Die Zuordnung der Banden b und c beruht jeweils nur auf dem DGGE-Signal eines einzelnen Klons (46 bzw. 67). Für Bande c gibt es jedoch unter den untersuchten Klonen kein weiteres DGGE-Signal auf dieser Höhe, bei Bande b tritt nur ein Signal von Klon 102 (*Limnohabitans*, *Betaproteobacteria*) etwas oberhalb der zugeordneten Bande in der klonierten Probe auf. Der Vergleich mit den Sequenzdaten des DGGE-Fragments zeigt ein Cluster der Bande g entsprechenden Klone (sowie Klon 5). In diesem Falle weisen auch Klone mit Sequenzunterschieden die gleiche Laufhöhe im Gel auf (66, 70 und 24 vs. 17, 19, 90). Zwei der dem gleichen Cluster zugeordneten Klone (5 und 97) bilden jedoch abweichende DGGE-Signale. Klone mit deutlich von Bande g entferntem DGGE-Signal (30, 46, 67, 104) zeigen auch größere Sequenzunterschiede zu den entsprechenden Klonen.

Abbildung 76 zeigt die Signale der Klone weiterer Vertreter der *Bacteroidetes* sowie *Alpha*- und *Betaproteobacteria*.

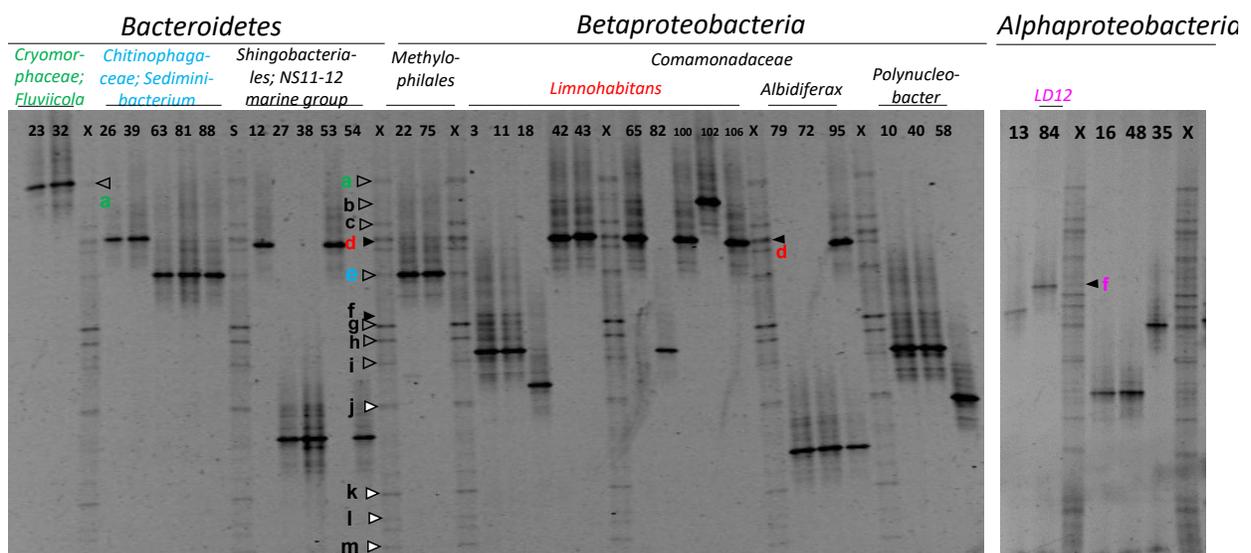


Abbildung 76: DGGE-Signale von Klonen der Bacteroidetes, Betaproteobacteria und Alphaproteobacteria; X=klonierte Probe E <5µm, April 2013

3 Ergebnisse

Bande a konnte eindeutig den DGGE-Signalen der als *Fluviicola* (*Cryomorphaceae*) identifizierten Klone 23 und 32 zugeordnet werden. Die DGGE-Signale der Klone 63, 81 und 88 stützen die Identifikation von Bande e der klonierten Probe als *Sediminibacterium* (*Chitinophagaceae*). Klone 22 und 75 (*Methylophilales*, *Betaproteobacteria*) zeigen jedoch ein Signal auf gleicher Höhe. Die Signale der Klone 26 und 39 (*Sediminibacterium*, *Chitinophagaceae*) weisen ebenso wie die der Klone 42, 43, 65, 100, 106 (*Limnohabitans*, *Comamonadaceae*) eine Position entsprechend Bande d der klonierten Probe auf. Die Sequenzanteile der beiden Gattungen in der klonierten Probe sind gemäß den Ergebnissen der Pyrosequenzierung ähnlich, sodass diese Zuordnung eine starke Unsicherheit aufweist. Die Sequenzen des DGGE-Fragmentes für die Klone mit der Bande d entsprechenden Laufhöhe zeigen separate Cluster für die Klone der beiden Gattungen *Sediminibacterium* und *Limnohabitans*, der Identität des DGGE-Signals liegt damit keine Sequenzidentität zugrunde. Innerhalb der Gattungen weisen Klone mit gleicher Laufhöhe im Gel hohe Sequenzidentitäten auf (z.B. *Limnohabitans* 43, 65, 100, 106, bzw. 3, 11, 82; *Sediminibacterium* 26 und 39 vs. 63, 81, 88)

Polynucleobacter (*Comamonadaceae*) weist laut Pyrosequenzierung in der klonierten Probe Sequenzanteile von 4 % auf, die Signale der entsprechenden Klone 10 und 40 zeigen jedoch nicht exakt die gleiche Höhe wie entsprechende Banden in der Probe (etwas oberhalb Bande i), sodass keine Zuordnung vorgenommen wurde. Die Bande von Klon 58 (*Polynucleobacter*) tritt auf gleicher Höhe mit Bande j auf, wo jedoch auch die Signale von acht als *hgc I - clade* (*Actinobacteria*) identifizierten Klonen auftritt. Da die Sequenzanteile der letztgenannten Gruppe in der klonierten Probe mit 12 % deutlich höher sind als die von *Polynucleobacter*, repräsentiert Bande j in dieser Probe eher Vertreter der *hgc I - clade*.

Auf gleicher Höhe wie Bande f tritt das DGGE-Signal von Klon 84 auf, der als (LD12-clade/*Candidatus Pelagibacter*, *Alphaproteobacteria*) identifiziert wurde. Kritisch bei dieser Zuordnung ist das Signal von Klon 97 (*Flavobacterium*) auf ähnlicher Höhe. Die weiteren Klone der *Alphaproteobacteria* (13, 16, 48, 35) wurden nicht für eine Zuordnung verwendet, da die entsprechenden DGGE-Signale jeweils ähnliche Laufhöhen wie die von Klonen anderer Arten zeigen deren Sequenzanteile gemäß den Ergebnissen der Pyrosequenzierung in der klonierten Probe wesentlich höher sind.

Die Signale der Klone 79, 72 und 95 zeigen ein einheitliches DGGE-Signal und wurden als *Albidiferax* bzw. *Limnohabitans* (*Comamonadaceae*) identifiziert, in der klonierten Probe ist die Bande auf der entsprechenden Höhe nur sehr schwach erkennbar. Gleiches gilt für Klone 27, 38, 54 (*NS12-11 marine group*, *Sphingobacteriales*). Entsprechend geringe Anteile der Vertreter dieser beiden Gruppen in der klonierten Probe zeigten auch die Ergebnisse der Pyrosequenzierung.

3 Ergebnisse

Die Zuordnung von Bande j zur *hgc I*-clade der *Frankiales* erfolgte anhand der Signale der Klone 49, 50, 36, 89, 56, 8, 14, 103, für die Banden k Klone 101, 64, 55, Bande l (Klon 52), Bande m (Klone 105 und 25). Die Klone der *hgc-I-clade* zeigen DGGE-Signale auf unterschiedlichen Höhen, jedoch alle deutlich im unteren Bereich des DGGE-Profiles, wo kaum Signale von Klonen anderer Arten auftreten (Abbildung 77).

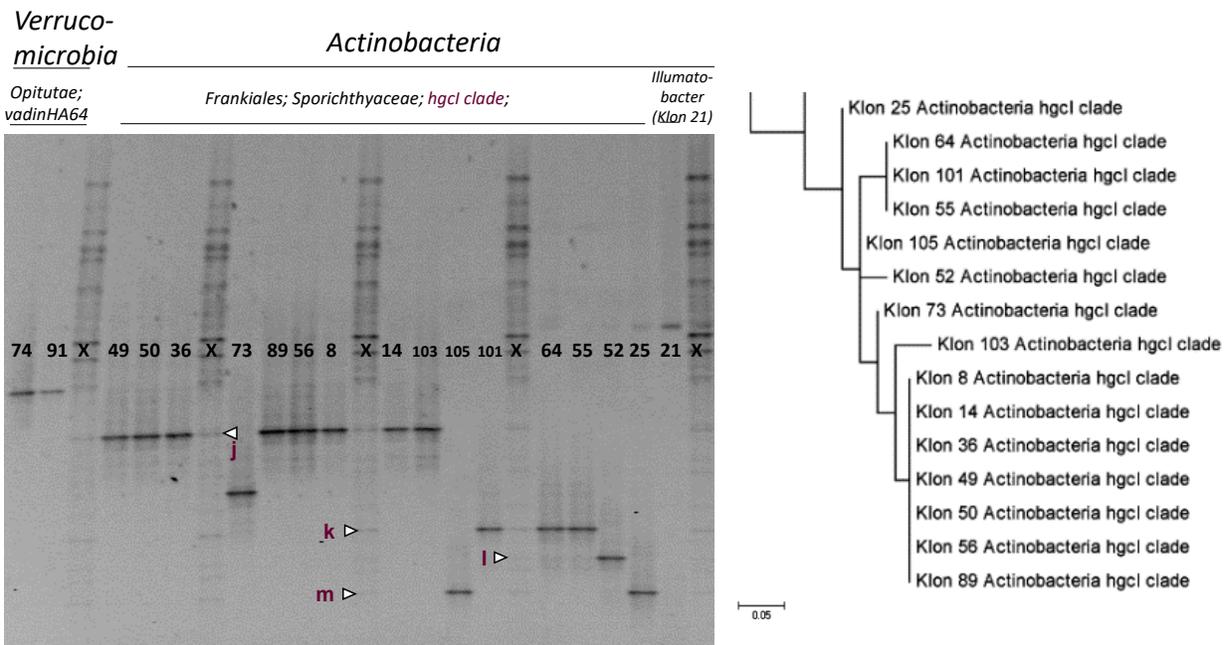


Abbildung 77: DGGE-Signale von Klonen der *Verrucomicrobia* und *Actinobacteria*; X=klonierte Probe E <5µm, April 2013; Ausschnitt aus dem Maximum-Likelihood-tree auf Grundlage der Sequenzdaten des DGGE-Fragments der als *hgcl-clade* identifizierten Klone

Für die Klone 8, 14, 36, 49, 50, 56, 89, 103, die ein identisches DGGE-Signal bilden, besteht auch eine hohe Sequenzidentität (geringe Abweichung für Klon 103). Das gleiche gilt für die Klone 55, 64 und 101. Den Signalen der beiden als Vertreter der *Verrucomicrobia* identifizierten Klone entspricht kein erkennbares Signal im DGGE-Pofil der klonierten Probe, was durch die geringen Sequenzanteile von 2 % bedingt ist.

Die Auswertung der Sequenzdaten zeigt, dass DGGE-Fragmente verschiedener Sequenz die gleiche Position im DGGE-Gel einnehmen können, was auch über Gattungsgrenzen hinweg möglich ist (z. B. *Limnohabitans* und *Sediminibacterium*). Für die statistische Auswertung (clusteranalyse) der DGGE-Profile heißt das, dass in verschiedenen Proben auftretende gleiche Banden von Vertretern verschiedener Gattungen stammen können und aufgrund solcher Banden die Ähnlichkeit von Proben zueinander überschätzt werden könnte. Insbesondere bei häufigen Gattungen ist dieser Aspekt kritisch. Durch Sequenzunterschiede im DGGE-Fragment können aber auch unterschiedliche DGGE-Signale von Vertretern der gleichen Gattung gebildet werden (u.a. *Arcicella*, *Flavobacterium*, *Limnohabitans*, *hgc-I*-

3 Ergebnisse

clade). In diesem Falle wird zwar die taxonomische Einordnung durch die DGGE-Banden nicht abgebildet, jedoch beruhen die unterschiedlichen Signale auf vorhandenen Sequenzunterschieden, die möglicherweise auch auf das Vorhandensein von Subpopulationen der Organismen hinweisen können.

3.7.2 Bakterielle Diversität im Jahresverlauf an den verschiedenen Untersuchungsstellen

3.7.2.1 Vergleich und Clusteranalyse der DGGE-Profile:

Die DGGE-Profile der beiden Größenfraktionen $< 5\mu\text{m}$ und $> 5\mu\text{m}$ unterscheiden sich deutlich und werden in der Clusteranalyse bis auf wenige Ausnahmen getrennten Clustern zugeordnet. Die Profile der Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$ sind häufiger durch eine oder wenige Banden dominiert, vor allem im Frühjahr, wobei es sich vorwiegend um die DNA der Chloroplasten eukaryotischer Algen handelt, von denen v.a. Vertreter der *Bacillariophyceae* zur Frühjahrsmassenentwicklung typischerweise die Planktongemeinschaft der Talsperre dominieren. In der Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$ hingegen zeigen viele Proben ein diverseres Bandenmuster in dem nur selten einzelne Banden dominant auftreten. Die Ähnlichkeit zwischen den Profilen ist in der Fraktion $< 5\mu\text{m}$ höher, wozu vor allem die Banden der *hgcl*-Gruppe im unteren Drittel der Gele beitragen (Banden j-m), aber auch die Banden d und f, die in der überwiegenden Mehrheit der Proben auftreten.

Abbildung 78 zeigt die DGGE-Profile der bakterielle Diversität in der Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$: Im Frühjahr 2013 (April) weisen die DGGE-Profile der Probenahmestellen F, H und S jeweils eine dominante Bande auf gleicher Höhe auf, die im entsprechenden Profil der Entnahmestelle jedoch nicht vorrangig in Erscheinung tritt, statt dessen weist das Bandenmuster hier eine deutlich höhere Diversität mit untereinander ähnlich starken Banden auf. Zwei Wochen vor der Probenahme im Juni 2013 führten starke Niederschläge zu einem vermehrten Eintrag von Sedimenten in das Gewässer. Vor allem an den Untersuchungsstellen H und S zeigt sich für die Probenahme im Juni ein deutlicher Umbruch in den DGGE-Profilen im Vergleich zum Vormonat, beide sind durch zwei neu auftretende Banden dominiert. Diese treten an der Entnahmestelle jedoch nicht in Erscheinung, dort ähnelt das Profil noch stärker dem des Vormonats. In den beiden folgenden Monaten Juli und August weisen jedoch alle drei Probenahmestellen der Hauptsperre starke Ähnlichkeit untereinander auf, wobei sich die Profile zwischen Juni und August deutlich unterscheiden. Am Jahresende zeigen die Proben des Monats November für die einzelnen Untersuchungsstellen eine abnehmende Anzahl Banden in Fließrichtung. Während in der Vorsperre noch ein diverses Bandenmuster auftritt, ist das entsprechende Profil der Entnahmestelle durch eine einzelne Bande dominiert.

3 Ergebnisse

Die DGGE-Profile der Frühjahrsproben 2014 (März, April) der Hauptsperre sind gekennzeichnet durch jeweils eine dominante Bande an den Untersuchungsstellen H und S. An der Entnahmestelle treten die gleiche und eine weitere Bande dominant in Erscheinung. In den drei Proben von Mai bis Ende Juni weisen die Bandenmuster der Stellen H und E jeweils eine dominante Bande auf gleicher Höhe auf, die in der dazwischenliegenden Probenahmestelle S jedoch nur Anfang Juni dominant auftritt.

3 Ergebnisse

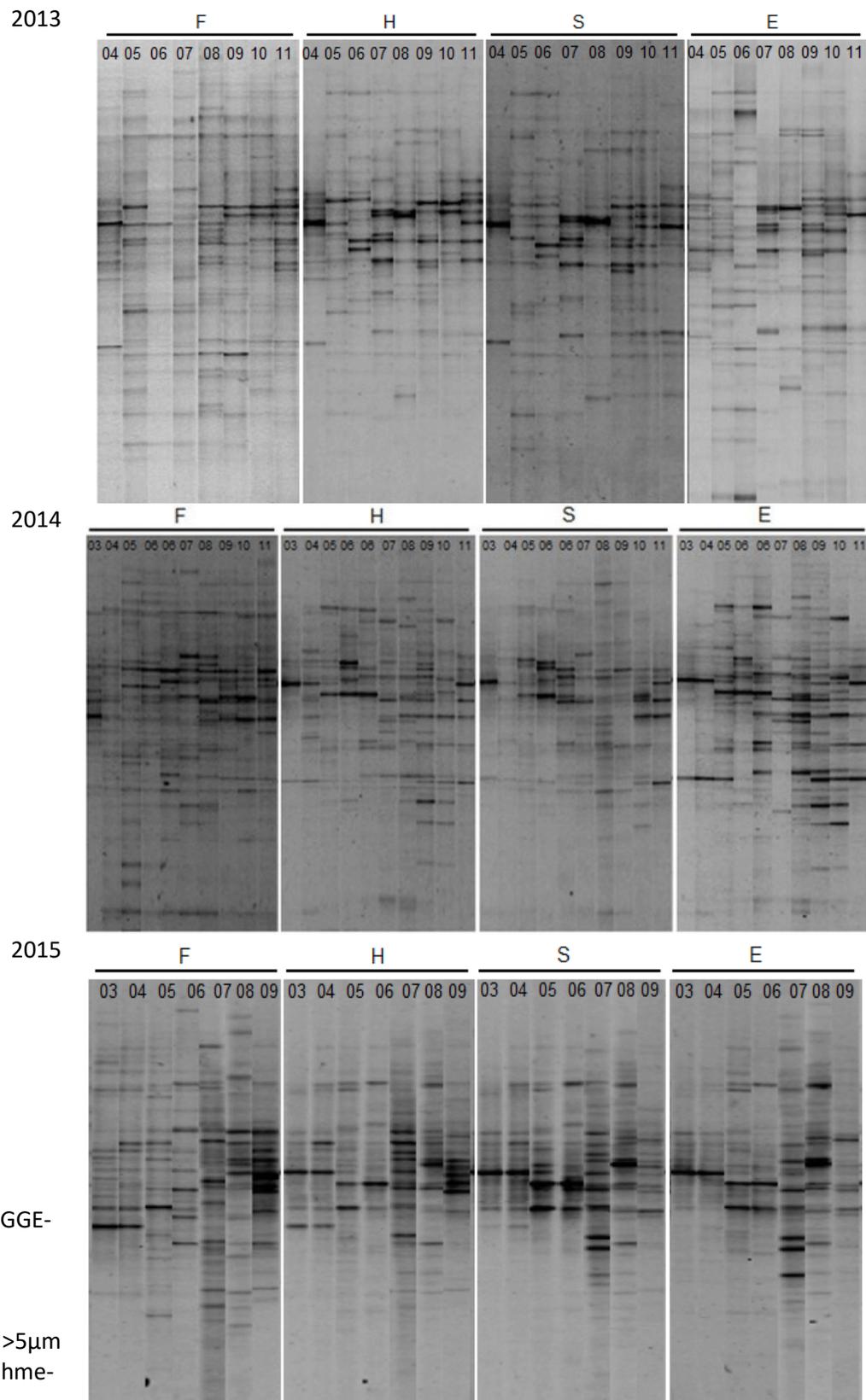


Abbildung 78:
Normalisierte DGGE-
Profile der
bakteriellen
Diversität
Größenfraktion >5µm
an den Probenahme-
stellen in
Fließrichtung

3 Ergebnisse

Im Jahr 2015 ähneln sich die DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaft $>5\mu\text{m}$ der beiden Untersuchungsstellen S und E stark über alle untersuchten Monate hinweg. Die Proben der Untersuchungsstelle H weisen bis Juni starke Ähnlichkeiten zu den beiden stromaufwärts gelegenen Probenahmestellen auf. Ab Juli tritt deutliche Steigerung der Diversität des Bandenmusters an allen drei Stellen der Hauptsperre auf, dabei zeigen sich vor allem in der Intensität der jeweiligen Banden erstmals deutlichere Unterschiede zwischen H einerseits und S und E andererseits. Im August ähneln sich die Profile der drei Stellen wieder sehr stark, während im September erneut H mehr Unterschiede zu den beiden stromaufwärts gelegenen Stellen aufweist. In der Vorsperre Forchheim dominieren in den Frühjahrsproben andere Banden die Profile als in den Probenahmestellen der Hauptsperre. Die beschriebene Steigerung der Diversität des Bandenmusters tritt hier bereits einen Monat zuvor, im Juni auf.

In den Clusteranalysen bilden die DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaft $>5\mu\text{m}$ vorwiegend saisonale Cluster, wobei zu einem Zeitpunkt häufig die drei Probenahmestellen der Hauptsperre größere Ähnlichkeiten untereinander aufweisen als zur Vorsperre. Teilweise treten jedoch auch größere Ähnlichkeiten zwischen der Vorsperre und der in Fließrichtung nächstgelegenen Probenahmestelle der Hauptsperre H auf.

Die Clusteranalyse der Proben von **2013** (Abbildung 79) zeigt ein separates Cluster der Proben aus der Vorsperre von Mai bis September, in dem nur die Probe von Mai der Stelle S mit enthalten ist. Die Frühjahrsproben der Entnahmestelle (April, Mai) bilden ein separates Cluster, während im Juni und Juli alle drei Probenahmestellen der Hauptsperre jeweils ein gemeinsames Cluster bilden. Die in Fließrichtung erste Probenahmestelle der Hauptsperre weist im September mehr Gemeinsamkeiten mit der in Fließrichtung folgenden Stelle S auf, im Oktober bildet sie jedoch ein Cluster mit Proben der Vorsperre (Oktober und November). Die letzten Proben der Saison (November und Dezember) bilden ein Cluster mit den April-Proben aller anderen Probenahmestellen, hier spielt eventuell die Vollzirkulation eine Rolle.

Für die Proben von **2014** ergab die Analyse vorwiegende saisonale Cluster, die sich dabei nach den Probenahmestellen F und H (Vorsperre und Vorbecken) sowie S und E (stromaufwärts der Unterwasserstaumauer und Entnahmestelle) aufgliedern (Abbildung 80). Nur zur Frühjahrs- und Herbstzirkulation (März, April, November) bilden alle drei Probenahmestellen der Hauptsperre ein gemeinsames Cluster. Die Probenahmestellen in der Vorsperre und im Vorbecken der Hauptsperre (H) clustern im Hochsommer (Ende Juni, Juli, August und September). In diesem Cluster treten auch Frühjahrs-

3 Ergebnisse

und Fröhsommerproben der Vorsperre auf, was ein Hinweis auf einen Eintrag dominanter Arten aus der Vorsperre (F) ins Vorbecken (H) sein kann. Im Herbst treten wieder getrennte Cluster der Proben aus Vorsperre und Vorbecken (F und H) einerseits sowie der Proben in Fließrichtung oberhalb (S und E) auf.

Im Fröhsjahr (März und April) 2015 bilden die Proben aus der Vorsperre ein separates Cluster, ebenso wie die entsprechenden Proben aus dem Bereich vor der Unterwasserstaumauer in der Hauptsperre (H) (Abbildung 81). Die beiden anderen Probenahmestellen der Hauptsperre in Fließrichtung oberhalb der Unterwasserstaumauer (S und E) bilden dagegen in diesem Zeitraum ein gemeinsames Cluster. Für die folgenden beiden Monate Mai und Juni werden die Proben aller drei Probenahmestellen der Hauptsperre einem gemeinsamen Cluster zugeordnet. Im Juli sowie im September zeigt die Clusteranalyse im Unterschied dazu deutliche Ähnlichkeit zwischen den jeweiligen Proben aus der Vorsperre und der in Fließrichtung nächstgelegenen Probenahmestelle (H) der Hauptsperre. Im August hingegen werden die Proben aller vier Probenahmestellen einem gemeinsamen Cluster zugeordnet. Betrachtet man die Monate Juli und August, so deuten die Ergebnisse der Clusteranalyse möglicherweise auf ein pulsartiges Aufkommen von Arten in der Vorsperre und eine folgende Verdriftung in die Hauptsperre hin. Dadurch würden wie beobachtet zunächst ähnliche DGGE-Profile zwischen Vorsperre und der in Fließrichtung nächstgelegenen Probenahmestelle der Hauptsperre (H) entstehen und im Folgemonat auch die Profile der weiter stromaufwärts gelegenen Probenahmestellen entsprechende Ähnlichkeiten zu diesen aufweisen.

3 Ergebnisse

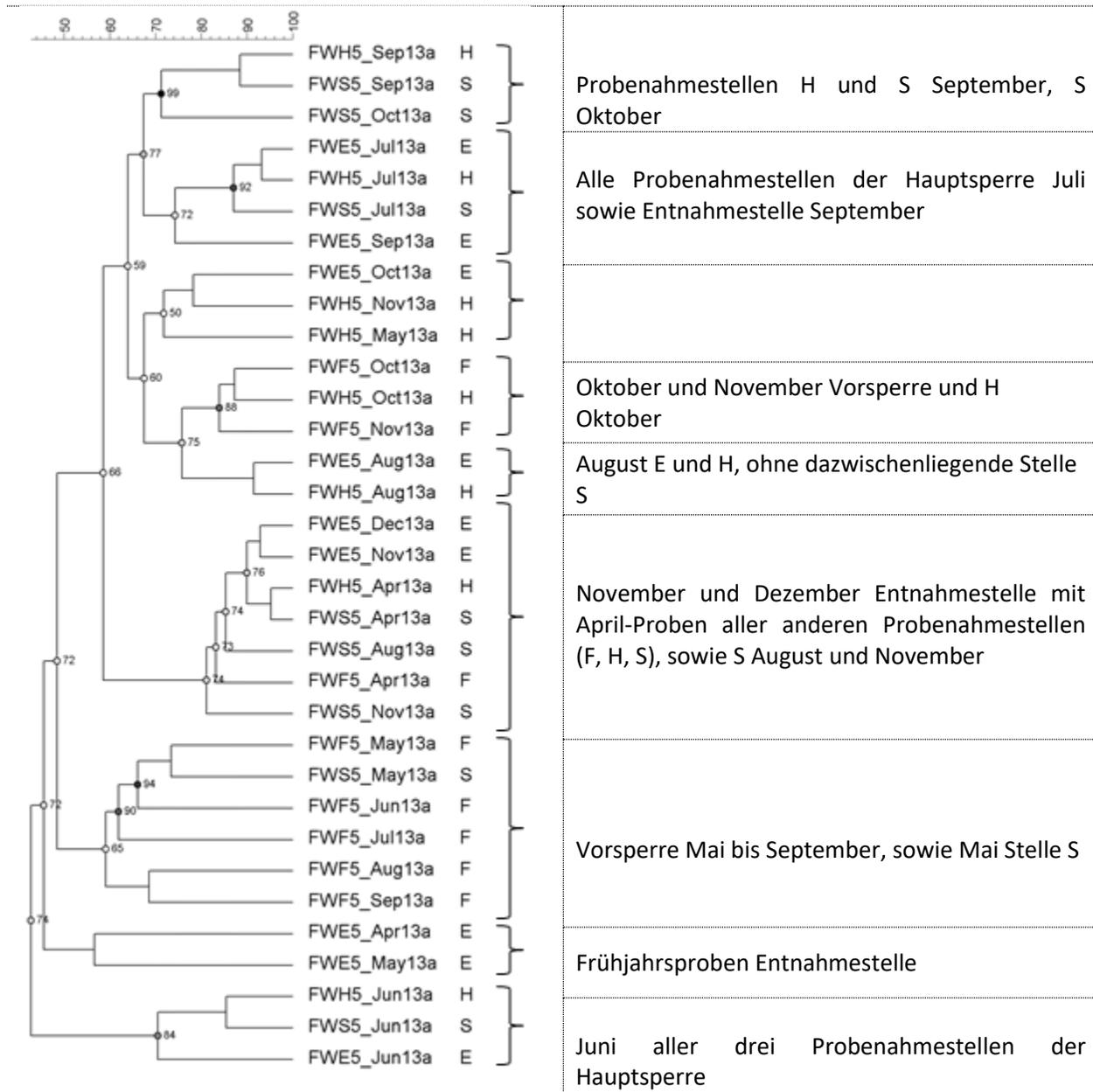


Abbildung 79: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion >5µm der Proben von 2013; Ähnlichkeitskoeffizienten der DGGE-Profile nach Pearson, Clusterbildung nach UPGMA

3 Ergebnisse

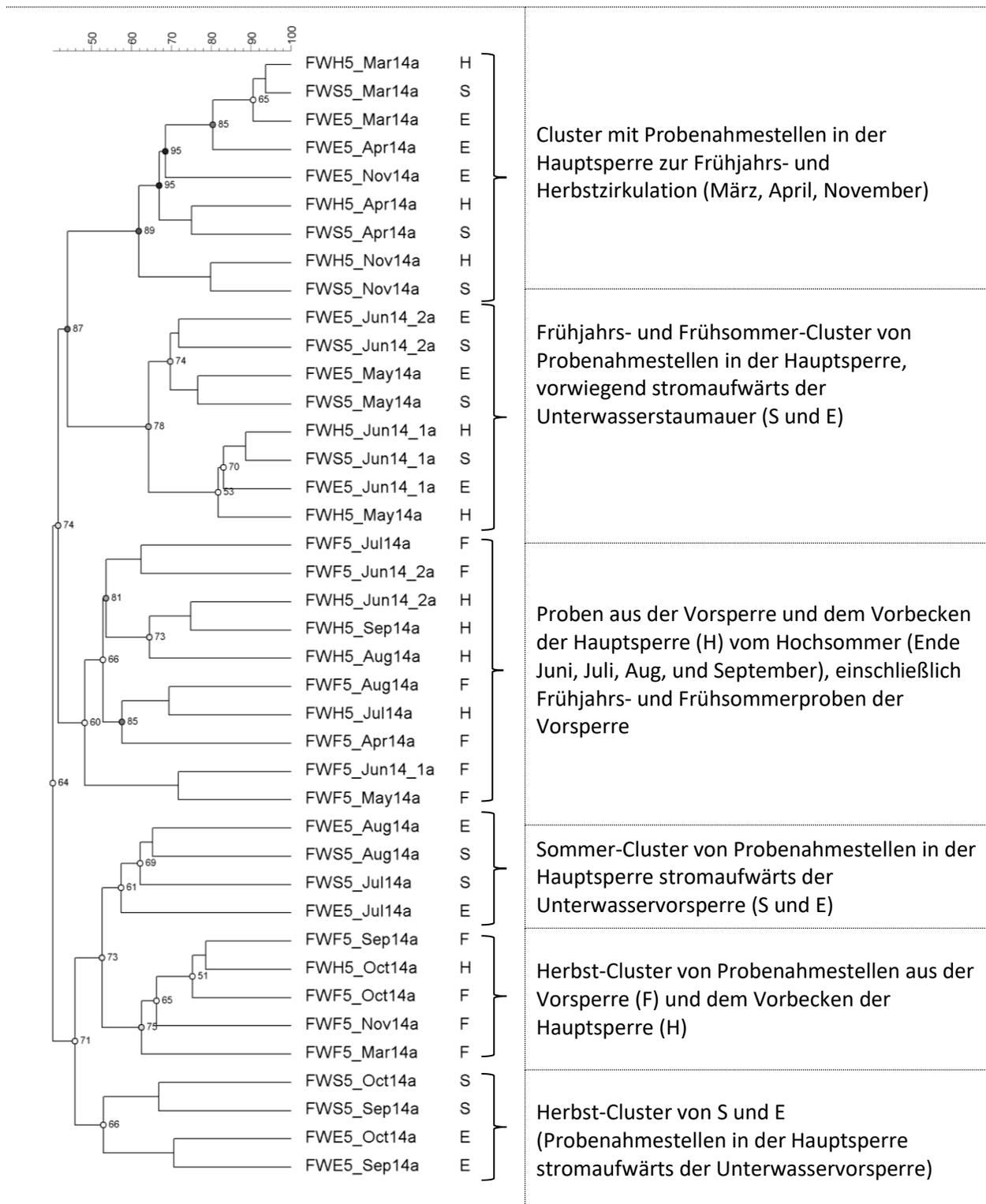


Abbildung 80: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion >5µm der Proben von 2014, Ähnlichkeitskoeffizienten der DGGE-Profile nach Pearson, Clusterbildung nach UPGMA

3 Ergebnisse

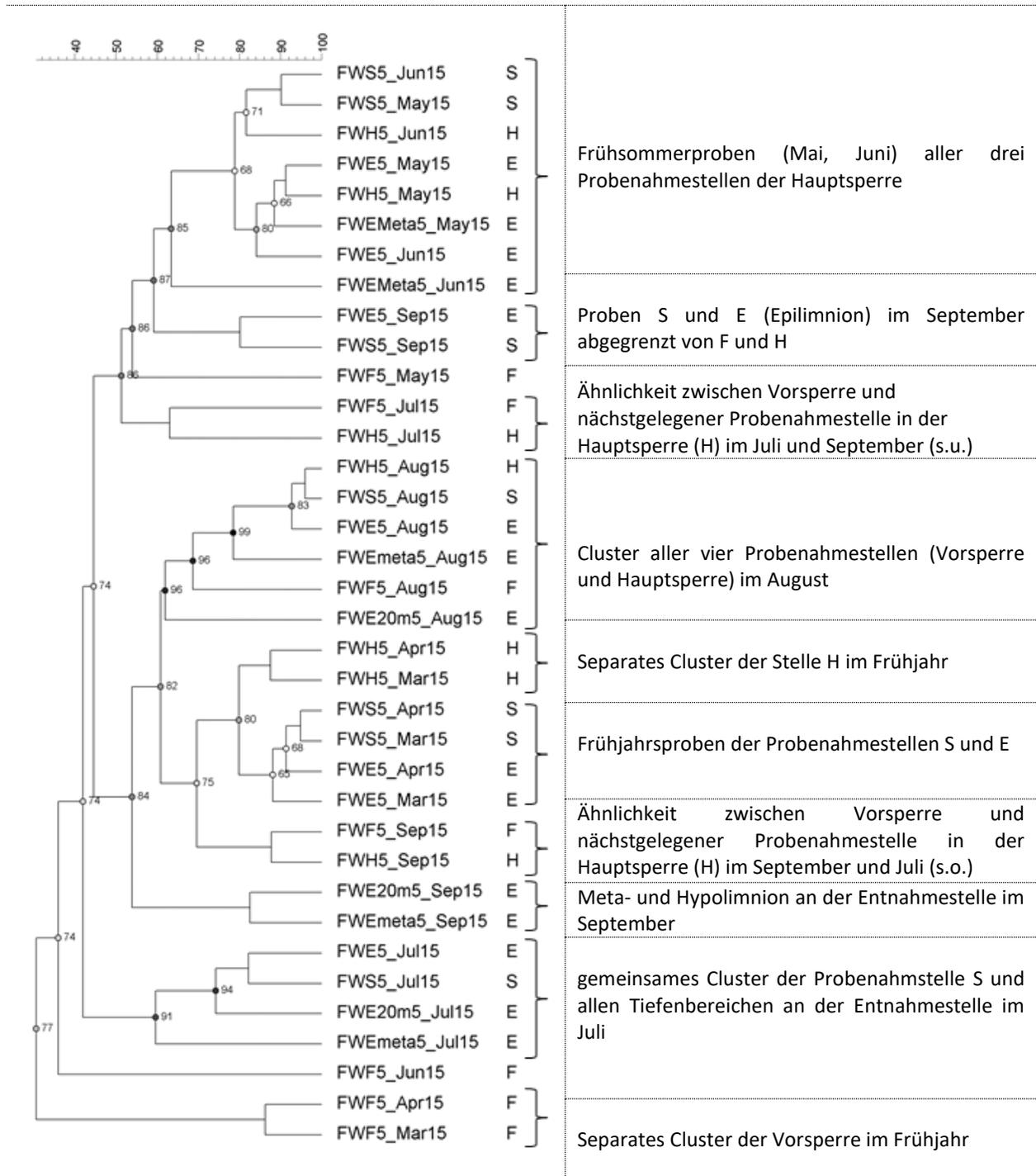


Abbildung 81: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion >5µm der Proben von 2015; Ähnlichkeitskoeffizienten der DGGE-Profile nach Pearson, Clusterbildung nach UPGMA

3 Ergebnisse

Die DGGE-Profile der frei lebenden Bakterien (Größenfraktion $< 5 \mu\text{m}$) weisen im Unterschied zu denen der Proben $>5\mu\text{m}$ stärkere Ähnlichkeiten untereinander auf (Abbildung 82). Vor allem im unteren Drittel des Gels besteht eine starke Ähnlichkeit der Bandenmuster, wie aus der Klonierung und Zuordnung der DGGE-Banden hervor geht (Kapitel 3.7.1), werden diese Banden vorwiegend durch Vertreter der *hgcl-clade* (*Actinobacteria*) gebildet. Allgemein ähneln sich vor allem die Profile der Untersuchungsstellen H, S und E, dies gilt insbesondere für die Proben ab Juni bis Jahresende. Die Profile deuten darauf hin, dass sich bis zum Sommer die bakterielle Gemeinschaft etabliert und danach kaum noch Änderungen in der Zusammensetzung der Population in diesen Proben auftreten. Das Bandenmuster der Proben aus der Vorsperre unterscheidet sich deutlich von dem der Probenahmestellen in der Hauptsperre. Es gibt über die Saison hinweg viele unter den Proben gleiche Banden, deren Intensität jedoch im Verlauf des Jahres deutlich schwankt. Eventuell sind vorwiegend Vertreter der gleichen Gattungen präsent, deren quantitative Bedeutung im Jahresverlauf und je nach vorherrschenden Bedingungen variiert.

3 Ergebnisse

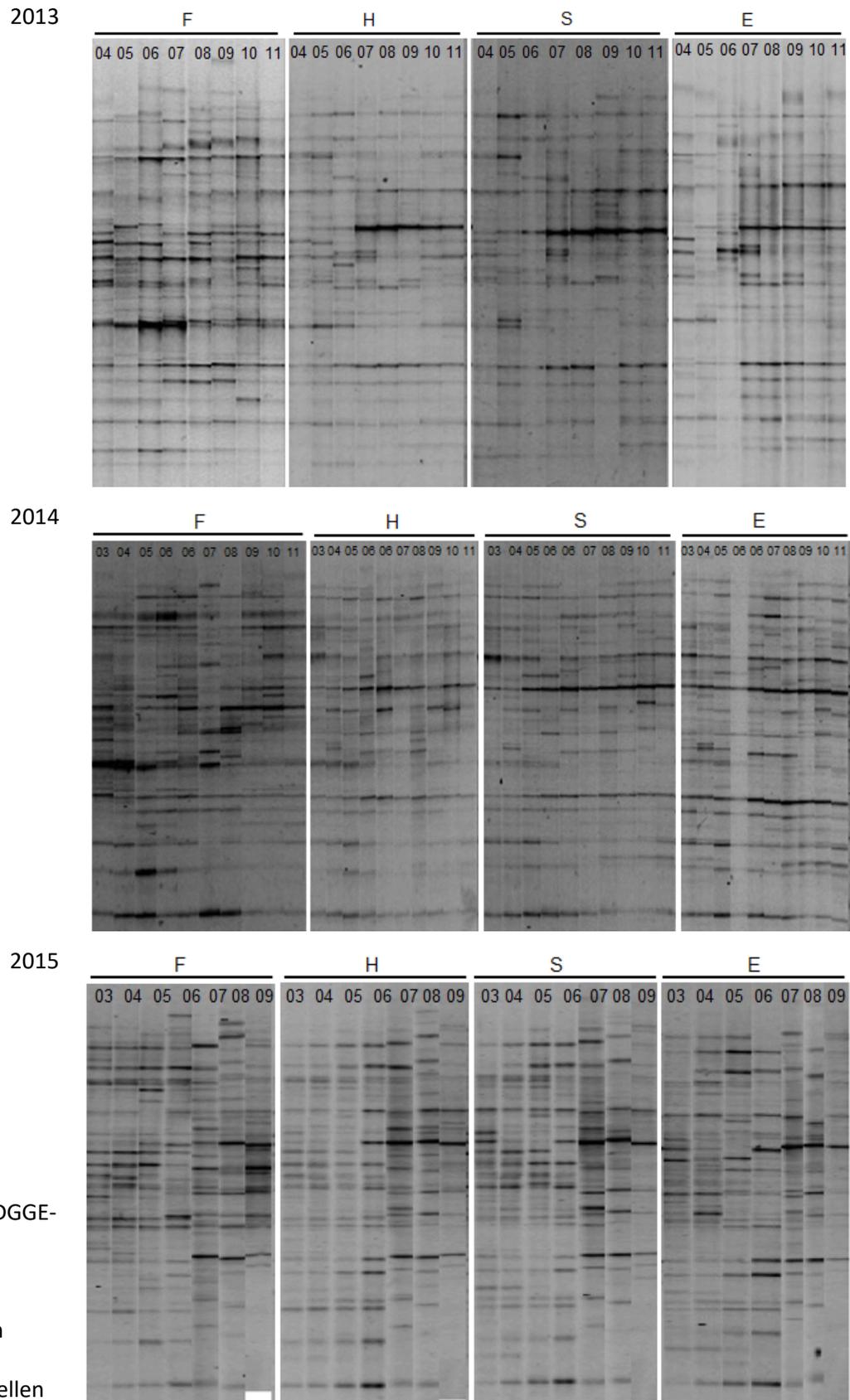


Abbildung 82:
Normalisierte DGGE-
Profile der
bakteriellen
Diversität der
Größenfraktion
<math>< 5\mu\text{m}</math> an den
Probenahmestellen
in Fließrichtung

3 Ergebnisse

Die Clusteranalyse der nicht-assoziierten Bakterien für das Jahr **2013** zeigt sowohl saisonale als auch lokale Gemeinsamkeiten zwischen den Proben (Abbildung 83). Im Frühjahr bilden die Proben der Hauptsperre (April, Mai) und der Vorsperre (April bis Juni) jeweils separate Cluster, wobei die Mai-Probe der Entnahmestelle keinem der beiden Cluster angehört. Für das übrige Jahr ab Juli werden die Proben der Stellen H und S einem gemeinsamen Cluster zugeordnet. Im vorangegangenen Monat Juni unterschieden sich die Proben der beiden Stellen noch stärker voneinander und die Probe der Stelle H wird in ein Cluster mit Proben der Vorsperre eingeordnet während die Probe der Stelle S größere Ähnlichkeit zu Proben der Entnahmestelle des gleichen Zeitraumes aufweist. Die Proben der Entnahmestelle ab Juni clustern nah beieinander mit Unterteilungen in Juni, Juli bis September und Oktober bis Dezember.

2014 clustern die Proben im Unterschied zu den anderen Jahren deutlich nach den Untersuchungsstellen (Abbildung 84). Nur die Frühjahrsproben (März bis April bzw. Mai) der benachbarten Untersuchungsstellen H und S werden einem gemeinsamen Cluster zugeordnet, für den Rest des Jahres bilden auch die Proben dieser Stellen separate Cluster. Innerhalb der Cluster der Untersuchungsstellen tritt jeweils eine saisonale Unterteilung in die Proben der ersten und der zweiten Jahreshälfte auf. Dies trifft wie beschrieben auf die Proben von H (März bis Mai/April und Juni bis November) zu. Die Proben der Stelle S verhalten sich ähnlich, mit dem Unterschied, dass die Proben von Mai und Anfang Juni ein separates Cluster bilden, welches näher zu den Proben der Entnahmestelle zugeordnet wird. Für die Entnahmestelle clustern die Proben März bis Ende Juni und davon abgesetzt die Proben von August bis November. Die Proben der Vorsperre Forchheim bilden drei saisonale Untergruppen, von März bis Ende Juni, Juli und August sowie September bis November. Die Proben aus dem Metalimnion der Entnahmestelle treten jeweils in von den Proben aus 2 m Wassertiefe getrennten Clustern auf, dabei bilden die Proben von Mai und Anfang Juni, Ende Juni bis Auguste sowie September und Oktober.

Für **2015** zeigt die Clusteranalyse eine deutliche saisonale Gruppierung der Proben (Abbildung 85). Die oberste Verzweigung des Dendrogrammes teilt die Proben in die Jahresabschnitte März bis Juni und Juli bis September auf. Für die Monate Juni bis September treten die Proben aller drei Probenahmestellen in der Hauptsperre jeweils in einem Cluster auf. Während die Proben aus der Vorsperre Forchheim von März bis Juni noch ein separates Cluster bilden, werden die entsprechenden Proben aus den Monaten Juli bis September deutlich näher zu den jeweils zeitgleichen Proben aus der Hauptsperre zugeordnet. Dies könnte auf eine Verdriftung von Arten in Fließrichtung aus der Vorsperre in die stromabwärts gelegenen Talsperrenkompartimente im Jahresverlauf hindeuten. Im März bilden die beiden Proben in Fließrichtung oberhalb der Unterwasserstaumauer S und E noch ein separates Cluster, während spätere Proben dieser

3 Ergebnisse

Stellen (April und Mai) mit entsprechenden Proben von unterhalb der Unterwasserstaumauer (H) der Monate März bis Mai clustern. Auch hierfür könnte der Grund im Transport von Arten in Fließrichtung liegen. Die Untersuchung verschiedener Tiefenbereiche an der Probenahmestelle vor der Hauptstaumauer zeigte, dass häufig die Proben aus dem Epilimnion (2m) und dem Metalimnion eines Probenahmezeitpunktes in einem gemeinsamen Cluster auftreten (Mai, August, September). Die Metalimnion-Probe von Juli bildet dagegen ein Cluster mit der entsprechenden Hypolimnion-Probe, während im August und September die beiden Proben aus dem Hypolimnion ein separates Cluster bilden. Möglicherweise entwickelt sich die bakterielle Gemeinschaft im Hypolimnion mit längerandauernder thermischer Schichtung zunehmend unabhängig von den oberen Wasserschichten.

3 Ergebnisse

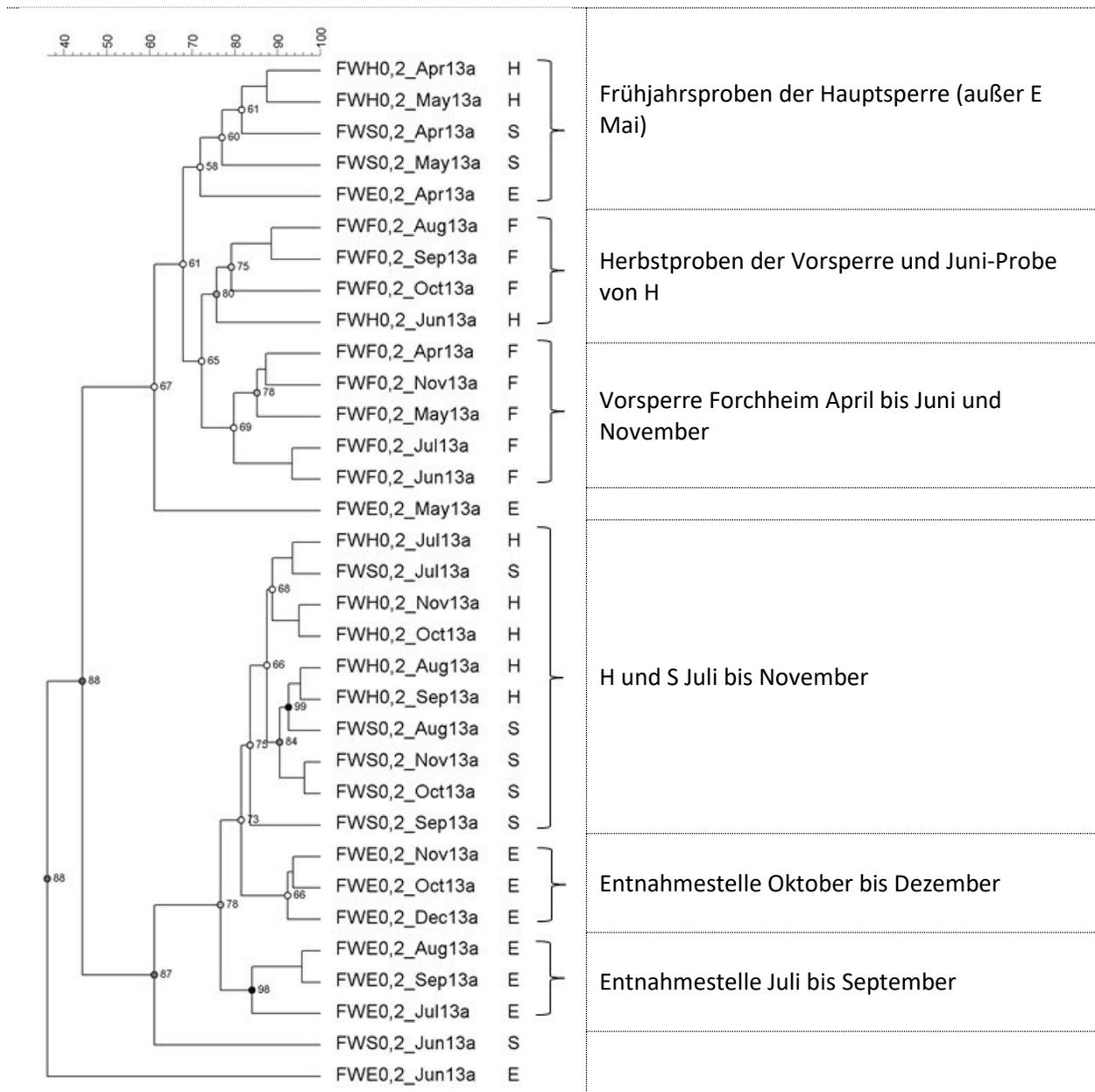


Abbildung 83: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion <5µm der Proben von 2013; Ähnlichkeitskoeffizienten der DGGE-Profile nach Pearson, Clusterbildung nach UPGMA

3 Ergebnisse

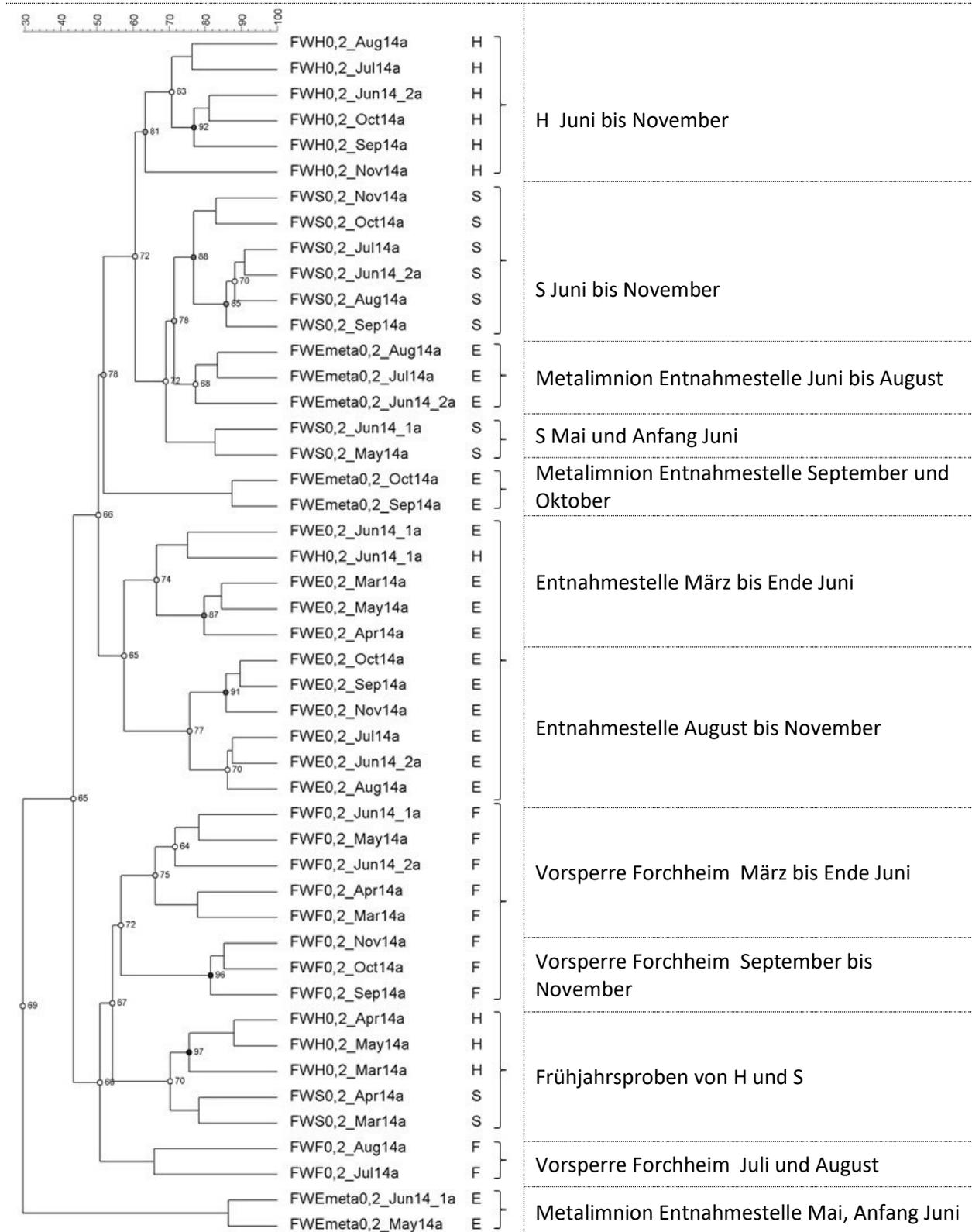


Abbildung 84: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion <5µm der Proben von 2014; Ähnlichkeitskoeffizienten der DGGE-Profile nach Pearson, Clusterbildung nach UPGMA

3 Ergebnisse

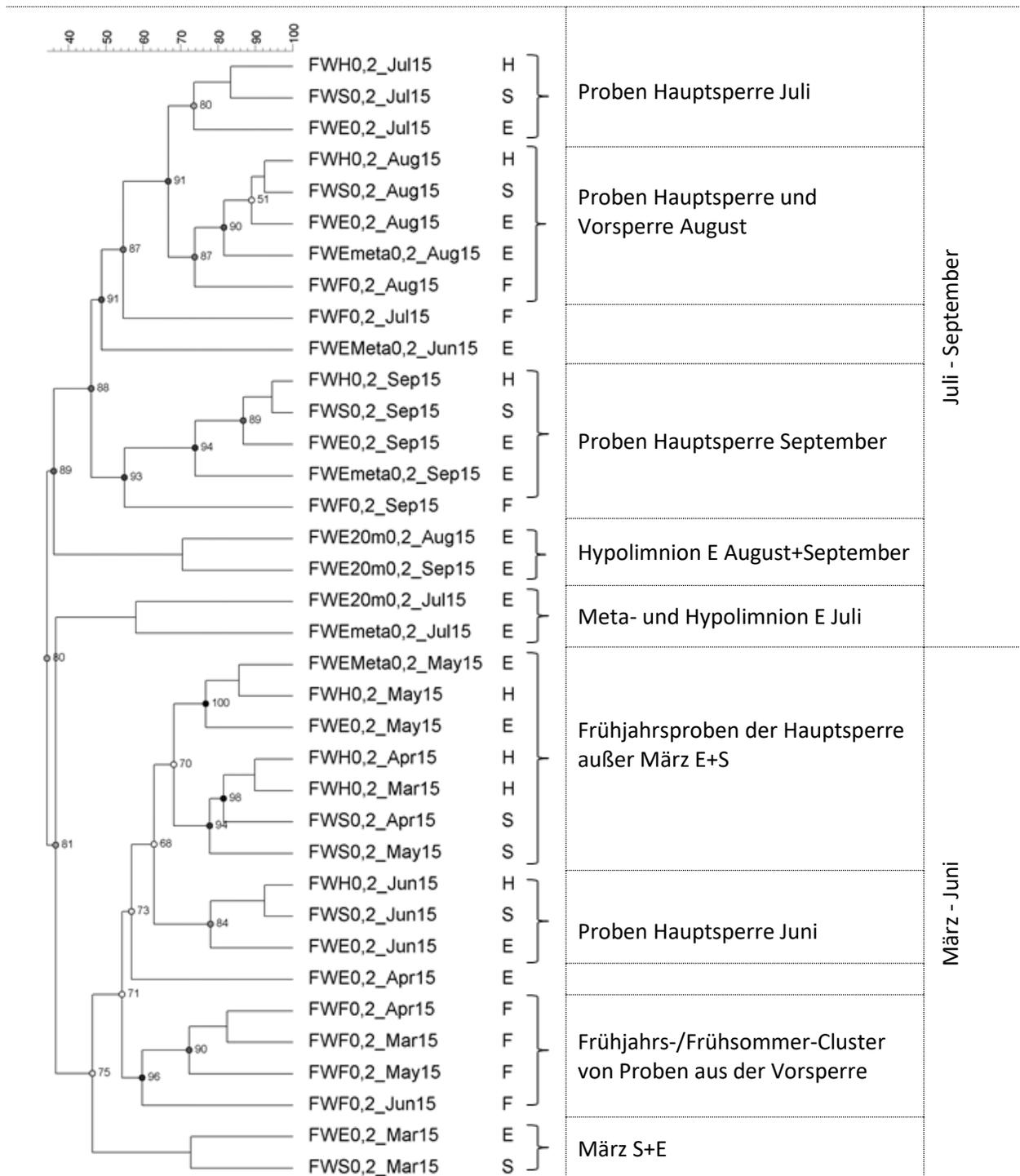


Abbildung 85: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Größenfraktion <5µm der Proben von 2015; Ähnlichkeitskoeffizienten der DGGE-Profile nach Pearson, Clusterbildung nach UPGMA

3 Ergebnisse

Die mikrobielle Gemeinschaft der Proben $> 5 \mu\text{m}$ zeigt eine deutlichere saisonale Gruppierung als die der Fraktion $< 5 \mu\text{m}$. Die ist höchstwahrscheinlich bedingt durch die ausgeprägte Saisonalität der eukaryotischen Algen, die Bestandteil der Fraktion sind, aber auch die der assoziiert lebenden Bakterien. Die Clusteranalyse beider Größenfraktionen deutet drauf hin, dass eine Verdriftung von Arten aus der Vorsperre in die Hauptsperre hin stattfindet, sodass häufig die Proben eines Zeitraumes der in Fließrichtung nacheinander liegenden Untersuchungsstellen F und H sowie S und E gemeinsame Cluster bilden. Die Phytoplanktondynamik spielt auch dafür vermutlich eine entscheidende Rolle, wie der Vergleich mit der Messungen des Gesamtchlorophylls zeigt: 2014 war die Chlorophyllentwicklung ähnlich zwischen den Stellen F und H, sowie zwischen S und E, die DGGE-Profile ($> 5 \mu\text{m}$) zeigen den gleichen Trend. 2015 wurden die Chlorophyllmaxima bei S und E im Frühjahr erreicht, bei H und F jedoch im Sommer, die DGGE-Profile zeigen ähnliche Zusammenhänge zwischen den Proben. 2013 dagegen zeigten die Bandenmuster der DGGE-Profile $> 5 \mu\text{m}$ mehr Gemeinsamkeiten aller drei Probenahmestellen der Hauptsperre (H, S, E) im Unterschied zu denen der Vorsperre. Die Chlorophyllentwicklung zeigte für dieses Jahr ein Sommermaximum an allen vier Untersuchungsstellen und in der Vorsperre darüber hinaus eine starke Entwicklung im September.

Die Ergebnisse zeigen einen Einfluss der Populationsentwicklung in der Vorsperre auf weiter stromabwärts gelegene Probenahmestellen der Hauptsperre. Damit findet in der Vorsperre nicht nur eine Nährstoffelimination durch Phytoplanktonwachstum und –sedimentation statt, sondern die sich dort entwickelnde Phytoplankton- und Bakteriengemeinschaft ist auch relevant für die Struktur der Algen- und Mikrobenpopulation in der Hauptsperre und somit für die Bewirtschaftung der Talsperre.

Darüber hinaus kann die Clusteranalyse der Profile einer Probenahmestelle aller drei untersuchten Jahre Hinweise auf die längerfristige Stabilität der mikrobiellen Gemeinschaft geben. So kann z.B. beantwortet werden, ob es wiederkehrende ähnliche Profile zu bestimmten Jahreszeiten an den Untersuchungsstellen gibt oder ob sich eher jedes Jahr eine neue bakterielle Gemeinschaft einstellt. Diese Fragestellungen wurden mithilfe der Clusteranalyse aller Proben aus 2 m Wassertiefe der Entnahmestelle untersucht (Abbildung 86). Die Proben der Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$ des Jahres 2013 treten kaum gemeinsam mit Proben anderer Jahre in einem Cluster auf. Für dieses Jahr bestanden deutliche meteorologisch bedingte Unterschiede zu 2014 und 2015. 2013 war aufgrund der langanhaltenden Eisbedeckung gefolgt von einer schnellen Erwärmung des Wasserkörpers die Frühjahrzirkulation mit ca. 14 Tagen stark verkürzt und fand ca. einen Monat früher statt als in den anderen beiden Jahren. Anfang Juni 2013 trat zudem ein Starkregenereignis auf. Für 2013 bilden nur die Proben des Monats Juni ein Cluster mit denen von Mai und Juni der Jahre 2014 und 2015, darüber hinaus wurden die Proben von November und Dezember 2013 in

3 Ergebnisse

ein gemeinsames Cluster mit August 2015 eingeordnet. Die Phytoplanktonanalyse der Proben erklärt die Ähnlichkeiten zwischen den Proben der unterschiedlichen Jahreszeiten nicht, im August 2015 dominierten *Fragilaria crotonensis*, *Chrysochromulina parva* sowie *Aphanothece sp.* und *Cyanodictyon sp.*, im Nov 2013 hingegen traten *Aulacoseira subarctica*, *Tychonema* und *Woronichinia naegeliana* auf. Zur Ähnlichkeit zwischen der Novemberprobe 2014 und den Frühjahrsproben der Jahre 2014 und 2015 trägt vermutlich eine für November untypische Entwicklung von *Aulacoseira subarctica* bei, die auch dominant zur Frühjahrsentwicklung auftritt. Häufiger treten gemeinsame saisonale Cluster der Jahre 2014 und 2015 auf: Dies gilt z.B. für die Frühjahrsproben (März und April) der beiden Jahre sowie die Frühsommerproben (Mai und Juni). In der Größenfraktion $< 5 \mu\text{m}$ unterscheiden sich die Proben von 2013 nicht so deutlich von denen der anderen Jahre, es gibt z.B. ein Sommer- und Herbst-Cluster mit Proben aller drei Jahre. Während die Frühjahrsproben der Fraktion $>5\mu\text{m}$ von 2014 und 2015 in ein gemeinsames Cluster geordnet wurden, bilden die entsprechenden Proben der Fraktion $< 5 \mu\text{m}$ jeweils jahresweise separate Cluster. Für 2013 und 2015 fallen jeweils nur die ersten drei Monate der Saison in dieses Cluster und die übrigen Proben des jeweiligen Jahres sind davon deutlich abgesetzt. Für 2014 tritt die Mehrheit der Proben in einem gemeinsamen Cluster auf, innerhalb dessen zwischen den Proben von März bis Anfang Juni sowie Ende Juni bis August starke Ähnlichkeiten bestehen.

Saisonale Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Proben der verschiedenen Jahre sind für die beiden Größenfraktionen deutlich verschieden. Dies ist besonders auffällig für die Frühjahrsmonate, in denen stärkere jahresübergreifende Bezüge für die Größenfraktion $>5 \mu\text{m}$ bestehen, was eventuell durch die wiederkehrende Dominanz bestimmter Diatomeen-Arten zur Frühjahrsmassenentwicklung zu erklären ist. Darüber hinaus zeigte die Clusteranalyse nur teilweise jahresübergreifend Ähnlichkeiten zwischen den Proben, abschließend kann diese Fragestellung jedoch anhand des begrenzten Untersuchungszeitraum von drei Jahren die zudem deutliche meteorologische Unterschiede aufwiesen (extrem später Eisauflauf 2013, keine Eisbedeckung Winter 2013/2014, Sommerhochwasser Juni 2013, außergewöhnlich trockenes Frühjahr 2015) nicht beantwortet werden. Dadurch konnte nicht ermittelt werden, ob bei ähnlichen Ausgangsbedingungen ähnliche Populationszusammensetzungen auftreten.

3 Ergebnisse

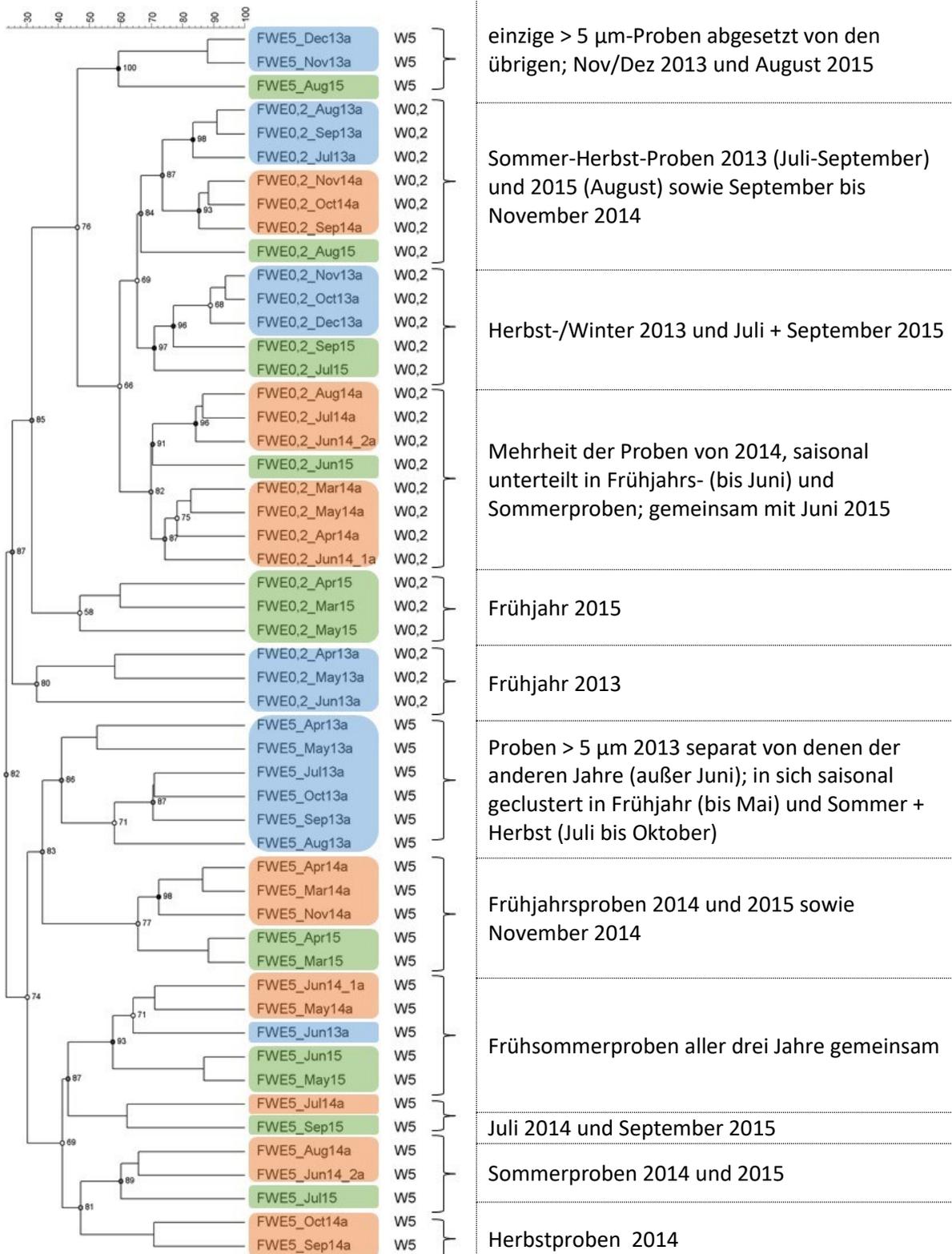


Abbildung 86: Ergebnisse der Clusteranalyse auf Grundlage der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität für die Proben aus 2 m Wassertiefe der Entnahmestelle von April 2013 bis September 2015; Ähnlichkeitskoeffizienten der DGGE-Profile nach Pearson, Clusterbildung nach UPGMA

3 Ergebnisse

Die Clusteranalysen der DGGE-Profile der anderen Untersuchungsstellen zeigen ähnliche saisonale Trends wie die der Entnahmestelle (s. Anlage A3). Für die Proben aus der Vorsperre wurden häufiger Cluster gebildet, die Proben der verschiedenen Größenfraktionen enthalten, in Fließrichtung nimmt die Anzahl dieser Proben deutlich ab. Möglicherweise zeigt dies, dass die Gemeinschaft der frei lebenden Bakterien in der Vorsperre mehr variiert als im Hauptbecken der Talsperre und größere Ähnlichkeiten zu den partikelassoziierten Bakterien bestehen.

Für einzelne Proben wurden an der Entnahmestelle die DGGE-Profile aus Epi-Meta- und Hypolimnion verglichen. Wie Abbildung 87 zeigt, bestehen für beide Größenfraktionen starke Ähnlichkeiten in der bakteriellen Gemeinschaft der unterschiedlichen Zonen im geschichteten Gewässer, die Profile eines Probenahmezeitpunktes weisen viele gemeinsame Banden auf, die sich jedoch z.T. in ihrer Intensität unterscheiden. Im August zeigen die Profile aus dem Hypolimnion für beide Größenfraktionen stärkere Unterschiede zu denen aus Epi- und Metalimnion.

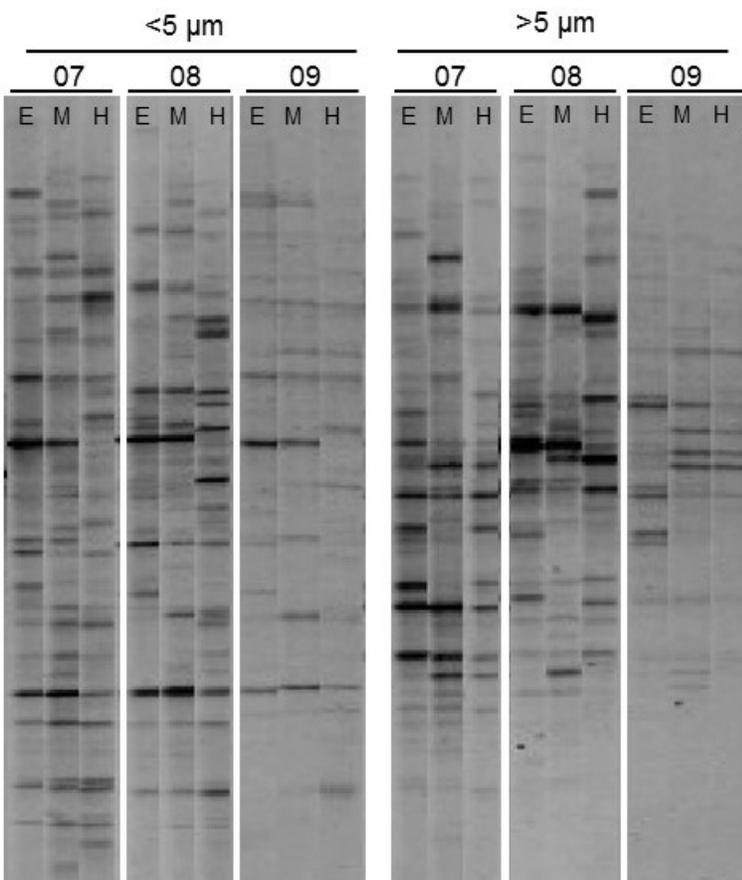


Abbildung 87: DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaft an der Entnahmestelle im Jahr 2015; E=Epilimnion (2m), M=Metalimnion (Juli: 9,5m; August: 10,5m; September: 11,5m), H=Hypolimnion (20m)

3 Ergebnisse

3.7.2.2 NMDS und Einfluss von Umweltparametern

Für die Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$ zeigt die Auftragung der Proben in der NMDS nach Probenahmestellen, dass sich in den Jahren 2013 und 2014 die Proben aus der Vorsperre Forchheim von denen der Probenahmestellen in der Hauptsperre separieren (Abbildung 88 A, C). Für das Jahr 2015 gilt dies jedoch nicht (Abbildung 88 E). 2014 bilden die Proben der beiden stromaufwärts der Unterwasserstaumauer gelegenen Probenahmestellen E und S zumeist eine gemeinsame Punktwolke, während die Proben der Stelle H in der NMDS davon abgesetzt und näher zu denen der Vorsperre platziert wurden. 2013 dagegen liegt ein Großteil der Proben der Entnahmestelle abgesetzt von den Proben der beiden anderen Probenahmestellen der Hauptsperre. 2015 unterscheidet sich die Verteilung deutlich von den anderen beiden Jahren, es ist kein Muster in der Auftragung nach Probenahmestellen erkennbar (Abbildung 88 E), dafür zeigt die Auftragung nach Probenahmezeitpunkten ein deutliches saisonales Muster (Abbildung 88 F). Auch 2014 ist eine saisonale Auftrennung zwischen den meisten Frühjahrs- und Frühsommerproben und den Proben der Sommer- und Herbstmonate erkennbar (Abbildung 88 D).

3 Ergebnisse

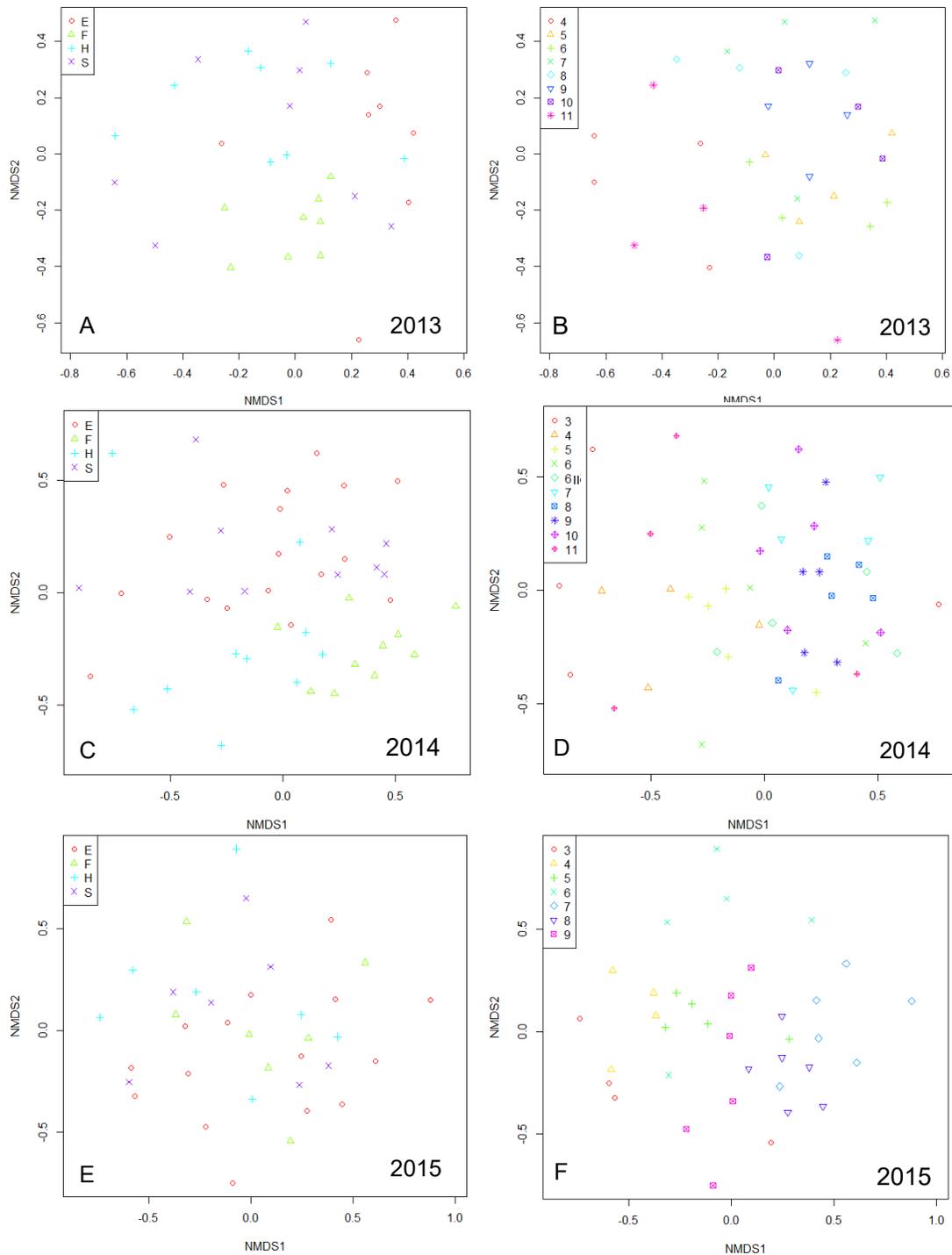


Abbildung 88: NMDS auf Grundlage der normalisierten DGGE-Profile der bakteriellen Diversität der Proben 2013 bis 2015, Größenklasse >5µm; 3-11= Monate März bis November

Die Korrelation der Bandenmuster mit chemischen, physikalischen und meteorologischen Daten zeigte für die einzelnen Jahre sowohl Gemeinsamkeiten als auch deutliche Unterschiede (Tabelle 27). Unter den chemischen Parametern hatte die Ammonium-Konzentration in allen Jahren signifikanten Einfluss ($p < 0,05$). Die Orthophosphatkonzentration korrelierte 2013 deutlich mit dem Bandenmuster ($p < 0,01$),

3 Ergebnisse

was 2014 auf die Chloridkonzentration zutraf, 2015 hingegen auf die Konzentrationen an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC) und gelöstem Gesamtkohlenstoff (DTC). 2013 zeigten sich darüber hinaus statistische Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen an Nitrat und DOC ($p < 0,05$), sowie für Sulfat im Jahr 2015. Für die Proben des Jahres 2014 ergab die Analyse die deutlichsten statistischen Zusammenhänge zwischen den DGGE-Profilen und physikalischen Parametern wie Sauerstoffkonzentration, Wassertemperatur und Sichttiefe sowie der Chlorophyll-a-Konzentration ($p < 0,01$). Für die Jahre 2013 und 2015 zeigten sich ebenfalls Korrelationen der DGGE-Profile zu Sauerstoffkonzentration und Wassertemperatur, während die Sichttiefe nur im Jahr 2013 einen deutlichen Zusammenhang aufwies. Der pH-Wert zeigte nur zu den DGGE-Profilen der Proben von 2013 einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0,05$). Unter den meteorologischen Parametern, wie die Tagesmittelwerte bzw. -summen für die 5 bzw. 10 Tage vor der jeweiligen Probenahme, zeigten die Mittelwerte der Boden- und Lufttemperatur in den Jahren 2014 und 2015 einen deutlichen Zusammenhang zu den DGGE-Bandenmustern ($p < 0,01$). 2015 war darüber hinaus die Globalstrahlung ein wesentlicher Einflussfaktor, wozu eventuell die außergewöhnlich trockenen Monate März und Mai beitragen. Während die Niederschlagssummen vor den jeweiligen Probenahmen 2014 und 2015 keinen Zusammenhang zu den DGGE-Profilen zeigten, ergab sich für diesen Parameter 2013 ein signifikanter Einfluss ($p < 0,05$), was auf Auswirkungen der Starkniederschläge im Juni dieses Jahres hindeuten kann.

3 Ergebnisse

Tabelle 27: Korrelation der Umweltparameter mit den DGGE-Profilen der bakteriellen Diversität
Größenfraktion >5µm 2013 bis 2015

		2013 >5µm					2014 >5µm					2015 >5µm				
		NMDS1	NMDS2	r2	Pr(>r)		NMDS1	NMDS2	r2	Pr(>r)		NMDS1	NMDS2	r2	Pr(>r)	
chemische Parameter	NH4-N	-0.624	-0.782	0.249	0.04	*	0.773	-0.634	0.132	0.03	*	0.914	-0.405	0.313	0.02	*
	o-PO4-P	-0.997	-0.078	0.652	0.01	**	-0.581	-0.814	0.087	0.13		0.901	-0.434	0.063	0.44	
	CL-	-0.884	0.467	0.032	0.74		-0.814	0.580	0.444	0.01	**	-0.792	0.611	0.201	0.06	.
	SO4_S	-0.267	-0.964	0.213	0.12		-0.983	0.184	0.098	0.1	.	-0.184	0.983	0.323	0.03	*
	NO3_N	-0.624	-0.782	0.278	0.04	*	-0.894	0.448	0.078	0.21		-0.877	0.481	0.230	0.06	.
	Acetat	-0.445	-0.895	0.161	0.14		-0.593	-0.806	0.065	0.24		-0.298	-0.955	0.123	0.17	
	Mn_AAS	0.994	0.110	0.124	0.27		-0.092	-0.996	0.038	0.38		-0.255	0.967	0.057	0.39	
	Fe_AAS	0.622	-0.783	0.073	0.39		0.866	0.500	0.048	0.38		-0.864	-0.503	0.063	0.41	
	DIC	-0.706	-0.708	0.125	0.26		0.117	0.993	0.019	0.77		-0.011	-1.000	0.031	0.64	
	DOC	-0.963	-0.271	0.280	0.03	*	0.253	-0.967	0.063	0.24		0.631	-0.776	0.261	0.01	**
	DTC	-0.897	-0.442	0.211	0.09	.	0.495	-0.869	0.016	0.7		0.526	-0.851	0.327	0.01	**
physikalische Parameter	Sauerstoff (mg/l)	-0.907	-0.422	0.325	0.02	*	-0.678	-0.735	0.268	0.01	**	-0.997	-0.076	0.265	0.03	*
	Sauerstoff (%)	-0.814	0.581	0.069	0.45		-0.368	-0.930	0.133	0.06	.	0.286	0.958	0.043	0.56	
	pH	0.095	0.995	0.383	0.02	*	-0.942	-0.337	0.017	0.67		0.723	0.691	0.093	0.24	
	Leitfähigkeit	-0.942	0.335	0.078	0.43		-0.274	0.962	0.120	0.12		-0.872	0.489	0.080	0.41	
	Wassertemperatur	0.564	0.826	0.426	0.02	*	0.989	0.150	0.234	0.01	**	0.931	0.366	0.669	0.01	**
	Chlorophyll a	0.023	-1.000	0.138	0.29		0.401	-0.916	0.187	0.01	**	-0.422	-0.906	0.054	0.53	
	Sichttiefe	0.082	0.997	0.478	0.01	**	-0.240	0.971	0.484	0.01	**	0.986	0.166	0.166	0.06	.
meteorologische Parameter	10-Tages-Mittel Lufttemperatur	0.117	0.993	0.063	0.5		0.922	0.388	0.314	0.01	**	0.993	0.116	0.570	0.01	**
	10-Tages-Mittel Bodentemperatur	0.670	0.742	0.260	0.06	.	0.967	0.255	0.348	0.01	**	0.998	0.071	0.534	0.01	**
	10-Tages-Summe Niederschlag	0.769	-0.639	0.229	0.05	*	0.995	0.103	0.075	0.16		0.558	-0.830	0.041	0.59	
	10-Tages-Mittel Globalstrahlung	-0.332	0.943	0.020	0.82		0.998	0.060	0.042	0.33		0.812	0.584	0.431	0.01	**
	5-Tages-Mittel Lufttemperatur	0.011	1.000	0.061	0.46		0.947	0.322	0.341	0.01	**	0.955	0.298	0.484	0.01	**
	5-Tages-Mittel Bodentemperatur	0.606	0.796	0.190	0.11		0.971	0.238	0.357	0.01	**	0.990	0.138	0.557	0.01	**
	5-Tages-Summe Niederschlag	0.826	-0.563	0.265	0.03	*	0.970	0.241	0.114	0.07	.	0.637	-0.771	0.056	0.53	
	5-Tages-Mittel Globalstrahlung	-0.384	0.923	0.019	0.85		0.988	-0.157	0.028	0.5		0.725	0.689	0.418	0.01	**

*** = p-Value ≤ 0.001 ** = p-Value ≤ 0.01 * = p-Value ≤ 0.05 . = p-Value ≤ 0.1

Abbildung 89 zeigt beispielhaft die Wirkrichtung ausgewählter Umweltparameter für die mikrobielle Gemeinschaft von Proben der Größenfraktion > 5µm.

3 Ergebnisse

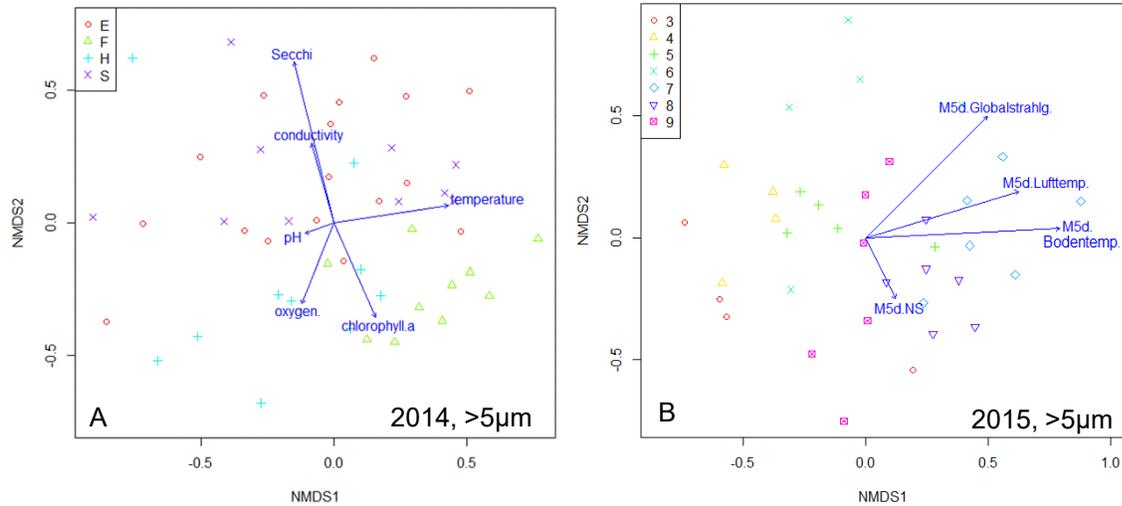


Abbildung 89: Projektion der Umweltparameter (vector fitting) in die Plots der NMDS der DGGE-Profile der bakteriellen Diversität: M5d: 5-Tagesmittel vor der jeweiligen Probenahme

Für die DGGE-Profile der frei lebenden Bakterien $< 5 \mu\text{m}$ ergab die NMDS grundsätzlich ähnliche Trends wie für die Proben $> 5 \mu\text{m}$: In den Jahren 2013 und 2014 separiert die NMDS die Proben aus der Vorsperre von denen aus der Hauptsperre, eine saisonale Clusterbildung ist nicht ausgeprägt erkennbar (Abbildung 90 A-D). Innerhalb der Proben der Hauptsperre bilden 2013 die DGGE-Profile der Probenahmestellen H und S ein Cluster, während die Proben von der Entnahmestelle davon abgesetzt sind. 2014 dagegen liegen die Proben der Stelle H zwischen denen aus der Vorsperre und den meisten Proben der Stellen S und E. Eine Ausnahme bilden Proben der Entnahmestelle aus dem Tiefenbereich des Metalimnions, die abgesetzt von den anderen Proben dieser Stelle im unteren Bereich des NMDS-Plots platziert wurden (Abbildung 90 C). 2015 zeigt sich ähnlich wie für die Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$ eher eine saisonale Auftrennung der Proben in ein Frühjahrs- und Frühsommer-Cluster abgesetzt von den Proben der späteren Monate (Abbildung 90 F). Die Auftrennung nach Probenahmestellen, auch die Abgrenzung der Vorsperrenproben, ist nur noch vereinzelt erkennbar (Abbildung 90 E).

3 Ergebnisse

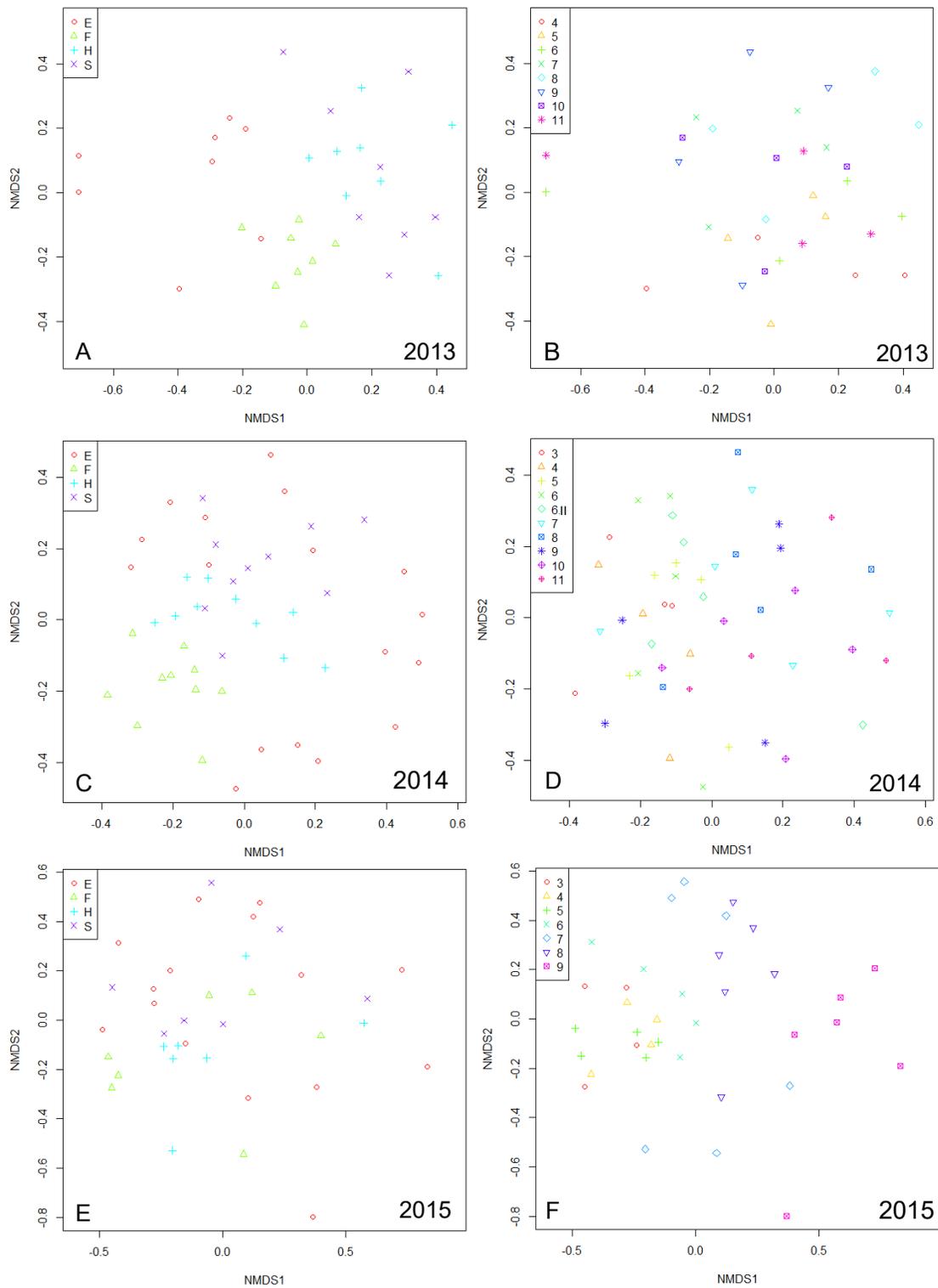


Abbildung 90: NMDS auf Grundlage der DGGE-Profile der Proben 2013 bis 2015, Größenklasse <5µm

3 Ergebnisse

Als Umweltparameter mit signifikanter Korrelation zu den Bandenmustern ergab die statistische Analyse vor allem physikalische Parameter für die Proben des Jahres 2014. 2015 spielten deutlich ausgeprägt meteorologische Parameter eine Rolle sowie einige physikalische Parameter, während 2013 nur einzelne chemische Parameter einen statistischen Zusammenhang zu den DGGE-Profilen zeigten (Tabelle 28).

Tabelle 28: Korrelation der Umweltparameter mit den DGGE-Profilen der bakteriellen Diversität Größenfraktion <5µm 2013 bis 2015

		2013 <5µm				2014 <5µm				2015 <5µm				
		NMDS1	NMDS2	r2	Pr(>r)	NMDS1	NMDS2	r2	Pr(>r)	NMDS1	NMDS2	r2	Pr(>r)	
chemische Parameter	NH4-N	0.092	-0.996	0.068	0.44	-0.605	-0.796	0.092	0.18	0.703	-0.711	0.357	0.02	*
	o-PO4-P	0.845	-0.535	0.256	0.02	* 0.578	-0.816	0.018	0.73	-0.267	-0.964	0.093	0.22	
	CL-	0.635	-0.772	0.042	0.66	0.527	0.850	0.158	0.02	* -0.984	0.179	0.027	0.67	
	SO4_S	-0.059	-0.998	0.345	0.04	* -0.821	-0.570	0.036	0.43	-0.689	0.725	0.005	0.92	
	NO3_N	0.276	-0.961	0.396	0.02	* -0.547	-0.837	0.170	0.03	* -0.638	-0.770	0.530	0.01	**
	Acetat	0.408	-0.913	0.102	0.37	-0.807	-0.591	0.084	0.14	-0.383	0.924	0.065	0.46	
	Mn_AAS	-0.700	0.714	0.218	0.06	. -0.976	-0.219	0.030	0.51	-0.688	0.726	0.200	0.07	.
	Fe_AAS	-0.984	0.178	0.106	0.33	0.979	0.204	0.034	0.5	-0.490	0.872	0.119	0.16	
	DIC	0.656	-0.755	0.006	0.92	0.993	-0.114	0.272	0.01	** 0.764	0.646	0.237	0.04	*
	DOC	0.894	-0.448	0.007	0.9	-0.733	0.680	0.073	0.25	0.845	-0.535	0.003	0.98	
	DTC	0.808	-0.589	0.007	0.87	0.837	0.547	0.037	0.51	0.855	0.518	0.138	0.17	
physikalische Parameter	Sauerstoff (mg/l)	0.234	-0.972	0.241	0.08	. -0.979	0.202	0.406	0.01	** -0.965	0.264	0.517	0.01	**
	Sauerstoff (%)	0.718	-0.696	0.005	0.97	-0.897	0.442	0.324	0.01	** -0.482	0.876	0.291	0.02	*
	pH	0.349	0.937	0.253	0.02	* -0.303	0.953	0.209	0.01	** -0.232	0.973	0.380	0.01	**
	Leitfähigkeit	0.897	-0.443	0.074	0.46	0.998	0.068	0.319	0.01	** -0.504	0.864	0.053	0.47	
	Wassertemperatur	-0.103	0.995	0.376	0.03	* 0.557	0.831	0.117	0.07	. 0.486	0.874	0.434	0.01	**
	Chlorophyll a	0.017	-1.000	0.074	0.51	-0.951	-0.309	0.250	0.01	** -0.820	0.572	0.017	0.75	
	Sichttiefe	-0.334	0.943	0.364	0.01	** 0.942	0.336	0.413	0.01	** 0.461	0.887	0.372	0.01	**
meteorologische Parameter	10-Tages-Mittel Lufttemperatur	0.061	0.998	0.049	0.58	0.962	0.271	0.088	0.14	0.517	0.856	0.539	0.01	**
	10-Tages-Mittel Bodentemperatur	-0.158	0.987	0.235	0.07	. 0.924	0.383	0.113	0.12	0.691	0.723	0.642	0.01	**
	10-Tages-Summe Niederschlag	-0.562	-0.827	0.033	0.71	-0.996	-0.089	0.008	0.81	0.659	-0.752	0.561	0.01	**
	10-Tages-Mittel Globalstrahlung	0.824	-0.566	0.004	0.97	-0.526	0.851	0.051	0.42	-0.054	0.999	0.192	0.06	.
	5-Tages-Mittel Lufttemperatur	0.350	0.937	0.042	0.62	0.976	0.219	0.111	0.07	. 0.183	0.983	0.365	0.01	**
	5-Tages-Mittel Bodentemperatur	-0.109	0.994	0.163	0.15	0.926	0.378	0.114	0.12	0.554	0.833	0.563	0.01	**
	5-Tages-Summe Niederschlag	-0.375	-0.927	0.025	0.78	0.917	-0.400	0.005	0.91	0.770	-0.638	0.665	0.01	**
	5-Tages-Mittel Globalstrahlung	0.780	-0.625	0.007	0.94	-0.755	0.656	0.069	0.33	0.725	0.689	0.418	0.01	**

*** = p-Value ≤ 0.001 ** = p-Value ≤ 0.01 * = p-Value ≤ 0.05 . = p-Value ≤ 0.1

3 Ergebnisse

Tabelle 29: Taxonomische Zuordnung der in Abbildung 91 markierten DGGE-Signale nach Datenbankabgleich mit rdp bzw SILVA; alle nach rdp als SAR11 / *C. Pelagibacter* identifizierten Sequenzen entsprechen nach SILVA-Klassifizierung SAR11 / clade III

Bande	taxonomische Zuordnung		Datenbank
	Subphylum	Ordnung - Gattung	
20	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
21	A.	Caulobacterales;Caulobacteraceae;Caulobacter [98%]	SILVA
22	A.	Caulobacterales;Hyphomonadaceae [97%]	SILVA
23	A.	Caulobacterales;Hyphomonadaceae;Hirschia [95%]	SILVA
24	A.	Caulobacterales;Caulobacteraceae;Brevundimonas [99%]	SILVA
25	D.	Deltaproteobacteria;Myxococcales;Sandaracinaceae;Sandaracinus [88%]	SILVA
27	A.	Rhodospirillales [95%]	rdp
28	A.	Alphaproteobacteria [95%]	SILVA
29	-	(Sequenz stark überlagert, nicht auswertbar)	
30	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
31	-	Bacteria [78%]	SILVA
32	A.	Caulobacterales;Hyphomonadaceae;Hirschia [91%]	SILVA
33	A.	Rhodospirillales [94%]	rdp
34	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp

Gemäß Datenbankabgleich erfasst der Primer A688 die Vertreter der Hauptgruppen der pelagischen *Alphaproteobacteria* zu > 97 % mit Ausnahme der *Rhodospirillales* (90 %) und *Rickettsiales* (22 %) sowie Vertreter der *Deltaproteobacteria* (s. Kapitel 3.5.2 Datenbankabgleich sequenzgleiche CARD FISH – Sonde A688). Die Sequenzierung der aus dem Gel ausgeschnittenen DGGE-Signale bestätigt dies, alle auswertbaren Sequenzen mit über 90% Zuordnung zählten zu den *Alphaproteobacteria*, einer der Klone wurde als Vertreter der *Deltaproteobacteria* identifiziert.

Für die Klonierung zweier ausgewählter Proben wurde der Primer A688R in Kombination mit dem für Primer TPU1 (16S rDNA *Bacteria*) verwendet, um die klonierten DNA-Abschnitte anschließend mit der gleichen DGGE wie die Wasserproben analysieren zu können (Abbildung 92).

3 Ergebnisse

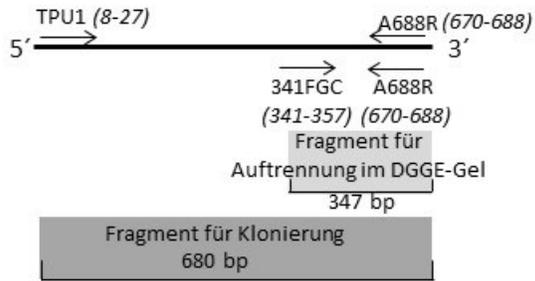


Abbildung 92: Schematische Darstellung der für DGGE und Klonierung der *Alphaproteobacteria* verwendeten Primerkombinationen und resultierender DNA-Fragmente; kursiv: Bindepotion der Primer in der 16S rDNA; bp=Basenpaare

Für die Klonierung wurden beide Größenfraktionen der Probe von August 2014 von der Entnahmestelle (E 08/14) verwendet. Die Auswahl der Klone für die Sequenzierung erfolgte mittels DGGE für das in Abbildung 89 dargestellte Teilfragment des klonierten DNA-Abschnitts. Die Dominanz von *C. Pelagibacter* unter den *Alphaproteobacteria* in Süßwasserökosystemen spiegelte sich auch in einer deutlichen Mehrheit entsprechender Klone wider, während Klone anderer Arten deutlich geringeren Anteil an den 55 untersuchten Klonen hatten. Dementsprechend wurden auch nicht alle erkennbaren Banden der klonierten Probe durch einen Klon abgebildet.

Abbildung 93 zeigt die DGGE-Signale der der Probe August 2014 (Entnahmestelle, Größenfraktion < 5µm) sowie der aus der Klonierung dieser Probe gewonnenen Abschnitte der 16S rDNA. Die jeweilige taxonomische Zuordnung ist Tabelle 30 zu entnehmen.

3 Ergebnisse

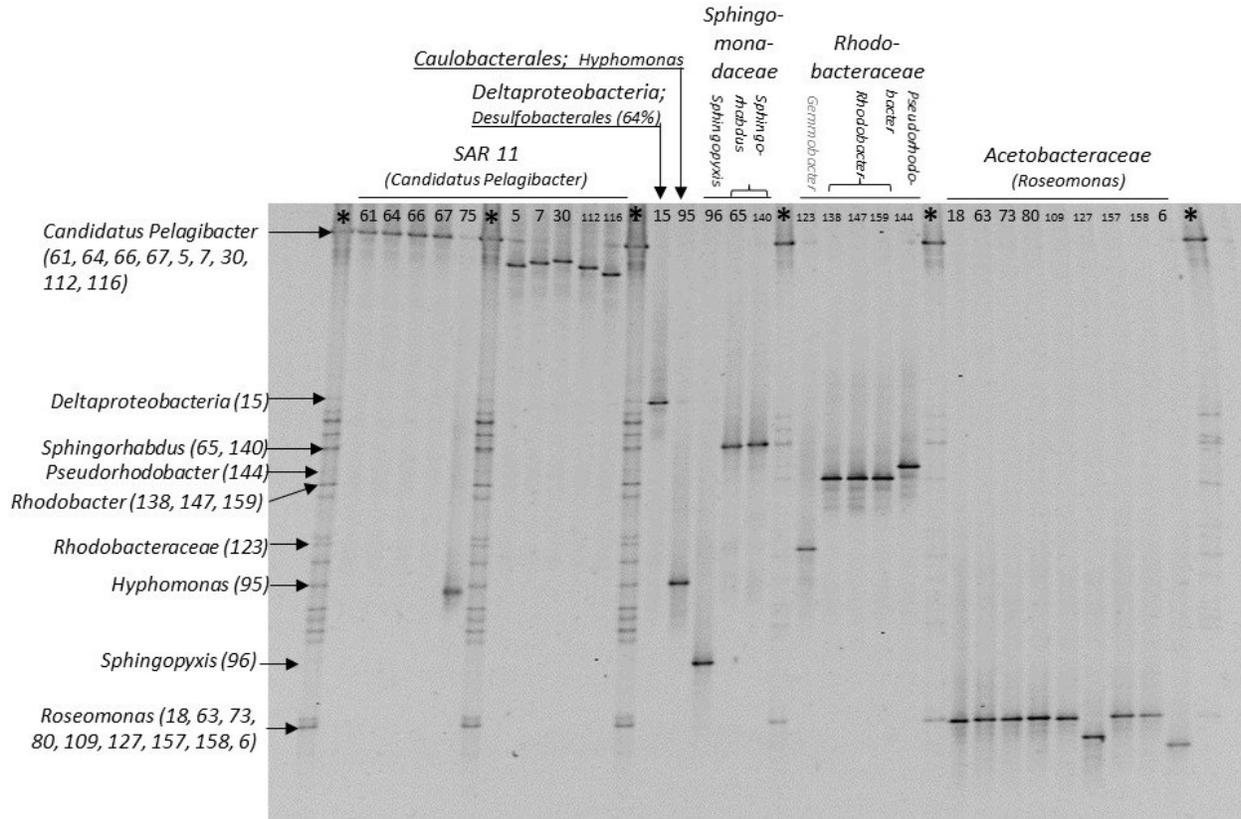


Abbildung 93: DGGE-Profil und klonierte DNA-Fragmente für Alpha- und Deltaproteobacteria der Probe E 08/14 < 5 μm

3 Ergebnisse

Tabelle 30: Taxonomische Einordnung der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Probe E 08/14 < 5 µm nach Datenbankabgleich mit rdp bzw SILVA; alle nach rdp als SAR11 / C. Pelagibacter identifizierten Sequenzen entsprechen nach SILVA-Klassifizierung SAR11 / clade III; A. = Alphaproteobacteria, D = Deltaproteobacteria; Pro. = Proteobacteria

Klon	Subphylum	Ordnung - Gattung	Datenbank
5	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
6	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [99%]	SILVA
7	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [99%]	rdp
15	D.	Bacteria;Proteobacteria;Deltaproteobacteria;SAR324 clade(Marine group B) [86%]	SILVA
18	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [99%]	SILVA
30	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
61	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
63	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [99%]	SILVA
64	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
65	A.	Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Sphingorhabdus [99%]	SILVA
66	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
67	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
73	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [99%]	SILVA
75	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [96%]	rdp
80	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [100%]	SILVA
95	A.	Caulobacterales;Hyphomonadaceae;Hyphomonas [99%]	SILVA
96	A.	Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Sphingopyxis [97%]	SILVA
109	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [99%]	SILVA
112	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
116	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
123	A.	Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Pseudorhodobacter [97%]	rdp
127	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [99%]	SILVA
138	A.	Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Rhodobacter [97%]	SILVA
140	A.	Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Sphingorhabdus [99%]	SILVA
144	-	Unclassified;	SILVA
147	A.	Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Rhodobacter [97%]	SILVA
157	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [99%]	SILVA
158	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [99%]	SILVA
159	A.	Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas [99%]	SILVA

Keine der durch die Klonierung erfassten unterschiedlichen Vertreter der *Alphaproteobacteria* bilden in dieser DGGE Signale auf gleicher Laufhöhe, sodass eine eindeutige Zuordnung der Signale in der klonierten Probe möglich ist. Die Klone von *C. Pelagibacter* zeigen leicht abweichende DGGE-Signale, allen gemeinsam ist aber eine deutlich höhere Bandenposition der Vertreter dieses Clusters gegenüber allen anderen hier erfassten *Alphaproteobacteria*. Diese Bandenpositionen stehen möglicherweise in Zusammenhang mit einem selektionsbedingten (Stickstoff-Mangel) niedrigen genomischen GC-Gehalt für

3 Ergebnisse

marine Linien des SAR11-Clusters, der sich auch noch in den Süßwasserlinien des Clusters erhalten hat [153]. Klon 75 wurde in der Sequenzierung ebenfalls als *C. Pelagibacter* identifiziert. Das DGGE-Signal im oberen Gelbereich ist jedoch nur schwach ausgeprägt, dafür tritt eine zweite Bande deutlich unterhalb der ersten auf. Da die Sequenz keine Überlagerung aufweist, ist vermutlich eine Verunreinigung des DGGE-Amplifikats die Ursache für die untypischen Signale.

Im Gegensatz zu *C. Pelagibacter* treten die DGGE-Signale aller als *Roseomonas* identifizierten Klone am weitesten unten im Gel auf. Der GC-Gehalt der Gattung wird mit 65-71% angegeben [154], was das spätere Aufschmelzen der entsprechenden DNA-Fragmente im Gel erklären kann. Im mittleren Bereich des Gels treten die DGGE-Signale abundanter Vertreter der *Alphaproteobacteria* wie *Rhodobacter*, *Pseudorhodobacter*, *Hyphomonas* und *Sphingomonas* auf. Ebenso wurde ein Vertreter der *Deltaproteobacteria* durch die Klonierung erfasst (Klon 15). Dem DGGE-Signal des Klons 96 (*Sphingopyxis*) konnte aufgrund der geringen Signalintensität in der klonierten Probe keine Bande zugeordnet werden. Für die klonierten Sequenzen aus der Größenfraktion > 5 µm der Probe E 08/14 traten ebenfalls die charakteristischen Signale von *C. Pelagibacter* (Klone 33, 35, 52, 54) weit oben im DGGE-Gel sowie von *Roseomonas* (Klone 34, 46, 50, 56, 57, 61, 63) im unteren Gelbereich auf (Abbildung 94, Tabelle 31). Es wurden mehr Klone mit Signalen im mittleren Bereich des DGGE-Gels gewonnen, wobei für einige unterschiedliche zugeordnete Klone ähnliche Laufhöhen im DGGE-Gel auftraten. Die DGGE-Signale von *Hyphomonas* (Klon 51) und *Porphyrobacter* (Klon 36) liegen nahe beieinander, können aber noch gut getrennt werden. Für die Laufhöhe von Klon 37 (*Rickettsiales*) tritt in der klonierten Probe keine ausreichend starke Bande auf, die eine Zuordnung darin ermöglicht, einem anderen Vertreter der *Rickettsiales* (Klon 58) kann eine schwache Bande in der klonierten Probe zugeordnet werden.

3 Ergebnisse

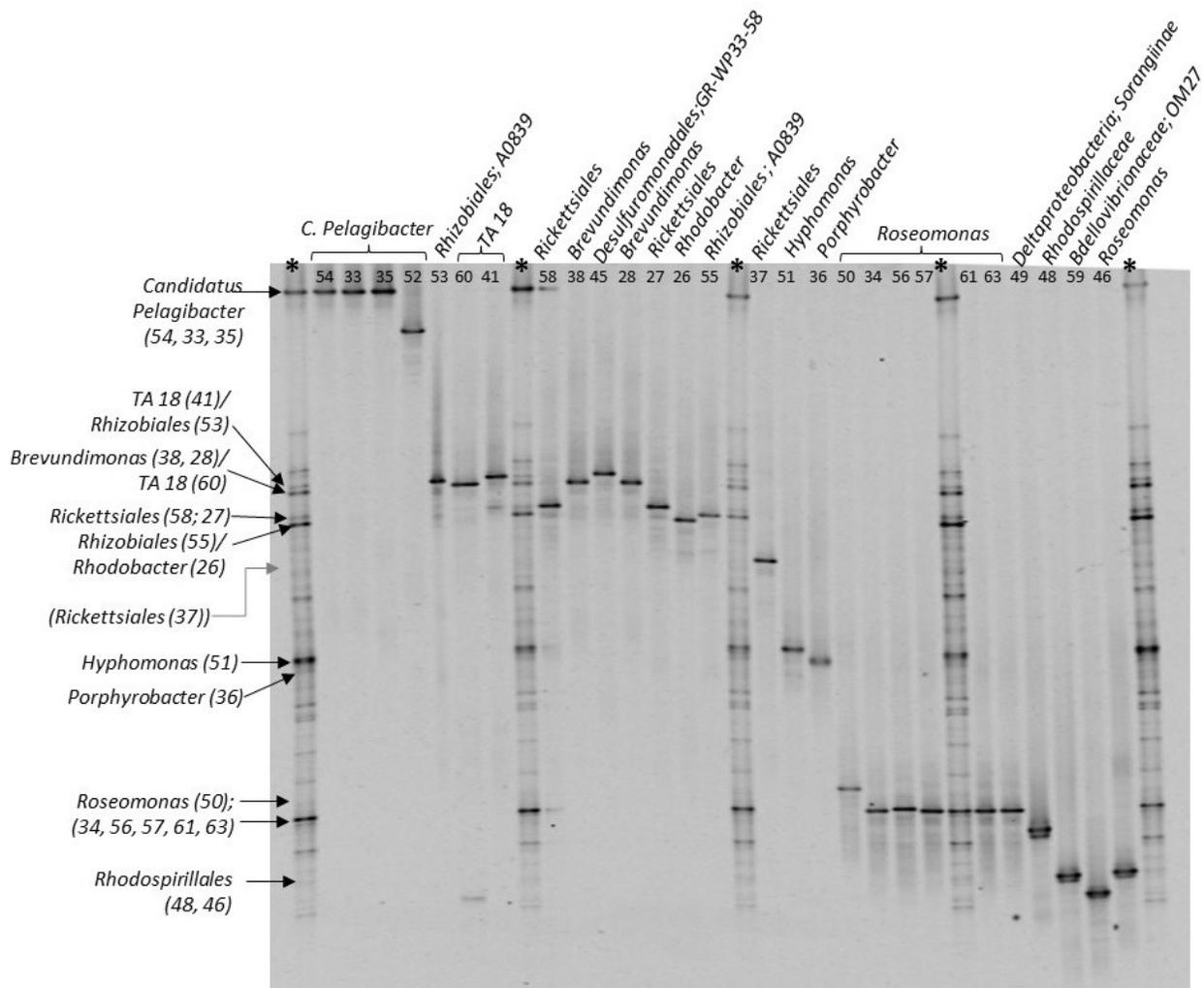


Abbildung 94: DGGE-Profile und klonierte DNA-Fragmente für Alpha- und Deltaproteobacteria der Probe E 08/14 >5 µm

Die nicht als *Alphaproteobacteria* identifizierten Klone 60, 41 und 45 ergeben alle leicht abweichende DGGE-Signale, dennoch wurden die Klone 60 und 41 beide der Klasse TA18 der *Proteobacteria* zugeordnet. Für Klon 45, der als Vertreter der *Desulfuromonadales* (clade A0839), identifiziert wurde, tritt im DGGE-Profil der klonierten Probe kein für eine Zuordnung ausreichend starkes Signal auf.

Fast auf gleicher Höhe wie die eben genannten Klone treten auch Signale für einen Vertreter der *Rhizobiales*, clade A0839 (Klon 53) auf sowie Klone 28 und 38, die der Gattung *Brevundimonas* zugeordnet wurden. Ein starkes Signal im Profil der klonierten Probe in diesem Bereich kann den als *Brevundimonas* identifizierten Klonen zugeordnet werden, das Signal von Klon 60 tritt jedoch in gleicher Höhe auf. Klon 53 (*Rhizobiales*) sowie Klon 41 (TA 18) ergeben Banden leicht oberhalb dieses Signals und auf gleicher Höhe mit einer schwachen Bande im Profil der klonierten Probe.

3 Ergebnisse

Klon 55 wurde ebenso wie Klon 53 der Gruppe A0839 der *Rhizobiales* zugeordnet, beide Klone weisen aber deutlich unterschiedliche DGGE-Signale auf. Das DGGE-Signal von Klon 55 liegt sehr nahe beim Signal von Klon 26 der als *Rhodobacter* identifiziert wurde. Im Vergleich mit dem Profil der klonierten Probe entspricht das Signal von Klon 55 einer starken Bande. Leicht darunter, im Bereich der Laufhöhe von Klon 26 tritt im Profil der klonierten Probe kein deutlich erkennbares Signal auf. Für die Größenfraktion < 5 µm konnte in diesem Bereich jedoch eindeutig ein starkes Signal in der Probe zu als *Rhodobacter* identifizierten Klonen zugeordnet werden.

Im unteren Bereich des Gels treten die Banden der als *Roseomonas (Rhodospirillales)* identifizierten Klone (50, 46, 34, 56, 57, 61, 63) auf, die bis auf die Klone 46 und 50 alle das gleiche DGGE-Signal zeigen. Die DGGE-Bande der Mehrheit dieser Klone können eindeutig einer starken Bande in der klonierten Probe zugeordnet werden, da keine weiteren DGGE-Signale treten in dieser Höhe auf. Klon 48 weist die gleiche Laufhöhe auf wie Klon 46 (*Roseomonas*), eine die Identifizierung war aber nur bis zur Ordnung *Rhodospirillales* möglich.

3 Ergebnisse

Tabelle 31: Taxonomische Einordnung der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Probe E 08/14 > 5 µm nach Datenbankabgleich mit rdp bzw SILVA; alle nach rdp als SAR11 / C. Pelagibacter identifizierten Sequenzen entsprechen nach SILVA-Klassifizierung SAR11 / clade III; A. = Alphaproteobacteria, D = Deltaproteobacteria; Pro. = Proteobacteria

Klon	taxonomische Zuordnung		Datenbank
	Subphylum	Ordnung - Gattung	
26	A.	Rhodobacterales[100%] Rhodobacteraceae[100%] Rhodobacter[93%]	rdp
27	A.	Rickettsiales;Rickettsiales Incertae Sedis;[79%]	SILVA
28	A.	Caulobacterales[100%] Caulobacteraceae[100%] Brevundimonas[100%]	rdp
33	A.	SAR11[100%] Candidatus Pelagibacter[100%]	rdp
34	A.	Rhodospirillales[100%] Acetobacteraceae[100%] Roseomonas[96%]	rdp
35	A.	SAR11[100%] Candidatus Pelagibacter[100%]	rdp
36	A.	Sphingomonadales[100%] Erythrobacteraceae[100%] Porphyrobacter[100%]	rdp
37	A.	Rickettsiales;Rickettsiales Incertae Sedis;Candidatus Captivus; [88%]	SILVA
38	A.	Caulobacterales[100%] Caulobacteraceae[100%] Brevundimonas[100%]	rdp
41	Pro.	Bacteria;Proteobacteria;TA18;[84%]	SILVA
45	D.	Deltaproteobacteria;Desulfuromonadales;GR-WP33-58; [81%]	SILVA
46	A.	Rhodospirillales; Acetobacteraceae;Roseomonas;(96%)	SILVA
48	A.	Rhodospirillales[95%] Rhodospirillaceae[89%] Dongia[51%]	rdp
49	D.	Deltaproteobacteria[100%] Myxococcales[100%] Sorangiineae[100%] Polyangiaceae[79%] Sorangium[61%]	rdp
50	A.	Rhodospirillales[100%] Acetobacteraceae[100%] Roseomonas[97%]	rdp
51	A.	Caulobacterales[100%] Hyphomonadaceae[100%] Hyphomonas[100%]	rdp
53	A.	Rhizobiales;A0839; [99%]	SILVA
55	A.	Rhizobiales;A0839; [100%]	SILVA
56	A.	Rhodospirillales[100%] Acetobacteraceae[100%] Roseomonas[94%]	rdp
57	A.	Rhodospirillales[100%] Acetobacteraceae[100%] Roseomonas[96%]	rdp
58	A.	Rickettsiales;Rickettsiales Incertae Sedis;[80%]	SILVA
59	D.	Deltaproteobacteria;Bdellovibrionales;Bdellovibrionaceae;OM27 clade;[89%]	SILVA
60	Pro.	Bacteria;Proteobacteria;TA18;[84%]	SILVA
61	A.	Rhodospirillales[100%] Acetobacteraceae[100%] Roseomonas[89%]	rdp
63	A.	Rhodospirillales[100%] Acetobacteraceae[100%] Roseomonas[99%]	rdp

3 Ergebnisse

3.8.2 Die Diversität der *Alphaproteobacteria* anhand denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese

Die DGGE-Profile der *Alphaproteobacteria* in ausgewählten Proben aus der Talsperre Saidenbach und der Vorsperre Forchheim zeigen saisonale und lokale Unterschiede. Die Dominanz von *C. Pelagibacter* konnte in allen untersuchten Freiwasserproben anhand des charakteristischen DGGE-Signals bestätigt werden. Zur taxonomischen Identifikation von DGGE-Signalen wurden sowohl die Ergebnisse der Klonierungen als auch die Sequenzierung von aus den Gelen ausgeschnittenen Banden verwendet. Abbildung 95 zeigt ausgewählte DGGE-Profile der *Alphaproteobacteria* der Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$ in Proben der Entnahmestelle von 2013 bis 2015, die taxonomische Zuordnung der sequenzierten DGGE-Banden ist Tabelle 32 zu entnehmen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Klonierung (Bande a) ergab die Sequenzierung der Banden 20, 30 und 40 *C. Pelagibacter*. Auf der Höhe von Bande b wurden in der Klonierung Signale für *Brevundimonas* sowie für Vertreter von TA 18 (*Proteobacteria*) gefunden, das DNA-Fragment aus Bande 24 wurde *Brevundimonas* zugeordnet. Im Bereich von Bande c der klonierten Probe traten Signale von als *Rhizobiales* und als *Rhodobacter* identifizierten Klonen auf. Die in diesem Bereich liegenden Banden wurden den Gattungen *Rhodobacter* (45) bzw. *Caulobacter* (21, 46) zugeordnet. In der Klonierung der Probe E 08/14 $< 5\mu\text{m}$ wurden Klone der entsprechenden Höhe als *Rhodobacter* identifiziert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass mehrere abundante Vertreter der *Alphaproteobacteria* in dieser DGGE Signale in einem ähnlichen Bereich bilden. Mehrere DGGE-Signale im mittleren Bereich des Gels (42, 43, 49, 50, 52) wurden als *Rhizobiales* identifiziert, in diesem Bereich wurde kein Signal aus der Klonierung zugeordnet. Die eindeutige Zuordnung der Bande d zur Gattung *Hyphomonas* aus der Klonierung wird durch die Sequenzierung von Bande 5 sowie die Ergebnisse der Klonierung der Probe E 08/14 $< 5\mu\text{m}$ bestätigt. Auch die Zuordnungen der Banden f (*Roseomonas*) und g (*Rhodospirillales*) wurden durch die Sequenzierung der Banden 33 bzw. 27 bestätigt. Banden 23, 32 und 18 wurden der Gattung *Hirschia* (*Hyphomonadaceae*) zugeordnet, die geringen Unterschiede in der Höhe der Signale können auch auf Ungenauigkeiten beim Normalisieren der DGGE-Gele zurückgehen. Die Bandenmuster der Proben der Entnahmestelle zeigen für die Jahre 2013 und 2015 die höchste Diversität der *Alphaproteobacteria* im Frühjahr. 2014 weist neben den Profilen der Monate März und April auch das Bandenmuster von August hohe Diversität auf. Neben der in allen Proben deutlichen Bande im oberen Gelbereich (*C. Pelagibacter*), zeigen die Profile ab den Sommermonaten im Bereich von Bande c bzw. 45/46 stärkere Signale, die sowohl auf die Gattungen *Rhodobacter*, *Caulobacter* oder Vertreter der *Rhizobiales* zurückzuführen sein können. Während alle Freiwasserproben das Signal von *C. Pelagibacter* aufweisen, fehlt dieses in den beiden Proben aus dem Sediment (Sedimentfalle E0 und oberster Sedimenthorizont 0-5cm).

3 Ergebnisse

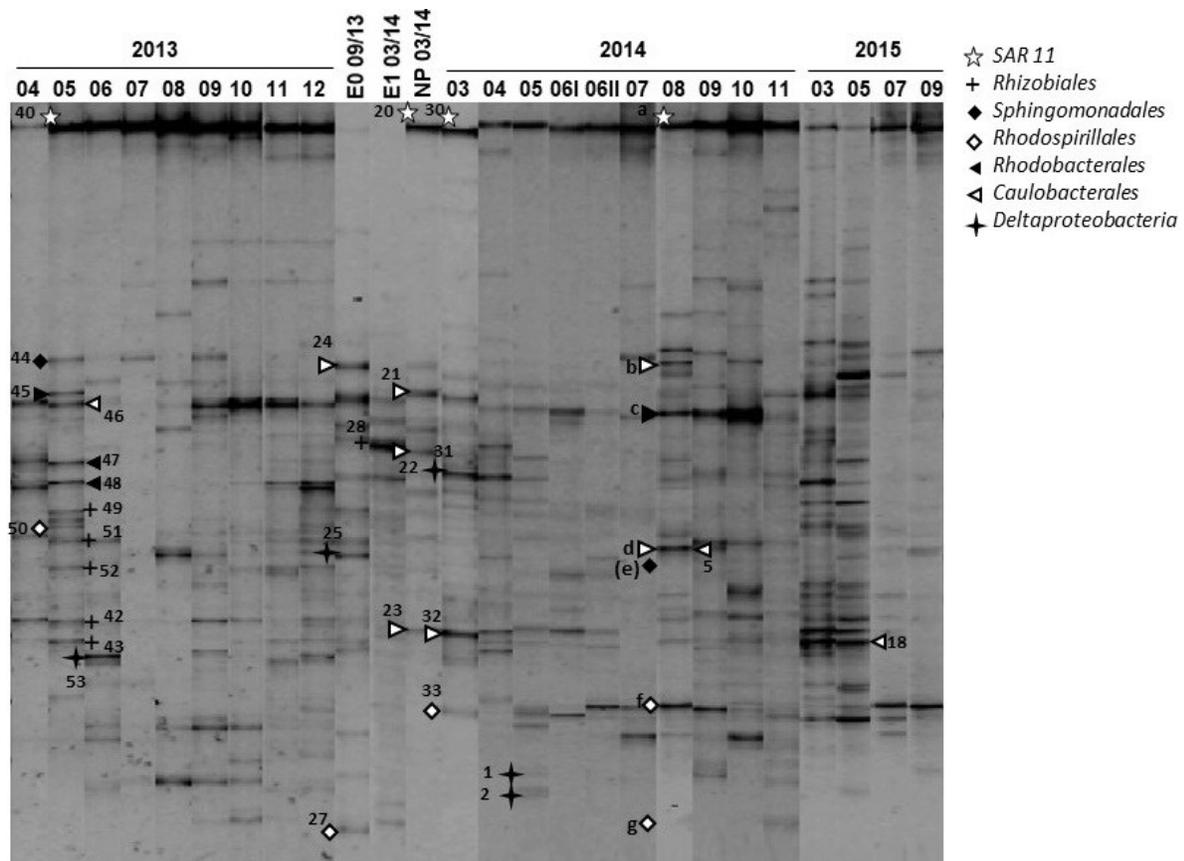


Abbildung 95: Normalisierte DGGE-Profile der Alpha- und Deltaproteobacteria für Proben der Entnahme-stelle (2 m Wassertiefe, Größenfraktion >5µm); a-g: Taxonomische Zuordnung der Signale nach Klonierung (Abbildung 94); 1-53: Taxonomische Zuordnung der Signale durch Ausschneiden aus dem DGGE-Gel; E0 = Sedimentfalle, E1 = Sediment Horizont 0-5cm, NP = Netzzug über die gesamte Wassersäule

3 Ergebnisse

Tabelle 32: Taxonomische Zuordnung der in Abbildung 95 markierten DGGE-Signale nach Datenbankabgleich mit rdp bzw SILVA; A. = Alphaproteobacteria, D = Deltaproteobacteria; Pro. = Proteobacteria

Bande	taxonomische Zuordnung		Datenbank
	Subphylum	Ordnung - Gattung	
1	D.	Deltaproteobacteria;Myxococcales;mle1-27 [91%]	SILVA
2	D.	Deltaproteobacteria;Myxococcales;mle1-27 [83%]	SILVA
5	A.	Caulobacterales;Hyphomonadaceae;Hyphomonas [88%]	SILVA
18	A.	Hyphomonadaceae;Hirschia [86%]	SILVA
40	A.	SAR11;Candidatus Pelagibacter [100%]	rdp
42	A.	Rhizobiales;Beijerinckiaceae [97%]	SILVA
43	A.	Caulobacterales;Hyphomonadaceae;Hirschia [91%]	SILVA
44	A.	Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Sphingorhabdus [99%]	SILVA
45	A.	Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Rhodobacter [99%]	SILVA
46	A.	Caulobacterales;Caulobacteraceae;Caulobacter [95%]	rdp
47	A.	Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Pseudorhodobacter [99%]	SILVA
48	A.	Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Rhodobacter [97%]	SILVA
49	A.	Rhizobiales;Beijerinckiaceae [95%]	SILVA
50	-	Unclassified;	SILVA
51	-	Unclassified;	SILVA
52	A.	Rhizobiales;Beijerinckiaceae;alpha cluster [96%]	SILVA
71	A.	Rhizobiales;KF-JG30-B3 [95%]	SILVA

Abbildung 96 zeigt beispielhaft die DGGE-Profile von Proben beider Größenklassen von der Entnahmestelle der Talsperre Saidenbach im Vergleich mit Proben der Vorsperre Forchheim. Die DGGE-Profile der beiden Untersuchungsstellen weisen Gemeinsamkeiten auf, wie die deutliche Präsenz von *C. Pelagibacter* in allen Proben, darüber hinaus aber deutliche Unterschiede. So zeigen die Profile der Proben aus der Vorsperre in der Größenfraktion < 5 µm eine höhere Diversität der *Alphaproteobacteria* in diesem Gewässer. In mehreren Teilbereichen der entsprechenden Profile treten Signale auf, die in den Proben der Entnahmestelle weniger ausgeprägt sind. Im oberen Drittel des Gels, im Bereich zwischen den als *Deltaproteobacteria* und *Sphingorhabdus* identifizierten Banden, weisen alle Profile aus der Vorsperre in wechselnder Intensität ein Signal auf, dem keines der Signale der Klone (Abbildung 93, Abbildung 94) entspricht.

Im Bereich der ausgeschnittenen Bande 40 treten generell häufig unscharfe Banden oder Doppelbanden auf, u.a. die Klonierung der Probe E 08/14 > 5µm und der Vergleich mit sequenzierten DGGE-Signalen hat gezeigt, dass in diesem Bereich Signale verschiedener *Alpha*- und *Deltaproteobacteria* auftreten können (u.a. *Rhodobacter*, *Rhizobiales*, *Desulfuromonadales*). In dieser Probe wurde die Bande 40 den *Rhizobiales* zugeordnet; in den aus der Klonierung erhaltenen DGGE-Signalen tritt in diesem Bereich ein Signal von

3 Ergebnisse

Pseudorhodobacter auf (Abbildung 93, Klon 144), welches der oberen Bande der beiden entsprechen könnte. Da in der klonierten Probe selbst kein zuzuordnendes Signal erkennbar war, ist keine exaktere Übertragung der Laufhöhe auf andere DGGE-Gele möglich. Auffällig ist darüber hinaus ein gut abgegrenztes Signal im unteren Drittel des Gels, welches anhand von Klon 96 (E 08/14 < 5 µm) als *Sphingopyxis* identifiziert werden konnte. Wie die Profile der Proben zeigen, ist die Gattung in der Vorsperre regelmäßig anzutreffen, im deutlichen Unterschied zur Entnahmestelle wo im entsprechenden Gelbereich kaum Signale auftreten. Die Identifikation der Banden 24 und 25 als *Pseudorhodobacter* bzw. *Rhodobacter* konnte nicht durch die Ergebnisse der Klonierung bestätigt werden, da in diesem Bereich in der klonierten Probe keine erkennbaren Signale auftreten. Die Sequenzierung der Banden 47 und 48 (Abbildung 95) in der gleichen Laufhöhe ergab jedoch die gleiche taxonomische Zuordnung. Die beiden Banden treten in der Mehrheit der Proben aus der Vorsperre in hoher Intensität auf, jedoch nur in einzelnen Proben von der Entnahmestelle.

3 Ergebnisse

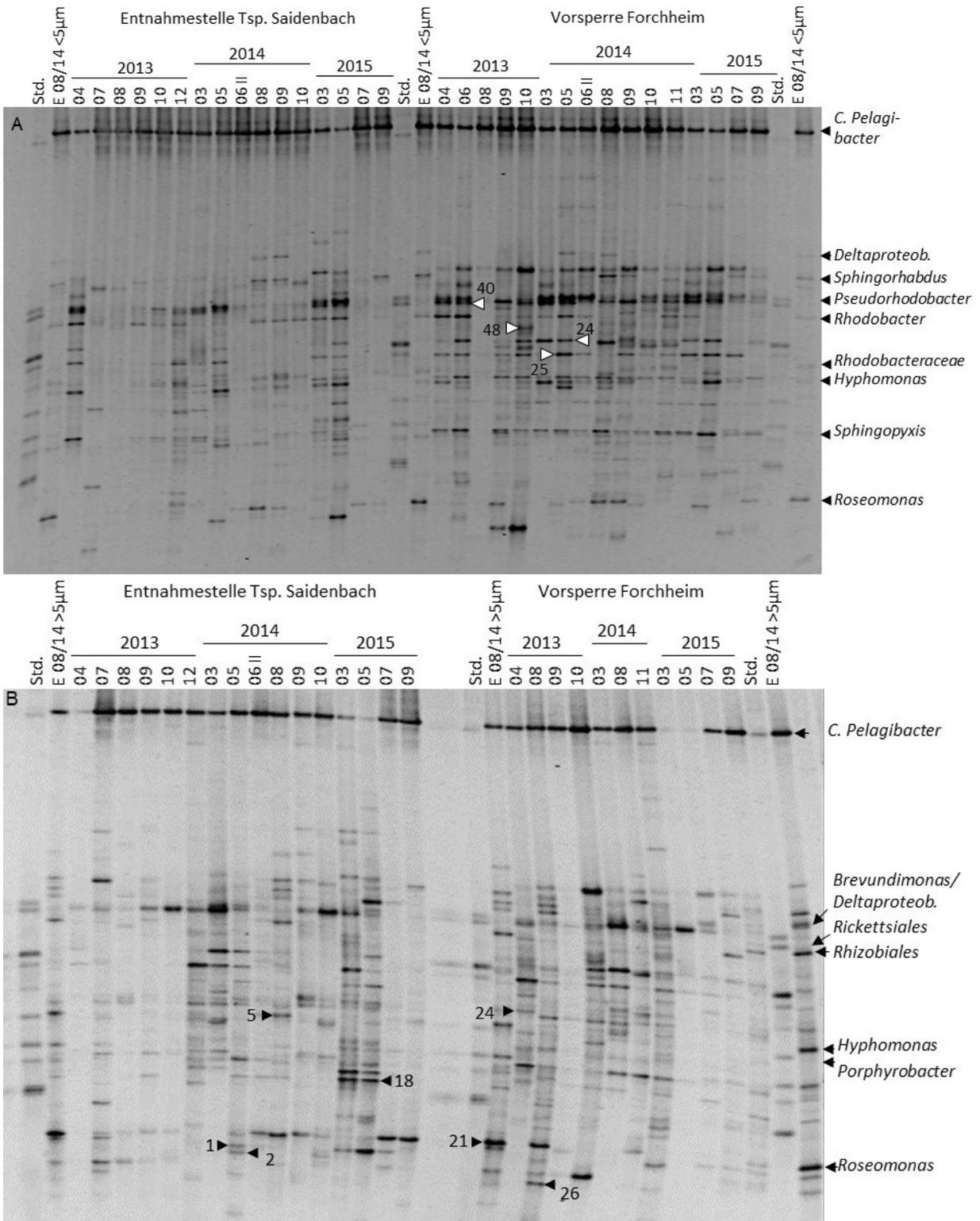


Abbildung 96: DGGE-Profile der Alpha- und Deltaproteobacteria für Proben der Entnahmestelle sowie der Vorsperre Forchheim der Größenfraktion $<5\mu\text{m}$ (A) und $>5\mu\text{m}$ (B); Bezeichnungen am Abbinungsrand entsprechen Identifikation von Banden mittels Klonierung, Nummern im Gelbild kennzeichnen taxonomisch zugeordnete DGGE-Banden

3 Ergebnisse

Tabelle 33: Taxonomische Zuordnung der in Abbildung 88 markierten DGGE-Signale nach Datenbankabgleich mit rdp bzw. SILVA; A. = Alphaproteobacteria, D = Deltaproteobacteria; Pro. = Proteobacteria

Bande	taxonomische Zuordnung		Datenbank
	Subphylum	Ordnung - Gattung	
A	24	A. Rhodobacterales[98%] Rhodobacteraceae[98%] Pseudorhodobacter[63%]	rdp
	25	A. Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Rhodobacter[80%]	rdp
	40	A. Alphaproteobacteria[83%] Rhizobiales[42%]	rdp
	48	A. Rhizobiales[84%] Hyphomicrobiaceae[82%] Rhodomicrobium[82%]	rdp
B	1	D. Deltaproteobacteria; Myxococcales; mle1-27 [91%]	SILVA
	2	D. Deltaproteobacteria; Myxococcales; mle1-27 [83%]	SILVA
	5	A. Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Hyphomonas [88%]	SILVA
	18	A. Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Hirschia [86%]	SILVA
	21	A. Rhodospirillales; Acetobacteraceae; Roseomonas [81%]	rdp
	24	A. Rhodospirillales; Acetobacteraceae [87%]	SILVA
	26	D. Deltaproteobacteria; Myxococcales; Archangiaceae; Anaeromyxobacter [94%]	SILVA

Die Proben der Größenklasse $>5\mu\text{m}$ zeigen im Vergleich mit denen der Fraktion $<5\mu\text{m}$ weniger Gemeinsamkeiten. Mit Ausnahme von *C. Pelagibacter* gibt es wenige Signale, die in fast allen Proben eines Gewässers auftreten wie es z. B. für *Sphingopyxis*, *Pseudorhodobacter* und *Rhodobacter* (Banden 24 und 25) in den Proben $<5\mu\text{m}$ der Vorsperre der Fall ist. Die Sequenzierung mehrerer DGGE-Signale ergab, dass auch Vertreter der *Deltaproteobacteria* (*Myxococcales*) Signale im unteren Bereich des Gels bilden (Banden 1, 2, 26 in Abbildung 96 B), in dem darüber hinaus typischerweise die Signale von *Roseomonas* auftreten (Bande 21).

Die Bandenmuster dieser DGGE sind geeignet, lokale und saisonale Variationen in der Zusammensetzung und Diversität der *Alphaproteobacteria* abzubilden. Darüber hinaus kann auch das Auftreten einzelner Gattungen im Vergleich der Proben analysiert werden (u.a. *Roseomonas*, *Hyphomonas*, *Sphingopyxis*, *C. Pelagibacter*), in einigen Teilbereichen der DGGE-Gele treten jedoch auch Signale verschiedener Vertreter der *Alpha-* und *Deltaproteobacteria* auf gleicher oder sehr ähnlicher Höhe auf.

3.9 Untersuchung der Diversität der Betaproteobacteria mittels DGGE

Zur Untersuchung der *Betaproteobacteria* wurde der für diese Gruppe spezifische Primer B680F in Kombination mit dem Primer 1055R mit GC Klammer verwendet [155]. Die 375 bp langen Amplifikate schließen die variablen Regionen V4 bis V6 der 16S rDNA ein.

Wie die Sequenzierung von DGGE-Banden zeigt, werden mit den *Methylophilales* und den *Comamonadaceae* wesentliche Vertreter der *Betaproteobacteria* im Süßwasser abgebildet (Abbildung 97, Tabelle 34). Keines der analysierten DGGE-Signale wurde der Gattung *Polynucleobacter* zugeordnet, obwohl diese quantitativ ähnlich bedeutsam ist wie die Vertreter der *Methylophilales* (Kapitel 3.6.3). Mit der verwendeten Primerkombination werden die Vertreter der *Burkholderiaceae* zu 55 % und die der Gattung *Polynucleobacter* zu 38 % erfasst (1 Basenfehlpaarung zugelassen, rdp probe match tool, Januar 2018). Für die relevanten Gattungen der *Comamonadaceae* (53 %) liegen diese Anteile zwischen 30 und 70 % (*Limnohabitans* 29 %, *Polaromonas* 30 %, *Acidovorax* 96 %, *Rhodoferax* 40 %), die Vertreter der *Methylophilaceae* werden zu 29 % erfasst. Keines der sequenzierten DGGE-Signale wurde einer Gruppe außerhalb der *Betaproteobacteria* zugeordnet. Wie die DGGE-Profile ausgewählter Proben in Abbildung 97 zeigen, ist die Variabilität der DGGE-Profile für die *Betaproteobacteria* zwischen den verschiedenen Untersuchungsstellen und –zeitpunkten gering. Ähnliches wurde auch für andere Gewässer anhand dieser DGGE gezeigt [155]. Eine stabile Population der *Betaproteobacteria*, dominiert durch die *Comamonadaceae*, zeigen auch die Ergebnisse der 16S-Amplikonsequenzierung (Kapitel 3.6.3).

3 Ergebnisse

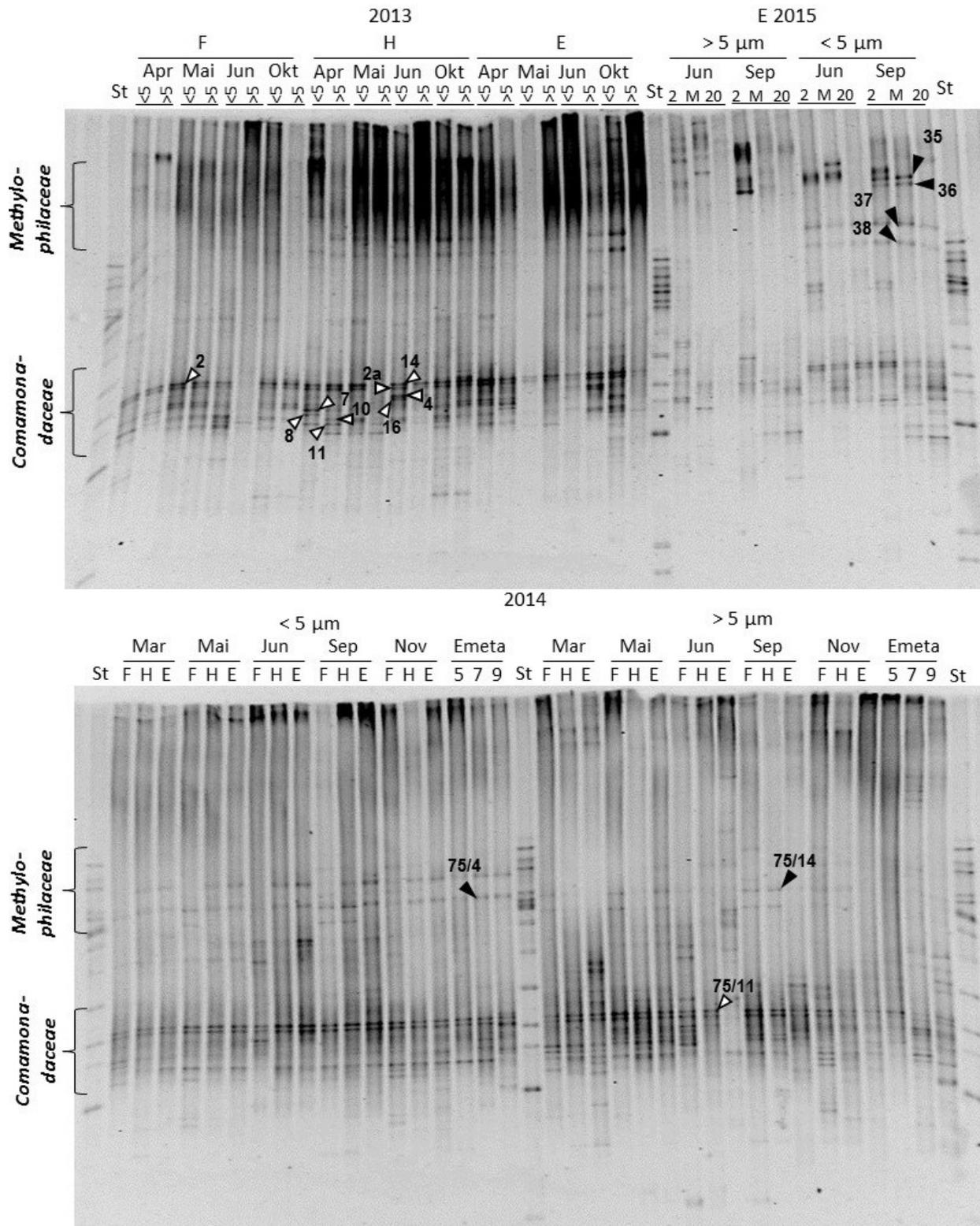


Abbildung 97: DGGE-Profile der *Betaproteobacteria* ausgewählter Untersuchungsstellen (F, H, E) und –zeitpunkte in der Talsperre Saldenbach von 2013 bis 2015; M bzw. Emeta= Metalimnion der Entnahmestelle, 2 bzw. 20 = Probenahmetiefe 2 m bzw. 20 m, St. = Standard

3 Ergebnisse

Tabelle 34: Taxonomische Einordnung der aus dem Gel ausgeschnittenen DGGE-Signale (Abbildung 97)

Bande	taxonomische Zuordnung (rdp)
2	Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[100%] Acidovorax[84%]
2a	Burkholderiales[89%] Comamonadaceae[73%] Rhodoferax[12%]
4	Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[98%] Acidovorax[21%]
7	Burkholderiales[99%] Comamonadaceae[99%] Variovorax[59%]
8	Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[100%] Polaromonas[75%]
10	Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[100%] Acidovorax[70%]
11	Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[96%] Acidovorax[60%]
14	Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[100%] Acidovorax[59%]
16	Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[100%] Acidovorax[69%]
35	Methylophilales[68%] Methylophilaceae[68%] Methylobacillus[55%]
36	Methylophilales[77%] Methylophilaceae[77%] Methylobacillus[62%]
37	Methylophilales[76%] Methylophilaceae[76%] Methylobacillus[56%]
38	Methylophilales[71%] Methylophilaceae[71%] Methylobacillus[56%]
75/4	Methylophilales[77%] Methylophilaceae[77%] Methylobacillus[56%]
75/11	Burkholderiales[100%] Comamonadaceae[100%] Acidovorax[60%]
75/14	Methylophilales[93%] Methylophilaceae[93%] Methylovorus[42%]

3.10 Untersuchung der Diversität der Gruppe *Synechococcus*/GpIIa mittels DGGE

Für die molekulargenetische Untersuchung der Diversität der Gruppe GpIIa, die v.a. picoplanktische kokkale Organismen wie der Gattung *Synechococcus* umfasst, wurde ein ca. 160 bp großes PCR-Produkt der 16S rDNA in der DGGE aufgetrennt. Die taxonomische Spezifität wurde dabei durch die vorangehende Amplifikation eines größeren DNA-Abschnittes mit Hilfe der Primer ProCR und Cya_b_F371 erreicht (Abbildung 98).

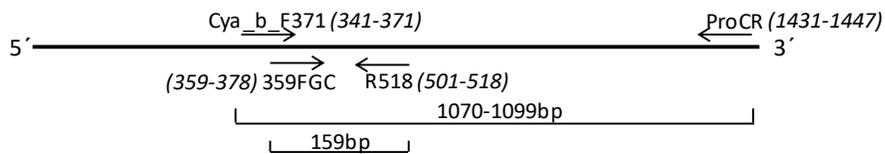


Abbildung 98: Schematische Darstellung der Bindestellen der Primer mit Angabe der Bindestellen in *Cyanobium gracile* PCC 6307 (gi|485099050)

Die Kombination der Primer ProCR/Cya_b_F371 ist spezifisch für Organismen des Phylums *Cyanobacteria* (2368/70404 Datenbank-Sequenzen) und darin vor allem für Vertreter der Gruppe GpIIa (2240/12304 Datenbanksequenzen, (rdp 11.4 probe match, 23.3.2016, 1 mismatch, [156])). Die Primer amplifizieren ebenfalls einen geringen Teil Sequenzen der Gruppe GpI (26/6825; verschiedene Arten *Cylindrospermum stagnale* und uncultured *Cyanobacteria*) sowie der Gruppe GpV (7/195; *Leptolyngbya*, uncultured bacterium).

Abbildung 99 zeigt beispielhaft die DGGE-Profile der Proben verschiedener Untersuchungsstellen und Probenahmetiefen von Mai bis September 2015. Die Profile unterscheiden sich deutlich zwischen den beiden Größenfraktionen (> und < 5µm). Darüber hinaus treten deutliche saisonale Unterschiede auf sowie häufig deutlich verschiedene Profile zwischen den Stellen F und H sowie S und E (z.B. Juli, August). Zur taxonomischen Einordnung der DGGE-Signale wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und nach Reamplifikation sequenziert. Alle in Abbildung 99 dargestellten DGGE-Banden wurden als *Synechococcus* bzw. GpIIa identifiziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen unterscheiden sich dabei nur in sehr wenigen Basenpaaren oder sind vielfach sogar identisch (Abbildung 100). Dennoch weisen sie deutlich unterschiedliche Laufhöhe im DGGE-Gel auf. So wurde für die vier unterschiedlichen DGGE-Signale 73/14, ~/15, ~/16 und ~/17 die gleiche Sequenz ermittelt. Ein möglicher Sequenzunterschied könnte außerhalb des auswertbar sequenzierten Bereiches liegen. Alternativ könnte ein DNA-Fragment auch mehrere Sekundärstrukturen mit unterschiedlichem Schmelzverhalten bilden, die dann als verschiedene DGGE-Signale in Erscheinung treten.

3 Ergebnisse

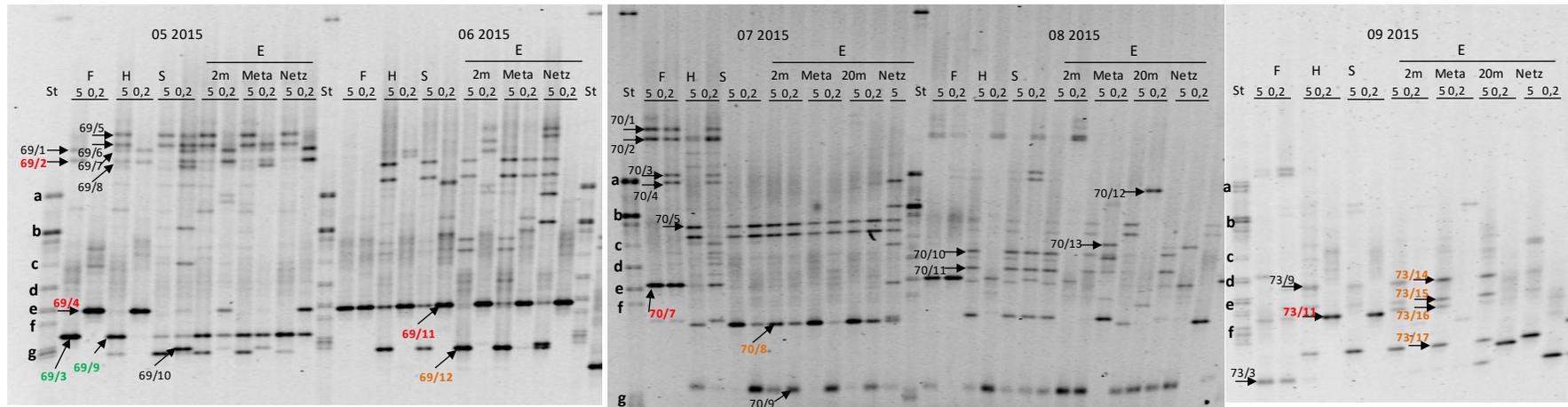


Abbildung 99: DGGE-Profile für die Gattung *Synechococcus* Mai bis September 2015 mit Markierung sequenzierter Banden; a-g Kennzeichnung der Banden des Standards (St) zur besseren Vergleichbarkeit der Gele; 5 = Größenfraktion >5 µm nach Filtration; 0,2 = Größenfraktion 0,2 – 5 µm nach Filtration: Meta = Tiefenbereich des Metalimnions, Netz = Netzzug über die gesamte Wassersäule

Bande	taxonomische Zuordnung	Bande	taxonomische Zuordnung
69/1	Synechococcales;Cyanobiaceae [99%]	70/5	Synechococcales;Cyanobiaceae [100%]
69/2	Synechococcales;Cyanobiaceae [90%]	70/6	Synechococcales;Cyanobiaceae [100%]
69/3	Synechococcales;Cyanobiaceae;Cyanobium PCC-6307 [97%]	70/7	Synechococcales;Cyanobiaceae [80%]
69/4	Synechococcales;Cyanobiaceae [86%]	70/8	Synechococcales;Cyanobiaceae [79%]
69/5	Synechococcales;Cyanobiaceae [98%]	70/9	Synechococcales;Cyanobiaceae;Cyanobium PCC-6307 [88%]
69/6	Synechococcales;Cyanobiaceae [99%]	70/10	Synechococcales;Cyanobiaceae [88%]
69/7	Synechococcales;Cyanobiaceae [99%]	70/11	Synechococcales;Cyanobiaceae [88%]
69/8	Synechococcales;Cyanobiaceae [97%]	70/12	Synechococcales;Cyanobiaceae [96%]
69/9	Synechococcales;Cyanobiaceae;Cyanobium PCC-6307 [97%]	70/13	Synechococcales;Cyanobiaceae [99%]
69/10	Synechococcales;Cyanobiaceae [99%]	73/3	Synechococcales;Cyanobiaceae [86%]
69/11	Synechococcales;Cyanobiaceae [98%]	73/9	Synechococcales;Cyanobiaceae [87%]
69/12	Synechococcales;Cyanobiaceae [97%]	73/11	Synechococcales;Cyanobiaceae [80%]
70/1	Synechococcales;Cyanobiaceae [80%]	73/14	Synechococcales;Cyanobiaceae [88%]
70/2	Synechococcales;Cyanobiaceae [88%]	73/15	Synechococcales;Cyanobiaceae [99%]
70/3	Synechococcales;Cyanobiaceae [92%]	73/16	Synechococcales;Cyanobiaceae [99%]
70/4	Synechococcales;Cyanobiaceae [89%]	73/17	Synechococcales;Cyanobiaceae [97%]

Tabelle 35:
Taxonomische Zuordnung der in Abbildung 100 markierten DGGE-Signale nach Datenbankabgleich mit SILVA; Nach rdp wurden alle Sequenzen als *Cyanobacteria*; *Family II*; *GpIIa* identifiziert

3 Ergebnisse

Die Möglichkeit, dass die Bildung unterschiedlicher Sekundärstrukturen der DNA mit verschiedenem Schmelzverhalten in der DGGE zur Ausprägung mehrerer Banden eines DNA-Fragmentes führen, wurde mit Hilfe des web service mfold (<http://unafold.rna.albany.edu>) [145], [146], [147] untersucht. Für die identische DNA-Sequenz der Banden 73/14, ~/15, ~/16, ~/17 wurden vier potentielle Sekundärstrukturen (dG -6,81 bis -5,87) erstellt (Abbildung 101).

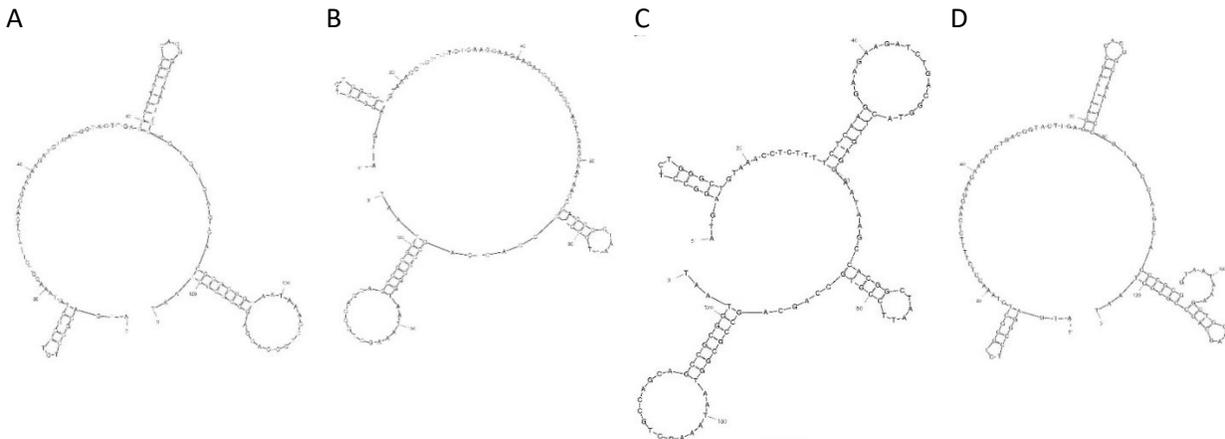
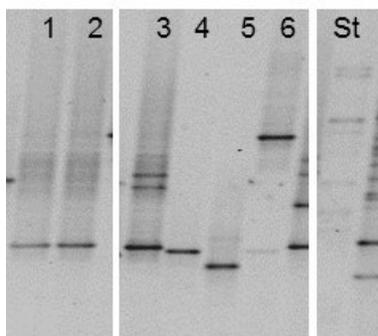


Abbildung 101: Potentielle Sekundärstrukturen des DNA-Fragments von Bande 73/4, erstellt durch mfold (<http://unafold.rna.albany.edu>)

Freie Enthalpien bei 60°C: A = -6,81 kcal/mol; B = -6,34 kcal/mol; C = -6,13 kcal/mol; D = -5,87 kcal/mol

Für die Sequenz der Bande 70/1 wurden sogar 10 potentielle Strukturen vorgeschlagen, wobei nur für fünf davon die freien Enthalpien unter -0,5 liegen (-0,87 bis -0,71, nicht abgebildet).

Die DGGE-Analyse des gleichen 16S rDNA-Abschnittes von DNA aus Reinkulturen von Cyanobakterien (*S. Schumann, SAW*) zeigt nur für einen der sechs untersuchten *Synechococcus*-Stämme mehrere Banden (Abbildung 102). Für die Sequenz der Bande aus Profil Nr. 4 gibt der web service mfold ähnlich wie für Bande 73/14 vier Strukturen mit freien Enthalpien von -6,18 bis -5,58 an, jedoch tritt im entsprechenden DGGE-Profil nur eine Bande auf.



1 = *Cyanobium plancticum* 6/06/E1B
 2 = *Cyanobium* 6/04/F5
 3 = *Synechococcus* 8/04/E3A
 4 = *Synechococcus* 8/11/FWH
 5 = *Synechocystis* 6/10/F3A
 6 = *Synechocystis* 7/10/H5B
 (Kultivierung und Identifikation der Isolate durch S. Schumann, Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig)

Abbildung 102: DGGE-Analyse des 16S rDNA-Fragmentes (*E.coli*-Pos. 359-518) aus Cyanobakterien-Reinkulturen

3 Ergebnisse

Die Frage, ob in dieser DGGE tatsächlich mehrere Banden durch DNA-Fragmente gleicher Sequenz gebildet werden, kann nicht abschließend geklärt werden. Die Prognose von Sekundärstrukturen deutet zwar darauf hin, jedoch treten in der vergleichenden DGGE-Analyse mit DNA aus Cyanobakterien-Reinkulturen nicht regelmäßig mehrere Banden einer Kultur auf.

4 Diskussion

4.1 Phytoplankton und autotrophes Picoplankton

4.1.1 Fluoreszenzsondenbasierte Quantifizierung und Differenzierung des Phytoplanktons

Durch die Verwendung von Tauchsonden kann die räumliche und zeitliche Auflösung von Informationen über die Phytoplanktonzusammensetzung im Vergleich zur Mikroskopie deutlich erhöht werden. Statt der Analyse von Proben aus distinkten Tiefen können vollständige Tiefenprofile aufgenommen werden, sodass Entwicklungen von Phytoplanktongruppen in begrenzten Tiefenbereichen sicher erfasst werden können. Ergebnisse von Messungen mit der hier verwendeten Tauchsonde FluoroProbe oder dem Algae online analyzer (AOA, bbe Moldaenke GmbH, basierend auf dem gleichen Messprinzip) wurden mit verschiedenen Methoden validiert: Für die ermittelte Gesamtchlorophyllkonzentration konnte eine gute Übereinstimmung mit klassischen Chlorophyll-Extraktionsmethoden und fluorometrischer Bestimmung des Chlorophyllgehaltes gezeigt werden [157], [158], [159], [160]. Auch die gruppenspezifischen Chlorophyll a-Konzentrationen erwiesen sich als gut vergleichbar mit den Ergebnissen HPLC-basierter CHEMTAX-Analysen [161], [162], [163] wobei auch eine Überschätzung der Chlorophyll-a-Konzentrationen für die Gruppe Grünalgen und Cryptophyta gezeigt wurde [164]. Ausgehend von diesen Studien kann für die meisten Proben eine zuverlässige Quantifizierung der Pigmente angenommen werden. Darauf aufbauend ist von entscheidender Bedeutung, wie sicher von Pigmentkonzentrationen auf die Phytoplanktonzusammensetzung geschlossen werden kann. Das für die jeweiligen Gruppen charakteristische Fluoreszenzspektrum (SFS, spectral fluorescence signature) basiert auf der für sie typischen Kombination akzessorischer Photopigmente. Die Konzentrationen von Photopigmenten in den Zellen unterliegen jedoch Schwankungen in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen. So zeigten z.B. Felip & Catalán (2005) für den saisonalen Verlauf von Gesamt-Chlorophyll-Konzentration und Biovolumina in einem oligotrophen See deutliche räumliche und zeitliche Unterschiede. Das Verhältnis von Chlorophyll je Einheit Biovolumen veränderte sich im Jahresverlauf bzw. zwischen unterschiedlichen Stellen und Tiefen im See [165]. Wie anhand von Phytoplanktonkulturen gezeigt wurde, hat z.B. die Adaptation an unterschiedliche Lichtverhältnisse sowie der physiologische Zustand der Phytoplankter deutlichen Einfluss auf die durch die FluoroProbe ermittelten Chlorophyll a-Konzentrationen [166]. Die Pigmentkonzentrationen aus HPLC-/CHEMTAX-Analysen und mikroskopisch ermittelten Biovolumina in Wasserproben zeigten lineare Zusammenhänge für die Gruppen Chrysophyta, Dinophyta und Cryptophyta jedoch nicht für Chlorophyta [105].

4 Diskussion

Unterschiedliche gruppenspezifische Chlorophyllgehalte werden besonders deutlich bei Grünalgen, die im Mittel deutlich höhere Chlorophyllgehalte aufweisen als die Mehrheit der Phytoplankter anderer Gruppen, worauf auch entsprechende Korrekturfaktoren für die Phytoplanktongruppen ([167] Bezug nehmen. Die in der Software hinterlegten Umrechnungsfaktoren der Chlorophyll-Konzentrationen in Zellzahlen tragen ebenfalls den unterschiedlichen Chlorophyllgehalten der Gruppen Rechnung, ihre Anwendung mindert jedoch die deutliche Überschätzung des relativen Anteils der Grünalgen im Vergleich zur mikroskopischen Analyse kaum. Diese Diskrepanzen spiegeln sich in der deutlich unterschiedlichen Phytoplanktonzusammensetzung in den Frühjahrsmonaten der hier durchgeführten Vergleichsmessung wider. Während die mikroskopischen Analysen eine deutliche Dominanz der Biovolumina der spektralen Gruppe der Diatomeen zeigten, hatten nach den Sondemessungen Grünalgen ebenso hohe Anteile wie die Diatomeen an der Chlorophyll-a-Konzentration.

Da auch die Arten innerhalb einer spektralen Gruppe nicht exakt die gleichen Fluoreszenzspektren aufweisen, können auch Veränderungen der Artenzusammensetzung innerhalb einer spektralen Gruppe die Detektion der Gruppe beeinflussen. Dies hatte möglicherweise Einfluss auf die Detektion der Gruppe der Diatomeen im Vergleich zwischen April und Mai sowie Anfang Juni: In den ersten beiden Monaten lagen die Resultate der Sondemessungen relativ gesehen über den ermittelten Biovolumina, während das Verhältnis am 3. Juni für die Probenahmestellen in der Hauptsperre umgekehrt war. Parallel dazu fand an den genannten Probenahmestellen eine deutliche Veränderung des Artenspektrums von *Aulacoseira italica* (April, Mai) zu kleinen centrischen Diatomeen (*Stephanodiscus alpinus*, *Cyclotella radiosia*) und *Dinobryon divergens* (*Chrysophyceae*) Anfang Juni statt. Dagegen wurden für die Grünalgen die stärksten Schwankungen im Verhältnis Chl_a/BV des gesamten Datensatzes registriert, obwohl die Artenzusammensetzung stets durch *Chlamydomonas sp.* dominiert war. Hier spielen möglicherweise auch unterschiedliche Photopigmentgehalte bedingt durch den physiologischen Zustand der Zellen eine Rolle.

Die beste Korrelation zwischen gruppenspezifischen Chlorophyll a-Konzentrationen und Biovolumina wurde für spektrale Gruppe der Diatomeen festgestellt (Spearman's $\rho=0,84$, $p<0,001$). Auch andere vergleichenden Studien zeigten für diese Gruppe die höchsten Korrelationen im Jahresverlauf bzw. in vergleichenden Untersuchungen an verschiedenen Gewässern [160], [167].

Für Cyanobakterien zeigen Studien unterschiedliche Ergebnisse: Während gute Übereinstimmungen zwischen relativen Biovolumina und Chlorophyll-a-Konzentrationen sowohl für Picocyanobacteria als auch blütenbildende Cyanobakterien gezeigt wurden [158], fanden andere Autoren deutlich schwächere Korrelationen für diese Gruppe [160], [167]. Dazu kann auch eine mögliche Fehlzuordnung

4 Diskussion

phycoerythrinhaltiger Cyanobakterien zur Gruppe der Cryptophyta beitragen [158], [167], da das zur Differenzierung genutzte Photopigmente Phycoerythrin sowohl bei Cryptophyta als auch bei einigen Cyanobakterien vorkommt.

Tatsächlich wurde auch im vorliegenden Datensatz für die Summe der Chlorophyllkonzentrationen von Cryptophyta und Cyanobakterien sowie die entsprechende Summe der Biovolumina mit 0,6 eine etwas höhere Rangkorrelation ermittelt als für die beiden Gruppen einzeln. Extreme Diskrepanzen, wie z.B. hohe Biovolumina durch *Microcystis flos-aquae* in Proben von Ende Juni und Juli, denen fast kein SONDENSIGNAL für Cyanobakterien gegenüberstand, lassen sich jedoch auch nicht durch den Vergleich der jeweiligen Einzelwerte für die beiden Gruppen erklären. In den genannten Proben trat auch im Kanal für Cryptophyta kein auffällig überhöhtes SONDENSIGNAL auf, was für eine mögliche Fehlzuordnung sprechen würde. Zudem zeigte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung vorwiegend PC-haltige Zellen in diesen Proben, womit eine Detektion durch die FP-Sonde gegeben sein sollte. Das Auftreten von *M. flos-aquae* als dichte Kolonie kann dazu geführt haben, dass die Anregungssignale der Sonde nicht tief genug in die Kolonie eindringen können, was als eine Ursache für eine Unterschätzung der Cyanobakterienkonzentration beschrieben wurde [157]. Dieser Effekt bietet jedoch keine Erklärung dafür, dass so gut wie kein Signal für Cyanobakterien in den Proben detektiert wurde.

Trotz guter Übereinstimmung der Phytoplanktonanalyse mit beiden Methoden für einen Teil der Proben bzw. der spektralen Gruppen, treten noch deutliche Diskrepanzen zwischen mikroskopischer Analyse und SONDENMESSUNG auf. Für ein verlässliches Monitoring, vor allem in Hinblick auf Cyanobakterien, sollten die SONDENMESSUNGEN daher stets mit mikroskopischen Analysen untersetzt werden. Ein Vergleich der beiden Methoden muss letztendlich immer berücksichtigen, dass Mikroskopie und SONDENMESSUNG unterschiedliche Zelleigenschaften zur Quantifizierung verwenden, die aufgrund der Veränderungen der Pigmentgehalte von Phytoplanktern im Gewässer nicht verlässlich zueinander in Bezug stehen müssen.

4.1.2 Quantifizierung und Differenzierung des autotrophen Picoplanktons mittels Durchflussszometrie

Die unbearbeiteten Plots der im Durchflussszometer gemessenen Proben weisen trotz der Verwendung eines Größen-Schwellenwertes noch einen hohen Anteil von Hintergrundsignalen geringer Größe und schwacher Chlorophyll-Fluoreszenz auf. Aufgrund der extrem hohen Anzahl detektierter kleiner Partikel, übt die Abgrenzung gegenüber diesem Hintergrund einen starken Einfluss auf die ermittelten Zellzahlen

4 Diskussion

einer Probe aus. Wie die Beispiele in Abbildung 103 zeigen, muss diese Abgrenzung für einzelne Gewässer bzw. Gewässerabschnitte angepasst und auch darin saisonal für jede Probe überprüft werden.

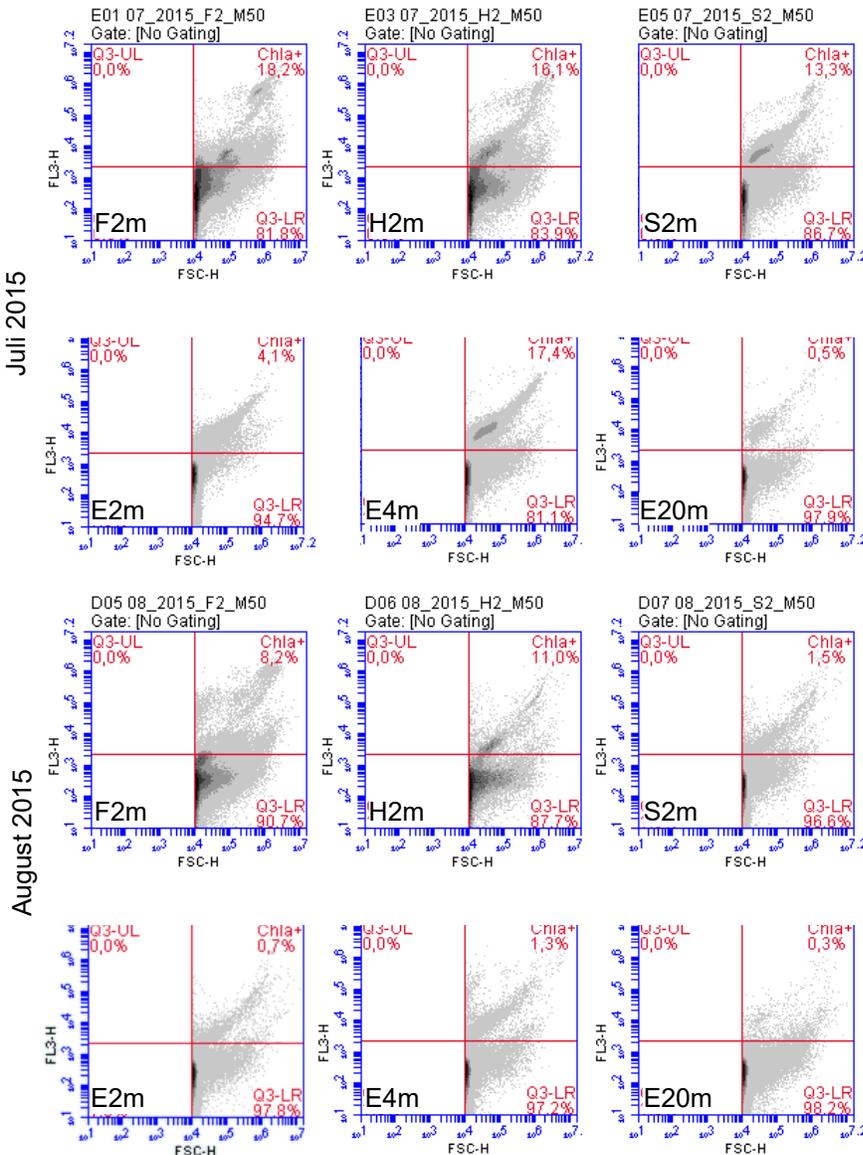


Abbildung 103: DotPlots der durchflusszytometrischen Analyse von Proben aller Untersuchungsstellen aus Juli und August 2015; Auftragung der Chlorophyll-Fluoreszenz (FL3-H) gegen ForwardScatter-Signale (logskaliert, FSC-H); Population im oberen rechten Quadrant („Chla+“) wurde in weitere Auswertungen einbezogen

Diese Anpassung der gates erhöht den Aufwand für die Auswertung der Messungen, darüber hinaus schränkt sie die Objektivität der Bearbeitung ein, da eine exakte Abgrenzung häufig nicht möglich ist. Eine Unterschätzung der Zellzahlen bei hohen Anteilen kolonieförmiger Zellen (z.B. *Aphanothece sp.*) ist möglich, wenn diese im Probenstrom nicht vollständig vereinzelt und kleinere Zellaggregate als Einzelsignal detektiert werden. Allgemein werden die geringen Volumina, die im FCM analysiert werden können, als Potential für hohe Fehlerraten gesehen (u.a. [168]), da insbesondere bei niedrigen

4 Diskussion

Konzentrationen der analysierten Partikel durch die Messung größerer Volumina eine sichere Quantifizierung erreicht wird.

4.1.3 Lokale und saisonale Entwicklung des APP

Für das PE-dominierte APP der Entnahmestelle der Talsperre Saidenbach sowie das der benachbarten oligotrophen Talsperre Neunzehnhain wurde in langfristigen Untersuchungen keine Nährstofflimitation der APP-Entwicklung festgestellt [169]. Dagegen gab es deutliche Zusammenhänge zur Entwicklung von Fraßfeinden, vor allem der Daphnien, aus denen die Autoren ableiten, dass die APP-Entwicklung vor allem im Sommer *top-down*-reguliert ist [169].

In dem hier analysierten Datensatz wurde mit der Vorsperre Forchheim und dem Unterwasservorbecken auch stärker nährstoffbeeinflusste Habitate einbezogen. An diesen beiden Untersuchungsstellen (F und H) bestanden negative Korrelationen zur Nitratkonzentration, die an den weiter stromabwärts gelegenen Untersuchungsstellen S und E nicht festgestellt wurden. An allen Untersuchungsstellen zeigten vor allem physikalische und meteorologische Parameter Einflüsse auf die Abundanz der APP-Gruppen, darunter wurden für Wasser- und Lufttemperaturen die stärksten Korrelationen festgestellt (vgl. Abbildung 49). Hinter diesen Zusammenhängen können sich jedoch auch andere saisonal variierende Größen verbergen, zu denen auch die Abundanz von Fraßfeinden zählt, die in diesen Datensatz nicht einbezogen werden konnte. Die Abundanz der Picoplankter steigt jedoch nicht linear mit der Temperatur (vgl. Abbildung 52), was auf den Einfluss weiterer Faktoren hindeutet, die den Zusammenhang überlagern. Es ist davon auszugehen, dass im Gewässer stets mehrere biotische und abiotische Faktoren auf das Wachstum der Picoplankter einwirken, deren Einfluss zudem mit zeitlicher Verzögerung wirksam werden kann, was hier nur für die meteorologischen Parameter berücksichtigt werden konnte.

Aus den fluoreszenzmikroskopischen und durchflusszytometrischen Analysen des APP geht deutlich ein Rückgang des Anteils PC-haltiger Zellen in Fließrichtung hervor. Die Dominanz des PE-APP ist auch aus anderen meso- und oligotrophen Standgewässern bekannt (u.a. [64]). Die reversible Anpassung der Zusammensetzung der äußeren Antennenpigmente als Reaktion auf die Lichtverhältnisse im Wasserkörper (chromatische Adaptation) ist für verschiedene Gattungen der *Cyanobakterien* bekannt. Marine Stämme von *Synechococcus* passen so ihre Pigmentausrüstung in küsternen Klarwasserbereichen an die Absorption von blauem Licht, in küstennahen Bereichen dagegen an die Absorption grüner Lichtbereiche an [77]). Als Indikatoren für das Lichtklima in den untersuchten Bereichen der Talsperre Saidenbach kommen z.B. Trübung bzw. Sichttiefe oder die Chlorophyll-Konzentration in Frage. Diese Parameter könnten auch aufgrund der Charakteristika der Untersuchungsstellen als

4 Diskussion

Einflussfaktoren auf das PC/PE-Verhältnis des APP vermutet werden. Die statistische Analyse der Proben aller Untersuchungsstellen zeigt jedoch nur einen sehr schwachen negativen Zusammenhang zur Sichttiefe ($R^2 = -0,24$) (Abbildung 104). Die separate Auswertung für die einzelnen Probenahmestellen kann Aufschluss über saisonal wirksame Einflussfaktoren auf das PC/PE-Verhältnis der Picoplankter geben. In der Vorsperre, wo die PC-haltigen Picoplankter dominieren, zeigt die Niederschlagssumme der 10 Tage vor der Probenahme einen positiven Einfluss auf das PC/PE-Verhältnis ($R^2 = 0,52$). An der Entnahmestelle, mit deutlicher Dominanz der PE-Picoplankter, steigt das PC/PE-Verhältnis mit der Chlorophyllkonzentration ($R^2 = 0,56$). An den Stellen H und S (Unterwasservorbecken und stromaufwärts der Unterwasserstaumauer) liegt keine so deutliche Dominanz einer der beiden Pigmentgruppen im APP vor, daher könnte an diesen Stellen eine schnellere Veränderung der Pigmentzusammensetzung als Reaktion auf Umweltbedingungen erwartet werden. Im Unterwasservorbecken ging das PC/PE-Verhältnis mit zunehmender Sichttiefe zurück, ($R^2 = -0,66$), stromaufwärts der Unterwasserstaumauer (Stelle S) hingegen bestand ein negativer Zusammenhang zur DIC-Konzentration ($R^2 = -0,54$).

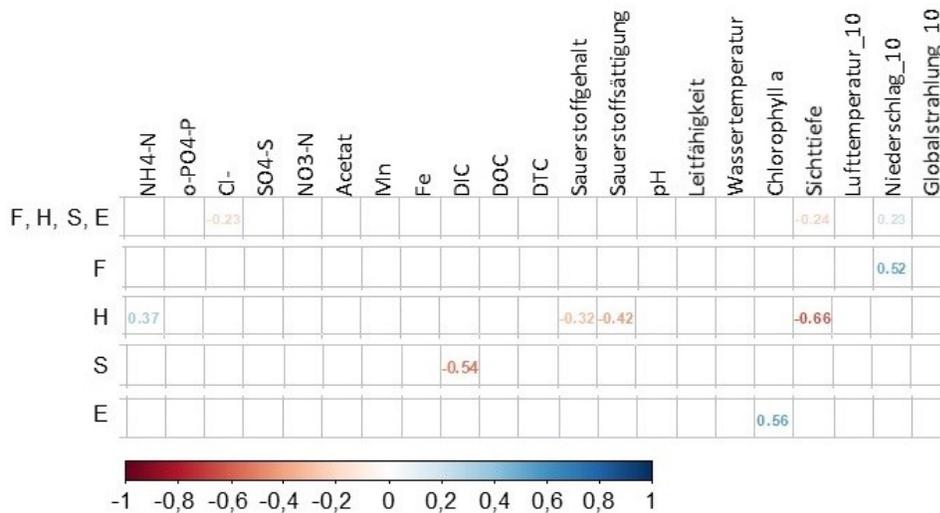


Abbildung 104: Korrelationen des PC/PE-Verhältnisses mit Umweltfaktoren in 2 und 4m Wassertiefe der Untersuchungsstellen

4 Diskussion

4.2 Bacteria

4.2.1 Quantifizierung und Differenzierung der *Bacteria* und ihrer Untergruppen anhand zellbasierter Verfahren

Bakterielle Gesamtzellzahlen in mesotrophen Gewässern liegen typischerweise zwischen $1,7$ und $6,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml [170]. Die für die Talsperre Saidenbach und Vorsperre Forchheim mikroskopisch bestimmten Gesamtzellzahlen lagen in diesem Bereich und zeigten erwartungsgemäß einen Rückgang in Fließrichtung. Die Mittelwerte der Proben von 2013 bis 2015 in 2 m Wassertiefe betragen in der Vorsperre $5,12 \cdot 10^6$ Zellen/ml, im Unterwasservorbecken (H) $4,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, im Hauptbecken der Talsperre erreichten sie $3,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml und $3,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml an den Untersuchungsstellen S und E. Die Abundanz des Bakterioplanktons in 2 m und in 20 m Wassertiefe wies keine stark ausgeprägten Korrelationen mit den untersuchten Umweltfaktoren auf (Abbildung 105).

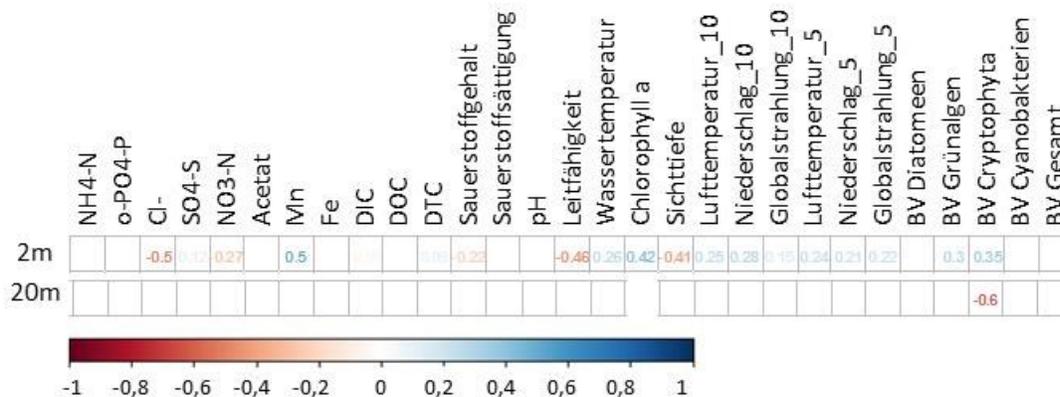
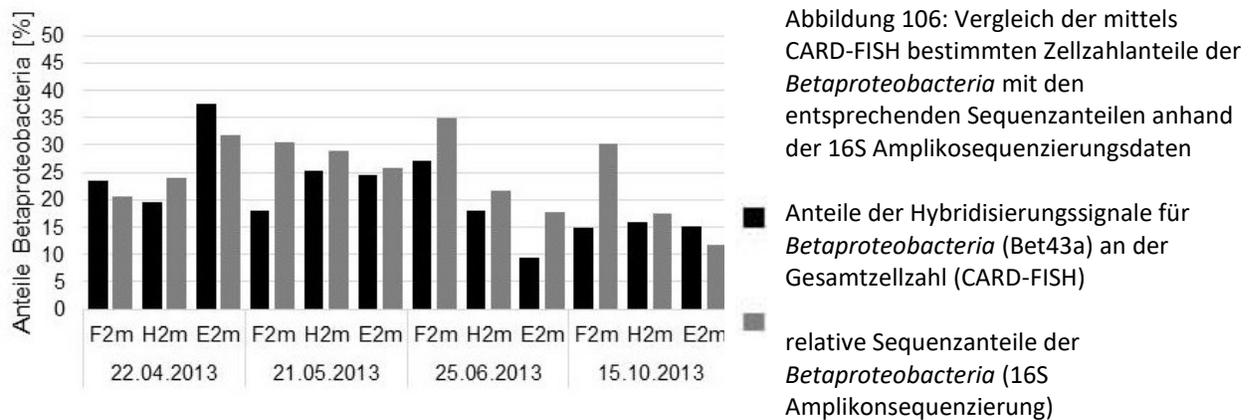


Abbildung 105: Korrelationen der bakteriellen Gesamtzellzahl (PI-Färbung) mit den untersuchten Umweltfaktoren für Proben aus 2 m Wassertiefe aller Untersuchungsstellen und 20 m Wassertiefe der Stelle E

Für die *Alpha-* und *Betaproteobacteria* wurden mittels CARD-FISH die Anteile der Zellzahlen an der Gesamtzellzahl im Jahresverlauf bestimmt. Neben der bereits diskutierten Spezifität der jeweiligen Sonden spielt für die Detektion der Zielzellen mittels CARD-FISH die Zugänglichkeit der Bindestellen an der 16S rRNA eine wesentliche Rolle. Dabei ist zunächst die Permeabilisierbarkeit der Zelle für die Sonde entscheidend, welche u.a. durch die gewählte Fixierung beeinflusst wird. Enthalten die Proben höhere Anteile extrazellulärer Matrix mit unspezifischer Affinität zur Sonde, steht diese möglicherweise nicht mehr in ausreichender Konzentration zur Detektion der Zellen zur Verfügung. Darüber hinaus wird die mikroskopische Erfassung der markierten Zellen durch das unspezifische Fluoreszenzsignal erschwert. Insbesondere die mikroskopische Detektion kleiner Zellen, wie sie als *Ultramicrobacteria* für mehrere typische Süßwasser-Vertreter des Bakterioplanktons beschrieben wurden, kann durch unspezifisch

4 Diskussion

markierte oder autofluoreszente Hintergrundmatrix beeinträchtigt werden. Während die *in-silico*-Analyse der Sondenspezifität für die *Alphaproteobacteria* einen größeren Einfluss unspezifischer Bindungen und den Ausschluss einiger Gruppen der *Alphaproteobacteria* zeigte, können für die Quantifizierung der *Betaproteobacteria* anhand der Sonde Bet43a zuverlässigere Ergebnisse erwartet werden. Zellbasierte Quantifizierungsverfahren können insbesondere zur Überprüfung molekularbiologischer Methoden verwendet werden, da mögliche Verzerrungen der Zusammensetzung der Probe z.B. durch die DNA-Isolation oder präferentielle Amplifikation während der PCR bei diesen Verfahren nicht zum Tragen kommen. Abbildung 106 zeigt die mittels CARD-FISH bestimmten Zellzahlanteile der *Betaproteobacteria* im Vergleich mit deren Sequenzanteilen an denen der *Bacteria* aus der 16S-Amplikonsequenzierung.



Aufgrund der Separation von Größenklassen für die molekularbiologische Untersuchung des Bakterioplanktons können nur die zwölf Proben verglichen werden, für die Sequenzierungsdaten aus beiden Größenklassen vorliegen. Für diese Proben zeigt der Vergleich vor allen an den Untersuchungsstellen H und E häufig eine gute Übereinstimmung der jeweiligen Anteile, mit einer Ausnahme der Probe der Stelle E von April 2013. In der Vorsperre Forchheim wurde der Anteil der *Betaproteobacteria* an der Gesamtzellzahl durch die CARD-FISH im Juni und Oktober geringer eingeschätzt als anhand der Sequenzierung. Die Proben aus der Vorsperre wiesen im Unterschied zu denen der anderen Untersuchungsstellen häufig eine stärkere fluoreszente Hintergrundmatrix auf, was zu einer Beeinträchtigung der Detektion führen kann. Die Anteile der *Betaproteobacteria* in Seen werden auf Basis von FISH-Analysen mit ca. 16 % (3 - 20 %) angegeben [171], diese Angaben könnten jedoch noch eine Unterschätzung im Vergleich zu Ergebnissen der sensitiveren CARD-FISH darstellen. Die Zellzahlenanteile der *Betaproteobacteria* zeigten in 2 m Wassertiefe einen schwachen negativen Zusammenhang zum Cyanobakterienbiovolumen und einen positiven Zusammenhang zur Nitratkonzentration. In 20 m Wassertiefe gingen höhere Anteile mit höherem Sauerstoffgehalt und –sättigung sowie einer niedrigeren Wassertemperatur einher (Abbildung 107).

4 Diskussion

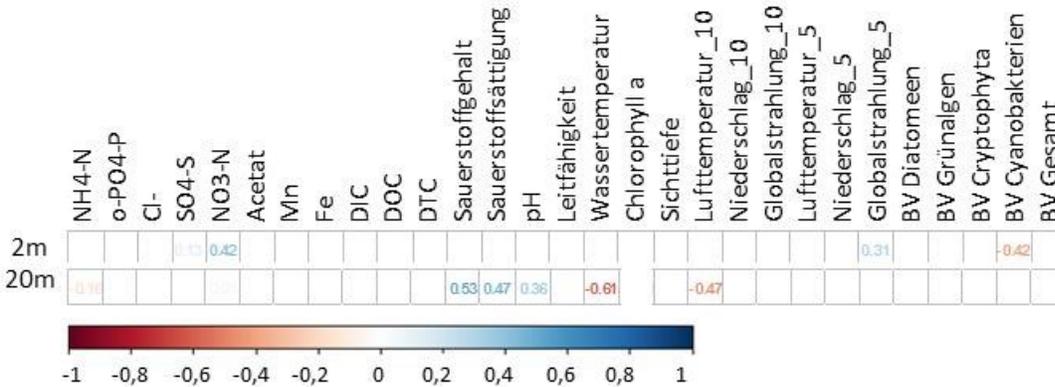


Abbildung 107: Korrelationen der Anteile der Hybridisierungssignale der Betaproteobacteria (Bet42a) an der Gesamtzellzahl mit den untersuchten Umweltfaktoren für Proben aus 2 m und 20 m Wassertiefe

Für die *Alphaproteobacteria* wurden die Zellzahlenanteile und die Sequenzanteile durch beide Methoden für die Mehrheit der Proben in ähnlicher Größenordnung detektiert, wobei die Resultate der CARD-FISH meist über denen der Sequenzierung lagen (Abbildung 108). Ausnahmen stellen die Proben von Oktober dar, in denen ein deutlicher Anstieg der Sequenzanteile der *Alphaproteobacteria* durch die CARD-FISH nicht widerspiegelt wurde. In diesen Proben zeigte die Sequenzierung einen deutlichen Anstieg des Anteils der LD12-clade (*C. Pelagibacter*), für die extrem kleine Zellgrößen charakteristisch sind. Dies hat möglicherweise zu der deutlichen Unterschätzung der Zellzahlenanteile durch die CARD-FISH beigetragen.

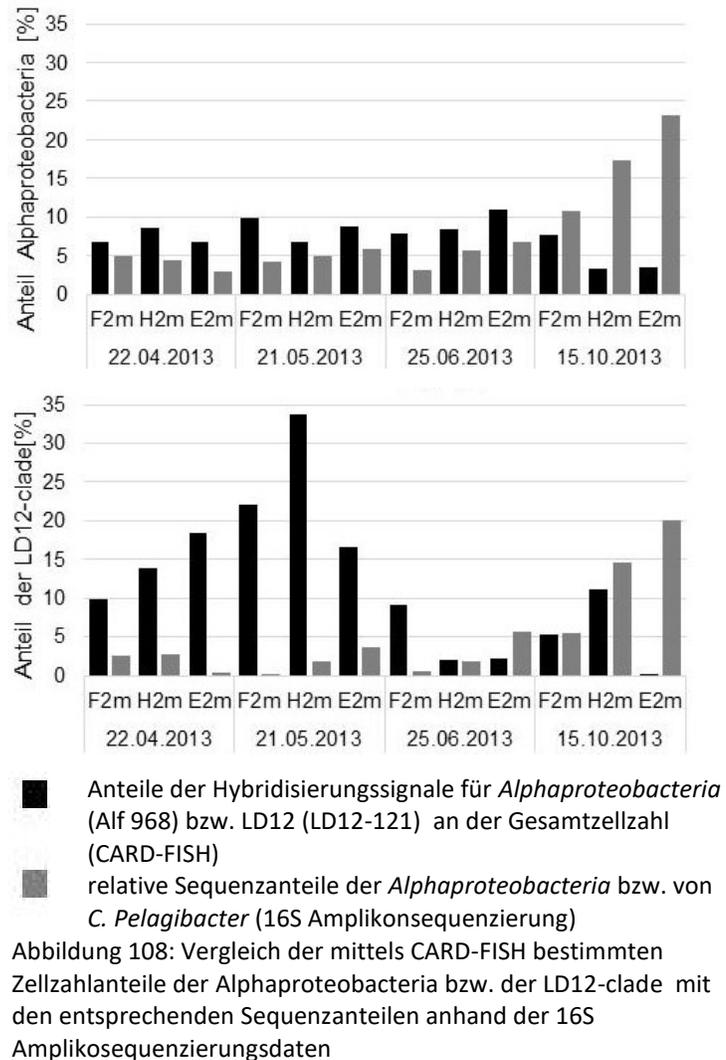


Abbildung 108: Vergleich der mittels CARD-FISH bestimmten Zellzahlenanteile der Alphaproteobacteria bzw. der LD12-clade mit den entsprechenden Sequenzanteilen anhand der 16S Amplikonsequenzierungsdaten

Die Zellzahlenanteile der mit der Sonde LD12-121 detektierten Vertreter der *Alphaproteobacteria* liegen sehr deutlich über den entsprechenden Sequenzanteilen aus der 16S-Amplikonsequenzierung. Die

4 Diskussion

Quantifizierung dieser sehr kleinen Zellen birgt möglicherweise hohe Zählfehler, zudem sind eventuell die publizierten Hybridisierungsbedingungen nicht auf andere Gewässer übertragbar.

4.2.2 Diversität und raum-zeitliche Variation der bakteriellen Gemeinschaft anhand DNA-basierter Methoden

Die Generierung reproduzierbarer DGGE-Profile durch unabhängige PCR-Amplifikationen und Gelläufe wurde für ca. ein Drittel der Proben (66 von 230) anhand der DGGE für *Bacteria* überprüft. Der Vergleich der entsprechenden Proben zeigte eine sehr zuverlässige Übereinstimmung der erhaltenen Bandenmuster. Die DGGE-Analyse des für die *Bacteria*-DGGE verwendeten DNA-Fragmentes anhand der untersuchten Klone zeigte, dass teilweise DGGE-Signale auf gleicher oder sehr ähnlicher Höhe von Klonen verschiedener taxonomischer Gruppen gebildet werden. Darüber hinaus wiesen auch Klone, die der gleichen taxonomischen Einheit zugeordnet werden, Signale in unterschiedlichen Höhen im DGGE-Gel auf. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt für Vertreter der *Cytophagaceae* und *Flavobacteriaceae* (*Bacteroidetes*) sowie der Gattung *Limnohabitans* (*Betaproteobacteria*). Beide Phänomene können durch Eigenschaften des verwendeten DNA-Fragments sowie durch Artefakte der PCR oder der Migration der Fragmente im DGGE-Gel verursacht werden. Das Migrationsverhalten der DNA-Fragmente im Gel hängt sowohl vom GC-Gehalt als auch von der Basensequenz ab [172]. So können fast identische Banden durch DNA-Fragmente verschiedener Taxa mit gleichem GC-Gehalt gebildet werden, andererseits können aber auch Mikroheterogenitäten im amplifizierten Bereich der 16S rDNA zur Ausprägung mehrerer Banden durch eine Gattung führen [173], [174], [175]. Die Entstehung chimärer Amplifikationsprodukte aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Organismen während der PCR führt zur Entstehung zusätzlicher DGGE-Signale, die keine taxonomische Einheit repräsentieren [172]. Darüber hinaus kann es während des Gellaufs zur Co-Migration verschiedener DNA-Fragmente kommen, die dann ein gemeinsames DGGE-Signal bilden (Sekiguchi et al., 2001). Die Untersuchung des *Bacteria*-DGGE-Fragmentes anhand von Klonen zeigte, dass für einen Teil der Organismen (*Arcicella*, *Flavobacterium*, *Limnohabitans*, *hgc-I-clade*) mehrere DGGE-Signale auftraten. Der Vergleich mit den Sequenzen des DGGE-Fragmentes ergab, dass geringfügige Sequenzunterschiede zu diesem unterschiedlichen Laufverhalten der Fragmente führten. Hinsichtlich der Clusteranalyse kann dadurch die Ähnlichkeit von Proben zueinander verdeckt bzw. unterschätzt werden. Die Banden der beiden abundanten Gattungen *Limnohabitans* (*Betaproteobacteria*) und *Sediminibacterium* (*Bacteroidetes*) bildeten identische DGGE-Signale, was für die Clusteranalyse der Proben zu einer Überschätzung der Ähnlichkeit zwischen Proben zur Folge haben kann. Der amplifizierte Bereich der 16S rDNA beider Organismen ist nicht sequenzidentisch, auch der GC-Gehalt unterscheidet sich, wenn auch nur geringfügig (*Sediminibacterium* 49 % GC, *Limnohabitans* 53 % GC). Das angesprochene

4 Diskussion

Phänomen der Co-Migration kann als Ursache ausgeschlossen werden, da die Fragmente aus der DNA der jeweiligen Klone unabhängig voneinander im Gellauf die gleiche Position einnahmen. Eventuell erreichen die DNA-Fragmente beider Organismen aufgrund gebildeter Sekundärstrukturen trotz Sequenzunterschieden zufällig die gleiche Gelposition.

In der DGGE für die Gattung *Synechococcus* wird nach einer vorangehenden spezifischen PCR der für die DGGE verwendete 16S rDNA-Abschnitt ebenfalls mit den Primern 341F/R518 reamplifiziert. Hier traten häufig je Probenahmestelle und –zeitpunkt unterschiedliche charakteristische Bandenmuster auf, die Sequenzunterschiede zwischen diesen erwiesen sich jedoch als sehr gering. Die Auftrennung der entsprechenden DNA-Fragmente aus Reinkulturen der Gattung *Synechococcus* zeigte jeweils nur ein bzw. in einem Fall zwei DGGE-Signale. Eventuell liegen Mikroheterogenitäten in der 16S rDNA zwischen den in den Proben auftretenden Stämmen der Gattung *Synechococcus* vor. Die z.T. deutlich unterschiedliche Gelposition der Fragmente deutet aber darauf hin, dass auch verschiedene Sekundärstrukturen für das Laufverhalten eine Rolle spielen. In der DGGE für *Alphaproteobacteria* wurden deutlich weniger solcher Phänomene beobachtet. Einzelne Klone der Gattung *Roseomonas* sowie von *C. Pelagibacter* ergaben zwei unterschiedliche DGGE-Signale ähnlicher Laufhöhe. Eventuell werden in dem mit den Primern 341/R518 (DGGE *Bacteria* und *Synechococcus*) amplifizierten DNA-Fragment einiger Gattungen instabile Sekundärstrukturen gebildet, die sich bereits durch den Austausch einzelner Basen umorganisieren und ein deutlich verändertes Migrationsverhalten im Gel ergeben.

Die Quantifizierung der OTUs und Taxa durch die Amplikonsequenzierung des verwendeten 16S rRNA-Abschnitts kann aufgrund der Spezifität der verwendeten Primer (s. Tabelle 24) sowie durch unterschiedliche 16S rDNA-Kopienzahlen unter den bakteriellen Taxa verzerrt werden. Die Kopienzahl des 16S rDNA-Gens variiert vor allem auf Ebene der Familien und Gattungen, insbesondere bei den *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria* und *Fusobacteria*, auf Artniveau hingegen besteht abgesehen von Ausnahmen eine höhere Konstanz [176]. Von einer Korrektur dieses Effekts wird jedoch mangels detaillierter Daten abgeraten, da die Übertragbarkeit der Kopienzahlen sequenzierter Genome auf phylogenetisch verwandte Organismen nicht zuverlässig möglich ist [177]. Die taxonomische Differenzierung anhand 16S-Amplikonsequenzierung hängt u.a. von der Diversität der Proben sowie der Anzahl der gemeinsam sequenzierten Proben ab. In den Proben der Größenfraktion >5µm ist von einer weniger hochaufgelösten Sequenzierung auszugehen, da im Vergleich mit den anderen Proben zusätzlich hohe Anteile von Chloroplasten eukaryotischer Algen erfasst wurden. Die beginnende Abflachung der rarefaction-curves deutet jedoch darauf hin, dass ein sehr hoher Teil der Diversität der Proben erfasst wurde und davon

4 Diskussion

ausgegangen werden kann, dass die quantitativ relevanten OTUs und Taxa anhand der Daten zuverlässig abgebildet werden.

Die Veränderung der Zusammensetzung des Bakterioplanktons im Jahresverlauf an den verschiedenen Untersuchungsstellen wurde anhand der Bandenmuster der DGGE für *Bacteria* sowie auf Grundlage relativer OTU-Abundanzen aus den Daten der Amplikonsequenzierung untersucht. Für beide Datensätze wurden zur Erkennung von Ähnlichkeiten und Unterschieden zwischen den Proben Clusteranalysen und NMDS durchgeführt. Die Zusammenhänge zu Umweltfaktoren wurden mittels vector fitting in Bezug auf die Ergebnisse der NMDS untersucht. Für die Analyse der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft anhand von DGGE-Profilen spielt neben der bereits diskutierten Generierung unterschiedlicher DGGE-Signale durch ein Taxon bzw. Überlagerung der DGGE-Signale verschiedener Taxa auch das Auflösungsvermögen eine Rolle, da Banden sehr ähnlicher Laufhöhe nur bis zu einem gewissen Grad noch unterschieden werden können. Dies hängt neben der Diversität der Probe von der taxonomischen Breite durch die verwendeten Primer erfassten Organismen ab. Zudem muss die Abundanz eines Taxons in der Probe ausreichen, um ein detektierbares DGGE-Signal zu generieren. Im Unterschied zur 16SrDNA-Amplikonsequenzierung konnten mittels DGGE jedoch deutlich mehr Proben analysiert werden, sodass der saisonale Verlauf detaillierter erfasst wurde. Ein hauptsächlicher Unterschied zwischen beiden Methoden besteht darin, dass bei Pyrosequenzierungsdaten die relativen Abundanzen der OTUs einbezogen werden, während DGGE-Banden nur qualitativ als Präsenz-Absenz-Daten ausgewertet werden. Darüber hinaus wurden verschiedene Abschnitte der 16S rDNA für die beiden Analysen genutzt. Die Clusteranalysen anhand der beiden Methoden zeigten übereinstimmend saisonale Ähnlichkeiten zwischen den Proben, wobei der Trend anhand der Daten aus der Pyrosequenzierung noch ausgeprägter war. Auch die stärkere Ähnlichkeit zwischen den Proben der Vorsperre und denen aus dem Unterwasservorbecken der Talsperre wird in beiden Datensätzen deutlich. Hinsichtlich der für die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft maßgeblichen Umweltparameter führen die beiden Methoden teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen, wie Tabelle 36 anhand geeigneter Teildatensätze zeigt.

Jahr/Größenfraktion		2013 < 5µm		2013 > 5µm		2014 < 5µm	
Probenanzahl		12	25	12	25	18	40
Untersuchungsmethode		454	DGGE	454	DGGE	454	DGGE
chemische Parameter	NH ₄ -N				0,3*		
	o-PO ₄ -P		0,3*	0,7*	0,3**		
	Chlorid						0,3**
	SO ₄ -S		0,3*			0,5*	
	NO ₃ -N		0,4*	0,8**	0,3*	0,7**	
	Acetat			0,5		0,6**	0,1
	Mn		0,2	0,6			
	Fe						
	DIC						0,3**
	DOC			0,7*	0,3*	0,5*	
	DTC				0,2		
physikalische Parameter	Sauerstoff (mg/l)		0,3	0,8**	0,3		0,4***
	Sauerstoff (%)			0,7*	0,4*	0,5*	0,3**
	pH	0,5	0,3*	0,6*		0,5*	0,2
	Leitfähigkeit						0,5***
	Wassertemperatur		0,4*	0,7*	0,4*	0,9**	
	Chlorophyll a	0,9**				0,4	0,3**
	Sichttiefe	0,9**	0,4**		0,5**		0,6***
meteorologische Parameter	10-Tages-Mittel Lufttemperatur					0,9***	
	10-Tages-Summe Niederschlag			0,9**	0,2*		
	10-Tages-Mittel Globalstrahlung					0,9***	0,2*
	5-Tages-Mittel Lufttemperatur					0,9**	
	5-Tages-Summe Niederschlag			0,9**	0,3*	0,6*	
	5-Tages-Mittel Globalstrahlung					0,8***	0,2*
	Phytoplankton	Diatomeen ¹	(nicht durchgeführt)				
Grünalgen ¹		(nicht durchgeführt)				0,5*	0,3*
Cryptophyta		(nicht durchgeführt)					0,2*
Cyanobakterien		(nicht durchgeführt)				0,7***	
Gesamtbiovolume		(nicht durchgeführt)				0,7***	0,2**

Tabelle 36: Zusammenhänge von Umweltparametern sowie Biovolumina von Phytoplanktongruppen und der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Vergleich zwischen Daten aus der 16S rDNA-Amplikonsequenzierung (454) und der DGGE spezifisch für *Bacteria*,
 *** = p-Value ≤ 0.001
 ** = p-Value ≤ 0.01
 * = p-Value ≤ 0.05
 . = p-Value ≤ 0.1
¹: als spektrale Gruppen: Diatomeen incl. Chrysophyceen, Haptophyceen, Dinophyceen; Grünalgen incl. Desmidiaceen

Ein deutlicher Unterschied betrifft die Relevanz meteorologischer Faktoren für die Bakterioplanktonzusammensetzung im Jahr 2014 (< 5 µm). Anhand der Daten aus der Sequenzierung spielen hier alle untersuchten meteorologischen Parameter sowie die Wassertemperatur eine z.T. hochsignifikante Rolle, während auf die bakterielle Struktur gemäß den DGGE-Profilen nur die

4 Diskussion

Globalstrahlung signifikanten Einfluss hat. Im Unterschied dazu weist die Analyse auf Basis der DGGE-Profile in höherem Maße physikalische Parameter (v.a. Sichttiefe und Chlorophyll-a-Konzentration, Sauerstoffkonzentration, Leitfähigkeit) als relevante Einflussfaktoren aus. Die Biovolumina verschiedener Phytoplanktongruppen zeigen deutlichere Zusammenhänge zur mikrobiellen Gemeinschaft auf Basis der Sequenzierungsdaten, jedoch werden auch anhand der DGGE-Profile Diatomeen-Biovolumen und Gesamtbiovolumen als relevante Faktoren deutlich. Für die Bakterioplanktonzusammensetzung $< 5 \mu\text{m}$ von 2013 zeigen beide Analysen übereinstimmend weniger Zusammenhänge zu Umweltparametern, die Sichttiefe und nach Sequenzierungsdaten auch die Chlorophyllkonzentration sind dabei die Parameter mit der höchsten Signifikanz. Verschiedene chemische Parameter zeigen Zusammenhänge zu den DGGE-Profilen, nicht jedoch zur mikrobiellen Struktur gemäß den Sequenzierungsdaten. Für die Bakterioplanktonzusammensetzung $> 5 \mu\text{m}$ des Jahres 2013 bestehen die meisten Übereinstimmungen zwischen den beiden Methoden, eventuell spielt hier die höhere Abundanz der Chloroplasten-Sequenzen eine Rolle. Beide Verfahren weisen für Phosphat-, Nitrat- und DOC-Konzentration, Sauerstoffgehalt- und -sättigung, Wassertemperatur und Niederschlagssummen im Vorfeld der Probenahme signifikante Zusammenhänge zur Bakterioplanktonzusammensetzung aus.

Sowohl anhand der Amplikonsequenzierungsdaten als auch an den DGGE-Profilen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Proben der beiden Größenfraktionen, die auch in den jeweiligen Clusteranalysen getrennte Cluster bilden. Die DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaft an der Entnahmestelle (2 m Wassertiefe) der Talsperre Saidenbach zeigten für die Größenfraktion $>5\mu\text{m}$ häufiger jahresübergreifende Gemeinsamkeiten als für die Fraktion $< 5 \mu\text{m}$. Vor allem im Frühjahr und Frühsommer traten Cluster der entsprechenden Zeitpunkte der Jahre 2013 bis 2015 auf. Die Mehrheit der Proben des Jahres 2013 bildete jedoch ein separates Cluster, während zwischen den Proben von 2014 und 2015 häufiger Gemeinsamkeiten auftreten. Daran haben die meteorologischen Bedingungen des Jahres 2013 mit der verspäteten und verkürzten Frühjahrzirkulation sowie dem Starkregenereignis Anfang Juni höchstwahrscheinlich einen großen Anteil. Wie aus aktuellen Studien hervorgeht, haben die Schichtungs- und Zirkulationsverhältnisse vor allem in meso- und oligotrophen Gewässern einen starken Einfluss auf die Entwicklung der Organismen, insbesondere der des Phytoplanktons: Verlängerte Frühjahrzirkulationsphasen durch milde Winter ohne Eisbedeckung ermöglichen Diatomeen ein längeres Verbleiben in der euphotischen Zone, sodass trotz geringer Nährstoffbelastung höhere Biovolumina gebildet können. Wird die Dauer der Frühjahrzirkulation durch eine schnelle Erwärmung der Wassersäule verkürzt, stehen mehr Nährstoffe für die sommerliche Phytoplanktonentwicklung zur Verfügung. In dieser können die auftriebsaktiven Cyanobakterien gegenüber anderen Phytoplanktern durch länger andauernde

4 Diskussion

und stabilere Sommerstagnationsphasen zusätzlich begünstigt sein [87]. Die DGGE-Profile der Proben < 5 µm der Monate Juli-September 2013, September – November 2014 und August 2015 bildeten jedoch ein gemeinsames Cluster, was in Anbetracht der Starkniederschläge Anfang Juni 2013 überraschend ist. Die Gemeinschaft der frei lebenden Bakterien reagiert möglicherweise weniger stark auf singuläre Ereignisse als die Fraktion > 5 µm mit den partikelassoziierten Bakterien und insbesondere dem Phytoplankton. Anhand der 16S-Amplikon-Sequenzierungsdaten wurden Proben der Größenfraktion <5µm gleicher Saisonabschnitte aus den Jahren 2012 und 2014 ebenfalls häufig in gemeinsame Cluster gestellt. Die Analyse zeigt insgesamt, dass bei entsprechenden Randbedingungen durchaus wiederkehrende Muster der bakteriellen Gemeinschaft auftreten, diese jedoch auch deutlich durchbrochen werden können.

Anhand von DGGE-Profilen größenfraktionierter Proben (> 5 µm und 5 - 0,2 µm, Primer 341F/907R) stellten Rösel und Kollegen [178] sowie Allgaier & Grossart [27] ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Profilen der beiden Größenfraktionen fest. Dabei wiesen die Bandenmuster der frei lebenden Bakterien (< 5 µm) wie in den hier untersuchten Profilen eine stärkere Ähnlichkeit untereinander auf, wogegen die Profile für die Größenfraktion > 5 µm eine stärkere saisonale Dynamik zeigten. Für die partikelassoziierten Bakterien wurden von Rösel und Kollegen Korrelationen zu Nährstoffen (Nitrat, Ammonium, Gesamtstickstoff), der Abundanz verschiedener Phytoplanktongruppen und der Wassertemperatur gefunden. Im oligotrophen Stechlinsee waren vor allem physikalische Größen (Wassertemperatur, Leitfähigkeit, Sichttiefe) und das Zooplankton von Bedeutung für die mikrobielle Gemeinschaft > 5µm, im mesotrophen Gewässer Breiter Luzin spielten vor allem das Phytoplankton und der Gesamtphosphor eine Rolle [27]. Die Struktur der frei lebenden Bakterien zeigte in den Daten von Rösel und Kollegen keine signifikanten Korrelationen zu den einbezogenen Umweltparametern. In der Studie von Allgaier und Grossart (2006) zeigten verschiedenste Parameter (Nährstoffe, physikalische Größen, Zooplankton, Phytoplankton) Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft < 5µm, für jeden der vier untersuchten Seen spielten dabei jedoch nur einzelne, unterschiedliche Parameter eine Rolle. Im mesotrophen Breiten Luzin waren z.B. die Wassertemperatur, Leitfähigkeit, Gesamtstickstoff und -phosphat und das Phytoplankton als Einflussfaktoren signifikant. Die Zusammensetzung der nicht nach Größenklassen fraktionierten bakteriellen Gemeinschaft des eutrophen Lake Mendota zeigte anhand von ARISA ebenfalls jährlich wiederkehrende saisonale Muster und reagierte dabei im Jahresverlauf am stärksten auf die Wassertemperatur und thermische Durchmischungsereignisse, darüber hinaus wurden Zusammenhänge zu den Konzentrationen an Sauerstoff, Nitrat und Nitrit festgestellt [179]. Anhand der gleichen Methodik wurde in sechs huminstoffreichen Flachseen eine zeitlich synchrone

4 Diskussion

Phytoplanktodynamik belegt, die durch meteorologische Faktoren wesentlich gesteuert wurde. Die Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft hing wesentlich von der Phytoplanktodynamik ab, erwies sich dabei aber als gewässerspezifisch [180]. Van der Gucht und Kollegen fanden anhand der DGGE-Profile (Primerkombination 341F/R518) nicht größenfraktionierter Proben ebenfalls ausgeprägtere Unterschiede der bakteriellen Gemeinschaft zwischen den vier untersuchten Seen als im Jahresgang der einzelnen Gewässer [181].

Anhand der hier analysierten DGGE-Profile wurden für die freilebenden Bakterien in allen untersuchten Jahren statistische Zusammenhänge zu Sauerstoffgehalt, pH, Wassertemperatur und Sichttiefe nachgewiesen, die chemischen Parameter incl. Nährstoffe zeigten in jedem Jahr andere Relationen zu den DGGE-Profilen. 2015 wiesen im Unterschied zu den anderen Jahren alle meteorologischen Faktoren hochsignifikanten Einfluss auf die DGGE-Profile auf, dies gilt gleichermaßen für die Profile $> 5 \mu\text{m}$. Für diese wurden signifikante Zusammenhänge zu Sauerstoffgehalt, Wassertemperatur und Sichttiefe sowie zu Ammonium-Konzentration und dem Cyanobakterien-Biovolumen in allen Jahren nachgewiesen.

Anhand der Daten aus der 16S rDNA Amplikonsequenzierung wurden für Proben der Größenfraktion $< 5 \mu\text{m}$ der Jahre 2012 bis 2014 übereinstimmend Zusammenhänge zwischen der bakteriellen Gemeinschaft und pH-Wert sowie Chlorophyll a-Konzentration festgestellt. Bezüglich der Nährstoffkonzentrationen bestanden in den Proben der drei Jahre unterschiedliche Zusammenhänge. Im Unterschied zu den Jahren 2012 und 2013 zeigte die Analyse der Proben von 2014 einen starken Einfluss meteorologischer Faktoren auf die Bakterioplanktonzusammensetzung, der anhand der entsprechenden DGGE-Profile nicht festgestellt wurde. Proben der Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$ wurden mittels Amplikonsequenzierung nur aus dem Jahr 2013 untersucht, für diese zwölf Proben stand die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in Zusammenhang mit Nitrat, Sauerstoffgehalt und Niederschlagssumme im Vorfeld der Probenahme. Zusammenhänge zwischen der bakteriellen Gemeinschaft und hydrophysikalischen Parametern, vor allem Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Wassertemperatur, wurden auch anhand von 16SrDNA-Amplikonsequenzierungsdaten verschiedener Gewässer festgestellt [182], [183], [184], darüber hinaus zeigen in den verschiedenen Studien jeweils unterschiedliche Parameter Zusammenhänge zur Bakterioplanktonzusammensetzung.

Der Literaturvergleich sowie die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Zusammenhänge zwischen der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft und den Umweltfaktoren hochkomplex und multifaktoriell sind. Sie variieren zwischen den Gewässern und in verschiedenen Jahren können unterschiedliche

4 Diskussion

Parameter von Bedeutung sein. Konsistentere saisonale Muster und Relationen zu Umweltfaktoren bestehen z.T. für die Abundanz einzelner Gruppen [185]. Neben der Komplexität der Interaktionen zwischen den biotischen und abiotischen Faktoren im Gewässer spielen möglicherweise auch verschiedene Zeitskalen für die Detektion von Zusammenhängen eine Rolle, da die Organismen mit zeitlicher Verzögerung auf die Änderung eines Umweltfaktors reagieren. Zudem können nicht immer alle relevanten Faktoren in das Untersuchungsprogramm einbezogen werden, im vorliegenden Fall wurde zum Beispiel der Einfluss des *grazing*, was für verschiedene Bakterioplanktongruppen von hoher Relevanz ist, nicht analysiert.

4.2.3 Phylogenetische Einordnung und ökologisches Verhalten abundanter Taxa

Ergebnisse zahlreicher Studien (u.a. [15], [22], [180]) haben gezeigt, dass in verschiedenen Süßwasserökosystemen aufgrund ähnlicher Selektionsmechanismen innerhalb der Phyla bestimmte Bakteriengruppen (sog. freshwater lineages) typischerweise dominant vorkommen. Diese Vertreter wurden auch in den hier untersuchten Proben der Talsperre Saidenbach und der Vorsperre Forchheim anhand von DGGE, Klonierung und 16SrDNA-Amplikonsequenzierung dominant nachgewiesen. Für einen Teil dieser Gruppen sollen die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse sowie die Zusammenhänge zu Umweltparametern näher betrachtet werden.

4.2.3.1 *Actinobacteria*

Vertreter der Süßwasser-clade *aci* dominieren das Phylum *Actinobacteria* und erreichen oft die höchsten Abundanzen unter den Bakterien in verschiedenen Süßwasserökosystemen insgesamt (u.a. [186]). Für die überwiegend frei lebenden Bakterien dieser Gruppe ist eine oligotrophe Lebensweise und eine Präferenz für neutrale bis schwach alkalische Gewässer bekannt [15], [187], [33] [30]. In der für die Identifizierung verwendeten Silva reference files (release 128) werden die zugehörigen Sequenzen als *hgcl*-clade (*Sporichthyaceae*) klassifiziert. Die Mehrheit dieser Sequenzen wird in beiden Sequenzierungen in drei OTUs eingeordnet, in der Sequenzierung der Proben von 2012/2014 treten darüber hinaus mehr OTUs mit geringeren Sequenzanteilen auf. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass ca. 230 bp längere Sequenzen gewonnen wurden und in diesem Bereich weitere Sequenzunterschiede liegen können. Zum aktuellen Zeitpunkt ist aus der Literatur noch kein Isolat der *aci*-Linie bekannt. Anhand einer gemischten Anreicherungskultur wurde durch Jezbera und Kollegen eine Beschreibung für *Candidatus Planktophila limnetica* erstellt (*C. Planktophila limnetica* MWH-EgelM2-3.*aci*), die zur *aci*-All clade (nach [30]) zugeordnet wurde. Anhand einer Ausdünnungsstrategie konnten Neuenschwander und Kollegen Genomsequenzierungen durchführen, die eine weitere Differenzierung innerhalb der *aci*-clade zeigten

4 Diskussion

(Neuenschwander, S.M., Salcher, M., Ghai, R. and Pernthaler, J.: High microdiversification within the ubiquitous *act* lineage of *Actinobacteria*; 28-Jun-2016, unveröffentlicht).

Abbildung 109 zeigt die phylogenetischen Verhältnisse zwischen den hier erhaltenen OTUs und den genannten Isolaten.

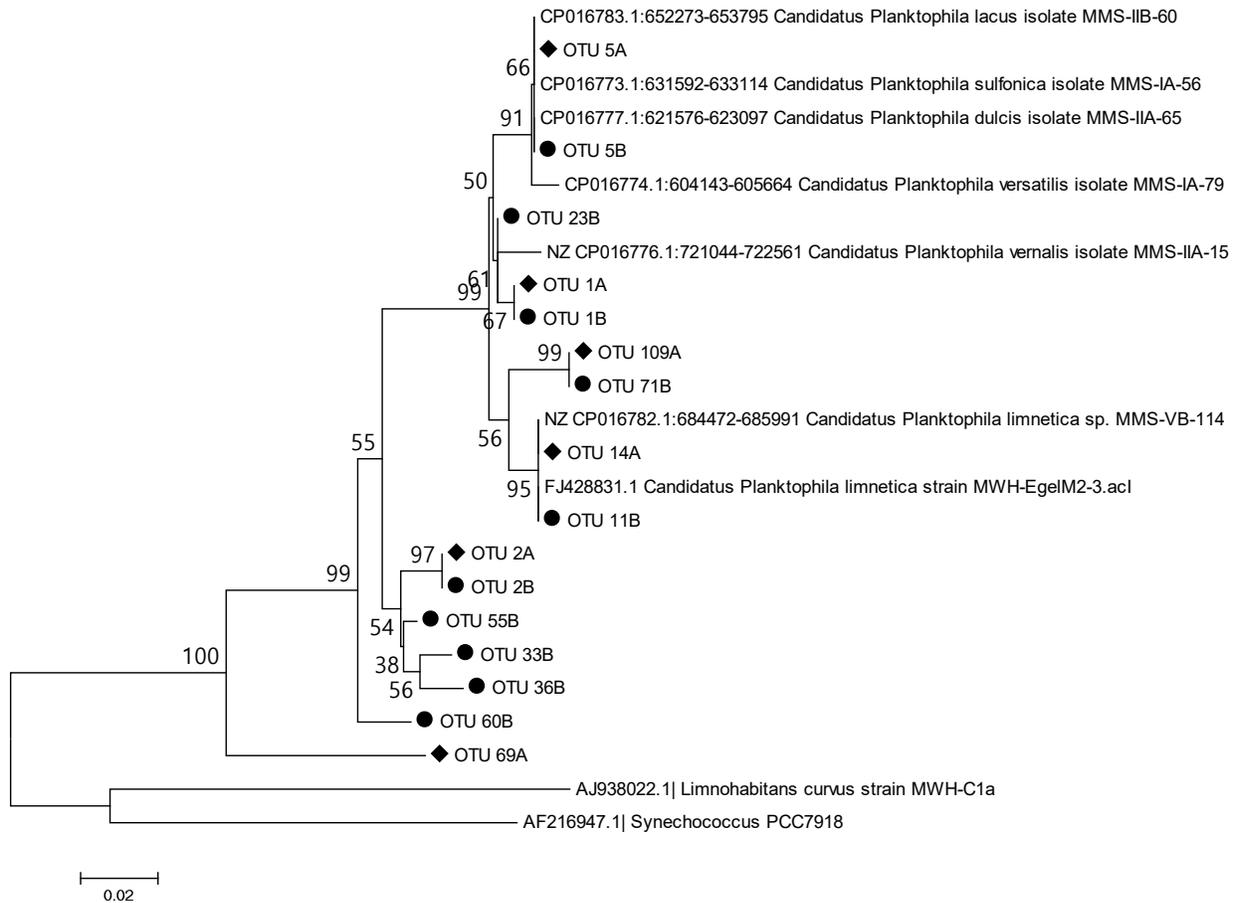


Abbildung 109: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S –Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der *hgcl*-clade innerhalb der *Actinobacteria*; die Berechnung des Stammbaums erfolgte mit der Software MEGA5 basierend auf der Neighbor-Joining –Methode [188] und dem Jukes-Cantor-Modell [189]; Zahlen an den Abzweigungen entsprechen bootstrap-Werten nach 500 Wiederholungen; Bezeichnung der OTUs: A = Sequenzierung von Proben von 2013 mit GS FLX-Titanium series chemistry, B= Sequenzierung von Proben der Jahre 2012 und 2014 mit GS FLX-++Titanium series chemistry

Die jeweils sequenzstärksten OTUs 1A (Proben 2013) und 1B (Proben 2012 und 2014) werden in ein Cluster mit *C. Planktophila vernalis* geordnet. Die OTUs 5A und 5B zeigen im sequenzierten DNA-Abschnitt die höchste Übereinstimmung mit den Isolaten von *C. Planktophila lacus*, *C. Planktophila dulcis*, *C. Planktophila sulfonica* und *C. Planktophila versatilis*. Das Cluster wird jedoch nur durch einen bootstrap-value von 66 gestützt. Die OTUs 14A und 11B hängen eng clustern deutlich mit den beiden Stämmen von *C. Planktophila limnetica* aus verschiedenen Studien. Die hinsichtlich der Sequenzanzahl zweitstärksten OTUs 2A und 2B zeigen in dieser Analyse höhere Übereinstimmungen mit weiteren OTUs als mit den Sequenzen

4 Diskussion

der einbezogenen Isolate. Das Auftreten dieser OTUs deutet auf eine weitere Diversität innerhalb der clade hin für deren Vertreter noch keine Isolate bzw. Sequenzen zur Verfügung stehen.

Die relativen Abundanzen der als *Actinobacteria* identifizierten Sequenzen in der Größenfraktion < 5 µm zeigten keine signifikanten ($p < 0,05$) Korrelationen zu den betrachteten Umweltfaktoren. Die relativen Abundanzen der einzelnen OTUs weisen hingegen entsprechende Korrelationen auf, anhand derer auch unterschiedliche saisonale Entwicklungen der einzelnen OTUs erkennbar werden. Abbildung 110 zeigt die Variation der Sequenzanteile abundanter OTUs der hgcl-clade und ihre Korrelationen mit Umweltfaktoren.

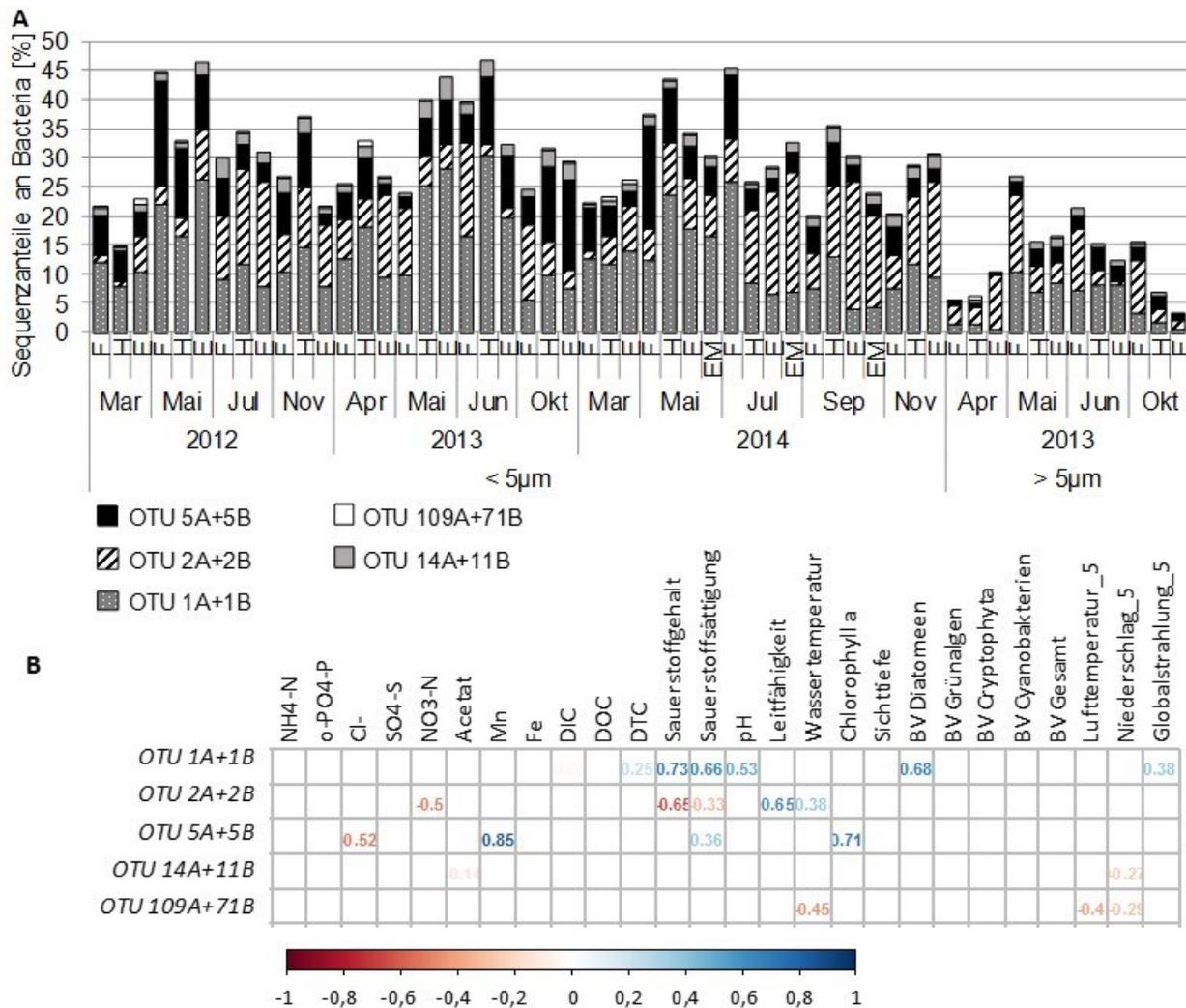


Abbildung 110: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile abundanter OTUs der hgcl-clade (A) sowie Korrelationen der relativen Abundanzen mit Umweltfaktoren ($p < 0,05$) (B)

Die Sequenzanteile der OTUs 1A und 1B weisen statistische Zusammenhänge zu hoher Sauerstoffsättigung und -gehalt sowie dem Diatomeen-Biovolumen auf, was für höhere Abundanzen bei stärkeren Phytoplanktonentwicklungen spricht. Die Sequenzanteile der OTUs 5A und 5B zeigen eine positive

4 Diskussion

Korrelation zur Chlorophyll-a-Konzentration. Beide Korrelationen entsprechen nicht dem aus der Literatur bekannten oligotrophen Lebensstil der Clade. Die Sequenzanteile der OTUs 2A und 2B korrelieren dagegen negativ mit dem Sauerstoffgehalt, was eher auf erhöhte Abundanzen bei geringerer Photosyntheseaktivität hin deutet. Die hier beobachtete Variation der Sequenzanteile von OTUs innerhalb der hgcl-clade könnte dafür sprechen, dass in der clade Linien mit unterschiedlichem ökologischem Verhalten auftreten.

4.2.3.2 *Bacteroidetes*

Sphingobacteriales

Vertreter der *Sphingobacteriales* stellen ca. 60% der Sequenzanteile der *Bacteroidetes* und entfallen hauptsächlich auf die Familien *Chitinophagaceae* und *Sphingobacteriaceae*. Abbildung 111 zeigt die phylogenetischen Verhältnisse der *Chitinophagaceae* nach [190] mit den in Süßwasserökosystemen hauptsächlich relevanten Gattungen *Sediminibacterium*, *Terrimonas*, *Ferruginibacter* sowie auf Phylumlevel nicht näher klassifizierbare OTUs. Die niedrigen bootstrap-Werte für einen Teil der Abzweigungen zeigen, dass die phylogenetischen Verhältnisse an dieser Stelle mit großen Unsicherheiten behaftet sind und keine sichere Bildung von Gruppen ermöglichen. Das als *Sediminibacterium* identifizierte OTU 6 der Proben von 2012 und 2014 clustert mit den entsprechend klassifizierten OTUs 12 und 17 aus der Sequenzierung der Proben von 2013. Die am nächsten verwandte Sequenz der OTUs 12 und 17 gehört zum Stamm *Terrimonas aquatica* RIB1-6, den Abbildung 111 im benachbarten Cluster zeigt. OTU 30A und 49B (*Sediminibacterium*) sowie OTU 64B (unclassified *Chitinophagaceae*) clustern mit dem Stamm *Sediminibacterium aquarii* AA5. Der obligat aerobe Stamm wurde aus dem Sediment eines Aquariums isoliert und weist ein Wachstumsoptimum bei pH 7 und 30°C auf [191]. Das nur bis zur Familienebene *Chitinophagaceae* klassifizierte OTU 53A weist die meiste Sequenzübereinstimmung mit einem Stamm von *Ferruginibacter paludis* aus einem Feuchtgebiet auf [192]). OTU 48A hingegen weist die höchste Sequenzidentität mit dem Stamm *Ferruginibacter profundus* DS48-5-3 auf, der aus dem Sediment eines eutrophen Stausees isoliert wurde [193]. Für die beiden letztgenannten OTUs aus der Sequenzierung von Proben von 2013 konnte kein entsprechendes OTU der Sequenzierung von Proben aus 2012/2014 zugeordnet werden. Je zwei OTUs aus beiden Sequenzierungen konnten nur bis zum Phylum *Bacteroidetes* klassifiziert werden (OTU 31 und 55 bzw. OTU 54 und 45), die nächste verwandte Sequenz eines kultivierten Stammes gehört zu *Prolixibacter bellarivorans* [194], zu dem alle vier OTUs eine Sequenzidentität von 88 % aufweisen (NCBI BLAST 04/2018).

4 Diskussion

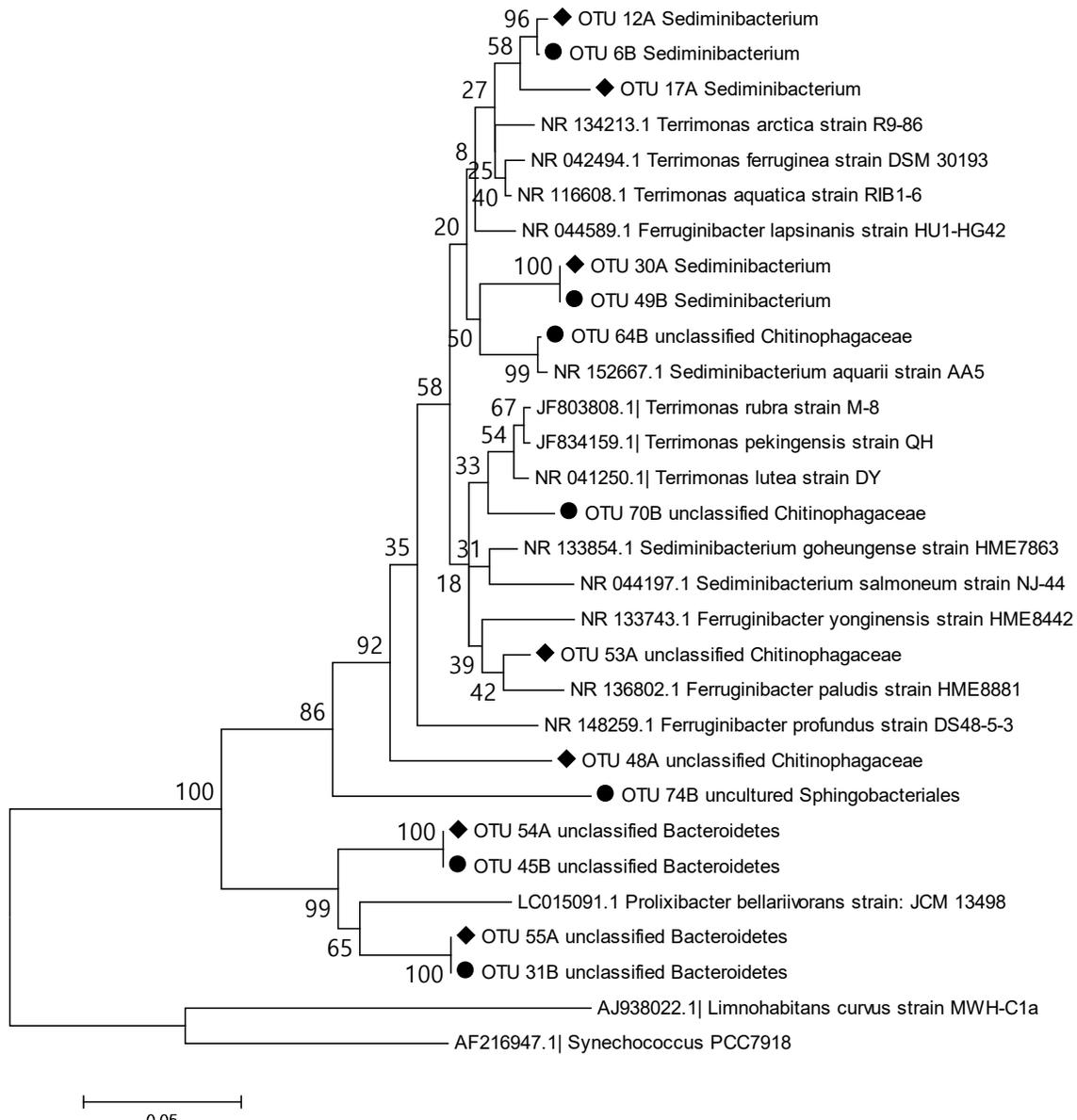


Abbildung 111: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S –Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der *Chitinophagaceae* und unklassifizierter *Bacteroidetes*; die Berechnung des Stammbaums erfolgte mit der Software MEGA5 basierend auf der Neighbor-Joining –Methode [188] und dem Jukes-Cantor-Modell [189] ; Zahlen an den Abzweigungen entsprechen bootstrap-Werten nach 500 Wiederholungen; Bezeichnung der OTUs: A = Sequenzierung von Proben von 2013 mit GS FLX-Titanium series chemistry, B= Sequenzierung von Proben der Jahre 2012 und 2014 mit GS FLX-++Titanium series chemistry;

In der Familie der *Sphingobacteriaceae* entfallen die höchsten Sequenzanteile auf nicht weiter als auf Familienlevel klassifizierbare Sequenzen sowie die Gattungen *Pedobacter* und *Solitalea*. Abbildung 112 zeigt die phylogenetischen Verhältnisse der entsprechenden OTUs untereinander sowie zu charakterisierten Isolaten. Als *Pedobacter* identifizierte OTUs clustern mit unterschiedlichen Stämmen dieser Gattung (Abbildung 112). Die OTUs 174 B, 182 B und 117 A weisen die höchste Sequenzidentität mit *P. alpinus* RSP19 [195] auf, OTUs 106A und 196B hingegen mit *P. aquatilis* ([196]). Die am nächsten

4 Diskussion

Gattung *Sediminibacterium* korrelierten positiv mit Lufttemperatur ($R^2 = 0,85$) und Globalstrahlung ($R^2 = 0,72$) (Größenfraktion $> 5 \mu\text{m}$), die häufig mit sommerlichen Phytoplanktonentwicklungen, insbesondere durch Cyanobakterien, einhergehen. Auch in Cokulturen heterotropher Bakterien mit Phytoplanktern konnten höhere Abundanzen von *Sediminibacterium* in Kultur mit den untersuchten Cyanobakterien (*Microcystis aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii*) festgestellt werden [45].

Cytophagales und Flavobacteriales

Bei den *Cytophagaceae* konnte ein sehr hoher Anteil der Sequenzen bis auf Gattungsebene zugeordnet werden, wobei die Gattung *Pseudarcicella* deutlich überwiegt. Die Sequenzanteile dieser Gattung an den freilebenden Bakterien wiesen eine positive Korrelation zur Nitratkonzentration auf ($R^2 = 0,69$), unter den partikel-assoziierten Bakterien wurden keine signifikanten Korrelationen ($p < 0,05$) zu den untersuchten Umweltfaktoren festgestellt.

Bei den *Flavobacteriales* entfallen die meisten Sequenzen auf die Gattungen *Fluviicola* und *Flavobacterium*, nur ein geringer Teil der Sequenzen dieser Ordnung konnte nicht bis auf Gattungsebene identifiziert werden. Die sequenzstärksten OTUs der Gattung *Flavobacterium* weisen eine Sequenzidentität von 99% zu vielen Stämmen der Gattung auf, sodass keine genauere Verwandtschaft abgeleitet werden kann (NCBI BLAST 04/2018). In der Größenfraktion $< 2 \mu\text{m}$ korrelierten die Abundanzen von *Fluviicola* mit dem Biovolumen der Cryptophyta ($R^2 = 0,7$). Entsprechende Zusammenhänge konnten aus der Literatur nicht bestätigt werden und können auch auf den Einfluss dritter Faktoren zurückzuführen sein. Aus Untersuchungen von Belebtschlamm ist bekannt, dass die Gattung *Fluviicola* auch Denitrifikanten beinhaltet [197], die jedoch nicht notwendigerweise hohe Abundanzen in Süßwasserökosystemen erreichen müssen. Für die Gattung *Flavobacterium* wurden höhere Abundanzen in Anschluss an Massenenwicklungen von Cyanobakterien-Massenentwicklungen, u.a. durch *Microcystis nachgewiesen* [62] [198]. Die Gattung *Flavobacterium* wies im hier untersuchten Datensatz sehr geringe Sequenzanteile auf ($< 0,3$ bzw. $0,1 \%$), eine Ausnahme bildet die Probe von der Entnahmestelle von April 2013, in der *Flavobacterium* 9% der Sequenzanteile stellte. Eine vorangegangene Cyanobakterien-Massenentwicklung kann für diesen Zeitraum ausgeschlossen werden, eventuell wurden in der Frühjahrszirkulation obere Sedimentschichten mit hohen Anteilen organischer Substanzen remobilisiert. Die Vertreter der *Flavobacteriales* und *Cytophagales* sind insbesondere für die Fähigkeit zum Abbau komplexer organischer Substanzen bekannt (u.a. [199]). Diese Fähigkeit kann darüber hinaus eine Erklärung für die höheren Anteile der *Flavobacteriales* und *Cytophagales* in der Vorsperre im Vergleich zur Entnahmestelle sein (Kapitel 3.6.5)

4 Diskussion

Die sequenzstärksten OTUs der *Cyclobacteriaceae* in beiden Sequenzierungen (24B und 38A) werden als unclassified bzw. uncultured *Cyclobacteriaceae* klassifiziert, zeigen aber hohe Sequenzidentität mit *Algoriphagus aquatilis* A8-7 [200], einem Isolat aus einem flachen, schwach alkalischen Süßwassersee. Die beiden OTUs wiesen eine ausgeprägte Saisonalität auf und erreichten vor allem in den Sommermonaten deutlich erhöhte Anteile an der bakteriellen Gemeinschaft (Abbildung 113)

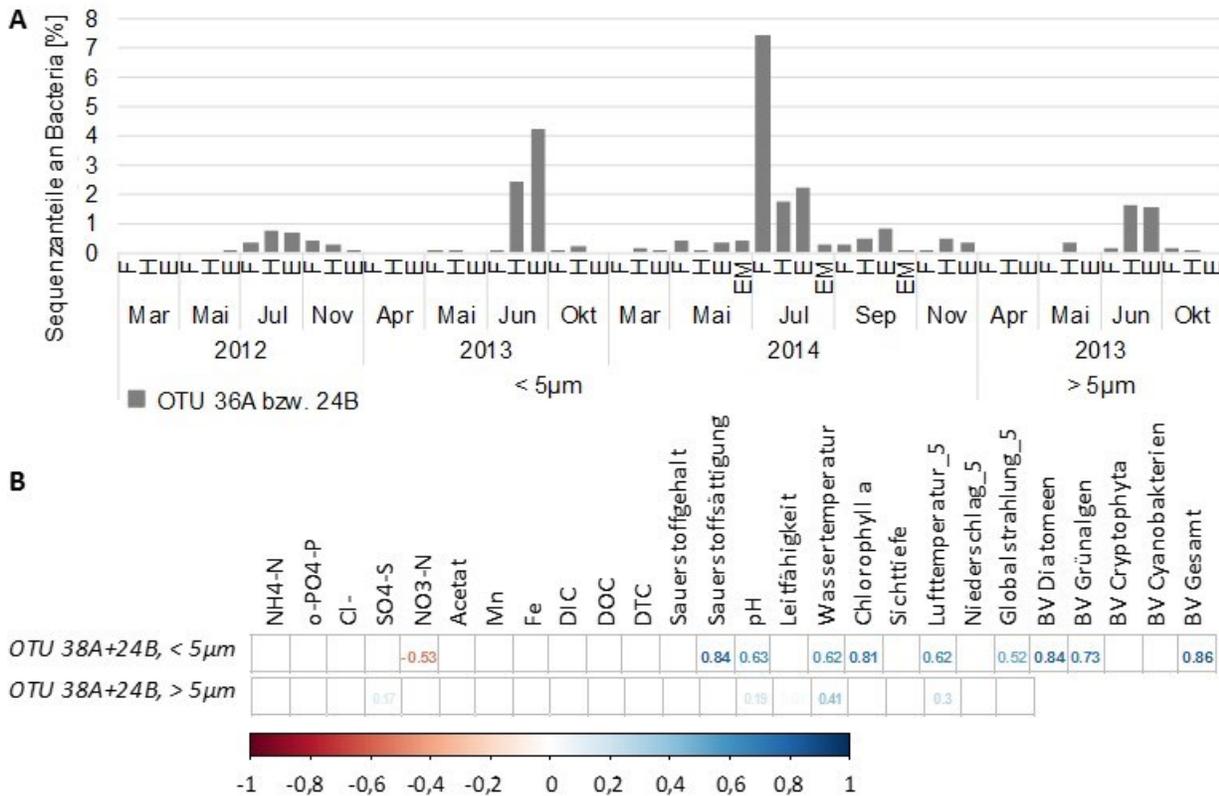


Abbildung 113: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile der mit *Algoriphagus aquatilis* verwandten OTUs 38A und 24B (A) sowie Korrelationen der relativen Abundanzen mit Umweltfaktoren ($p < 0,05$) (B)

Die relativen Abundanzen der OTUs 38A und 24B korrelierten deutlich positiv mit dem Biovolumen von Diatomeen und Grünalgen sowie dem Gesamtbiovolumen und den damit in Zusammenhang stehenden Größen Sauerstoffsättigung und pH-Wert. Diese Zusammenhänge verdeutlichen die Assoziation der Organismen mit Phytoplanktonentwicklungen.

4.2.3.3 Betaproteobacteria

Polynucleobacter

Die positiven Korrelationen der Sequenzanteile von *Polynucleobacter* in der Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$ zu Sauerstoffkonzentration und -sättigung ($R^2 = 0,73$ bzw. $0,76$), pH-Wert ($R^2 = 0,68$) und Chlorophyll a-

4 Diskussion

Konzentration ($R^2 = 0,64$) sowie der Globalstrahlung ($R^2 = 0,63$) weisen deutlich auf ein gehäuftes Auftreten parallel zu Phytoplanktonentwicklungen hin. In der Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$ zeigen die positiven Korrelationen zu Wasser- und Lufttemperatur sowie Globalstrahlung ein ähnliches saisonales Muster. Darüber hinaus bestehen deutliche negative Zusammenhänge zu DIC und DTC, deren Konzentrationen in Phasen erhöhter Phytoplanktonentwicklung aufgrund des Kohlenstoffverbrauchs zurückgehen, was ebenfalls auf eine Kopplung der Abundanz von *Polynucleobacter* an hohe Phytoplanktonproduktion nahelegt. Wu & Hahn konnten für die clade PnecB innerhalb der Gattung *Polynucleobacter* eine deutlich wiederkehrende saisonale Dynamik in drei aufeinanderfolgenden Jahren nachweisen, die am stärksten mit der Wassertemperatur sowie den Abundanzen von Phytoplankton und Zooplankton korrelierte [201]. Die in dieser Studie festgestellten Maxima der Abundanzen in den Sommermonaten stehen in Einklang mit den hier vorliegenden Daten für die gesamte Gattung *Polynucleobacter*.

2016 wurden mehrere ehemals als *Polynucleobacter necessarius* *subsp. asymbioticus* [53] klassifizierte Stämme phylogenetisch neu eingeordnet [202]. Der als neue Art beschriebene Stamm *Polynucleobacter duraquae* MWH-MoK4 ist der nächste Verwandte (ncbi BLAST 03/2018) der beiden OTUs 7(B) und 11 (A), welche die meisten Sequenzen der Gattung *Polynucleobacter* beinhalten (Abbildung 114). Das frei lebende Bakterium wurde aus einem Süßwassersee isoliert und kommt den Autoren zufolge in Gewässern mit neutralem oder alkalischem pH-Wert vor, wie es auch auf die Talsperre Saidenbach zutrifft. Die innerhalb der Gattung *Polynucleobacter* jeweils zweithäufigsten OTUs 66 (A) und 195 (B) bilden dagegen ein Cluster mit *P. cosmopolitanus* Molso2 (= DSM 21490). Dieser Stamm wurde mittels FISH in 15 von 60 Süßwasserhabitaten weltweit in einer Abundanz bis zu 8 % der Zellzahlen nachgewiesen, die häufigsten Abundanzen lagen unter 1 % ([203]). Die stäbchenförmigen, kleinen Zellen ($< 1\mu\text{m}^3$) des Stammes erwiesen sich als wenig anfällig für Predation durch Flagellaten [203]). OTU 29 (A) enthält Sequenzen, die deutlich mit dem Stamm *Polynucleobacter rarus* MT-CBb6A5 clustern, jedoch konnte in der Sequenzierung der Proben von 2012 und 2014 kein entsprechendes OTU der Gattung *Polynucleobacter* gefunden werden. Ebenso wurde zu den OTUs 326 (B) und 419 (B), die mit Stämmen von *P. difficilis* und *P. acidiphobus* clustern, keine Entsprechung in der Sequenzierung der Proben von 2013 gefunden. Möglicherweise wurden diese Sequenzen zu in anderen OTUs der Gattung *Polynucleobacter* zugeordnet. Da die Sequenzen der Proben von 2012 und 2014 geringfügig länger sind, könnte ein Sequenzunterschied zwischen den Stämmen von *Polynucleobacter* auch in diesem Bereich liegen.

4 Diskussion

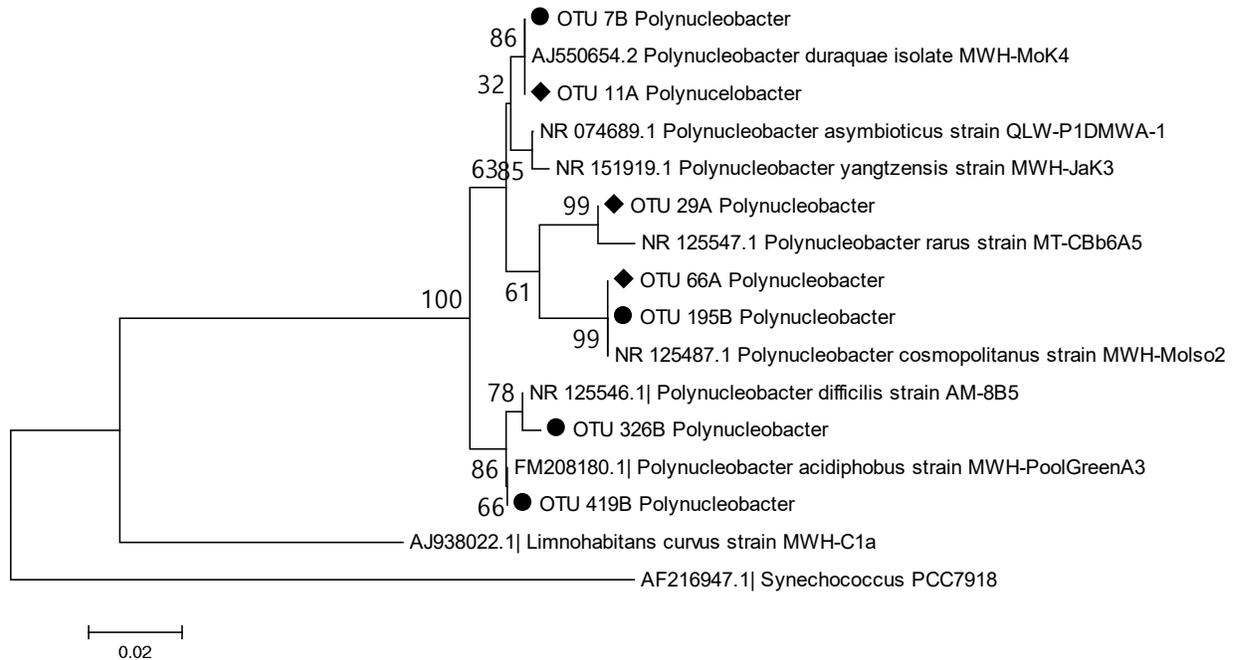


Abbildung 114: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S –Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der Gattung *Polynucleobacter*; die Berechnung des Stammbaums erfolgte mit der Software MEGA5 basierend auf der Neighbor-Joining –Methode [188] und dem Jukes-Cantor-Modell; Zahlen an den Abzweigungen entsprechen bootstrap-Werten nach 500 Wiederholungen; Bezeichnung der OTUs: A = Sequenzierung von Proben von 2013 mit GS FLX-Titanium series chemistry, B= Sequenzierung von Proben der Jahre 2012 und 2014 mit GS FLX-++Titanium series chemistry

Abbildung 115 zeigt die Anteile der häufigsten OTUs der Gattung *Polynucleobacter* im Jahresverlauf. Die häufigsten OTUS 11 (A) und 7 (B) zeigen eine deutliche Saisonalität mit Maxima in den Sommermonaten. Die OTUs 195 (B) und 66A erreichen nur sporadisch höhere Sequenzanteile mit einem deutlichen Maximalwert in der Vorsperre im Juni 2013. Auch im Unterwasservorbecken traten zum gleichen Zeitpunkt erhöhte Anteile dieses OTUs auf. Möglicherweise spielen die vorangegangenen Starkniederschläge Anfang Juni 2013 dafür eine Rolle. OTU 29 (A) tritt in den Proben von 2013 zwar in geringen Sequenzanteilen, aber durchaus regelmäßig auf. Es ist daher zu vermuten, dass die entsprechenden Sequenzen auch in den Proben 2012 und 2014 auftreten, jedoch einem anderen OTU zugeordnet wurden.

4 Diskussion

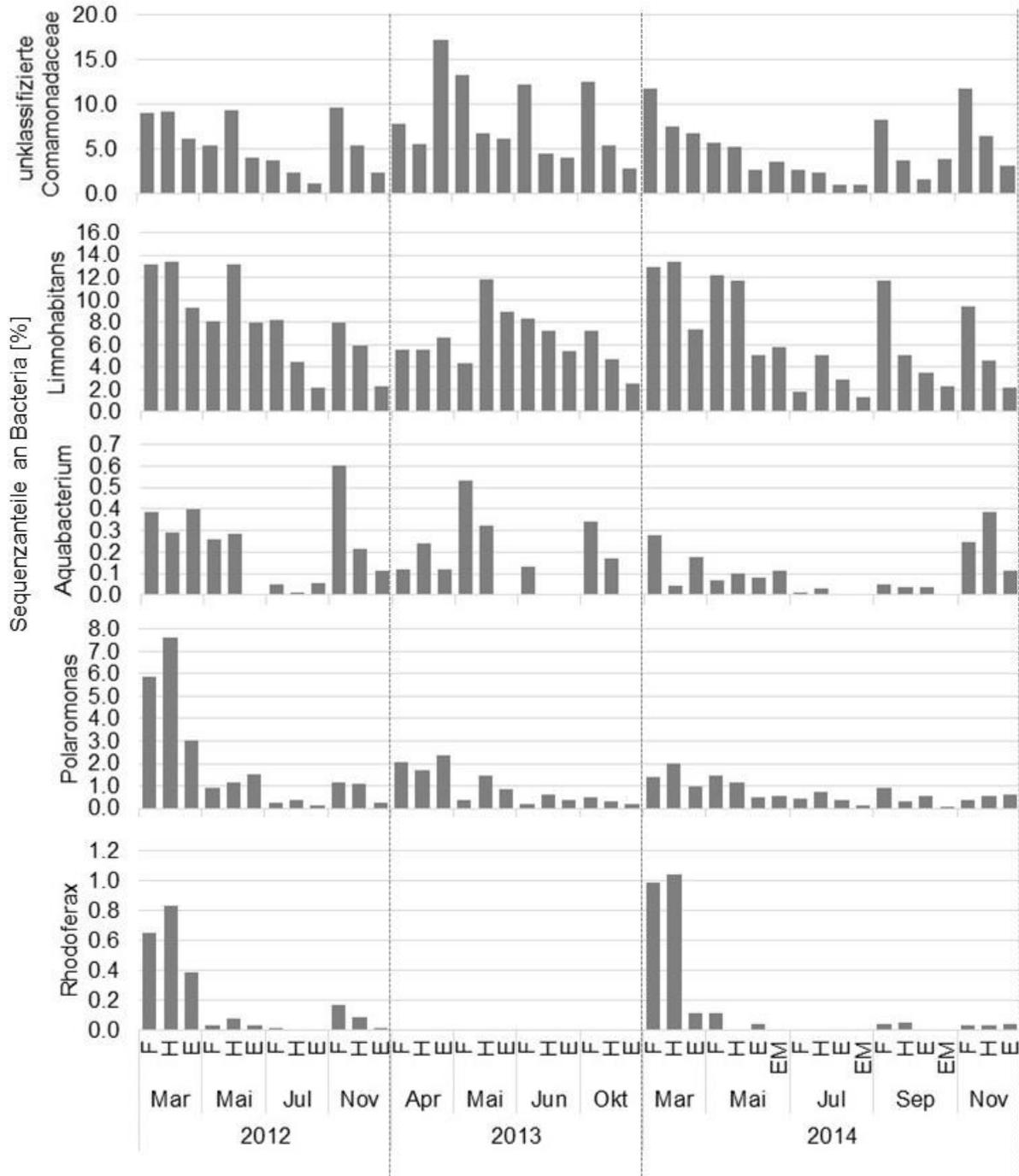


Abbildung 116: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile von Gattungen der *Comamonadaceae*

Die relativen Abundanzen der Gattung *Limnohabitans* und der unklassifizierten *Comamonadaceae* korrelierten positiv mit den Nitratkonzentrationen ($R^2 = 0,49$ und $0,82$), letztere zeigten darüber hinaus negative Zusammenhänge zu pH-Wert und Wassertemperatur ($R^2 = 0,62$). Die Sequenzanteile von *Aquabacterium* korrelierten deutlich positiv mit den Sulfatkonzentrationen ($R^2 = 0,87$) und der Wassertemperatur ($R^2 = 0,72$).

4 Diskussion

Jezbera und Kollegen [204] stellten höhere Abundanzen von *Limnohabitans* in den alkklischen Gewässern fest, im vorliegenden Datensatz konnte für *Limnohabitans* jedoch kein Zusammenhang zum pH-Wert festgestellt werden.

Die morphologische und physiologische Diversität der Gattung *Limnohabitans* steht im Kontrast zur hohen Sequenzähnlichkeit der 16SrDNA. Auf Grundlage der intergenic-spacer-Region zwischen 16S und 23SrDNA ist jedoch auch auf genetischer Ebene eine Differenzierung (Linien Lim A - D) möglich, die mit den morphologischen Eigenschaften der Spezies in Einklang steht [47]. Anhand der hier durch die Sequenzierung erfassten Bereiche der 16SrDNA zeigen die beiden sequenzstärksten OTUs der Gattung *Limnohabitans* (OTU 3A und 4B) die nächste Verwandtschaft zu *Limnohabitans curvus* Rim 6, einem Vertreter der Linie LimA [47] (Abbildung 117). Auch OTU 00038 B (unclassified *Comamonadaceae*) wird in das Cluster mit *Limnohabitans curvus* Rim 6 eingeordnet, die Sequenz von OTU 10 (ebenfalls unclassified *Comamonadaceae*) hingegen weist hohe Übereinstimmung mit zwei anderen Stämmen von *Limnohabitans curvus* auf. Der nächste Verwandte (ncbi BLAST März 2018) von OTU 2 (A) ist ein Stamm von *Acidovorax lacteus*. Dieser Stamm wurde aus einer Kultur von *Microcystis sp.* aus einem eutrophen See isoliert ([205]). Der obligat aerobe Stamm bildet stäbchenförmige Zellen (0.4–0.6 µm x 1.2–1.8 µm) und ist phylogenetisch nahe verwandt mit dem Stamm *Acidovorax anthurii* Aant 9811 (Accession No. KC261873), der wiederum mit dem OTU 8 B (unclassified *Comamonadaceae*) clustert. Stämme von *Acidovorax anthurii* sind Pflanzenpathogene von *Anthurium andreanum* (Flamingoblume) ([206]).

Die beiden sequenzstärksten OTUs von *Aquabacterium* weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit untereinander auf und zeigen die meiste Übereinstimmung zu *Aquabacterium limnoticum* [207]. Dieser Stamm wurde aus einer Süßwasserquelle isoliert und weist eventuell daher höhere Ähnlichkeit zu den hier erfassten planktisch lebenden Vertretern als die anderen dargestellten Stämme, die aus Biofilmen kultiviert wurden [208].

4 Diskussion

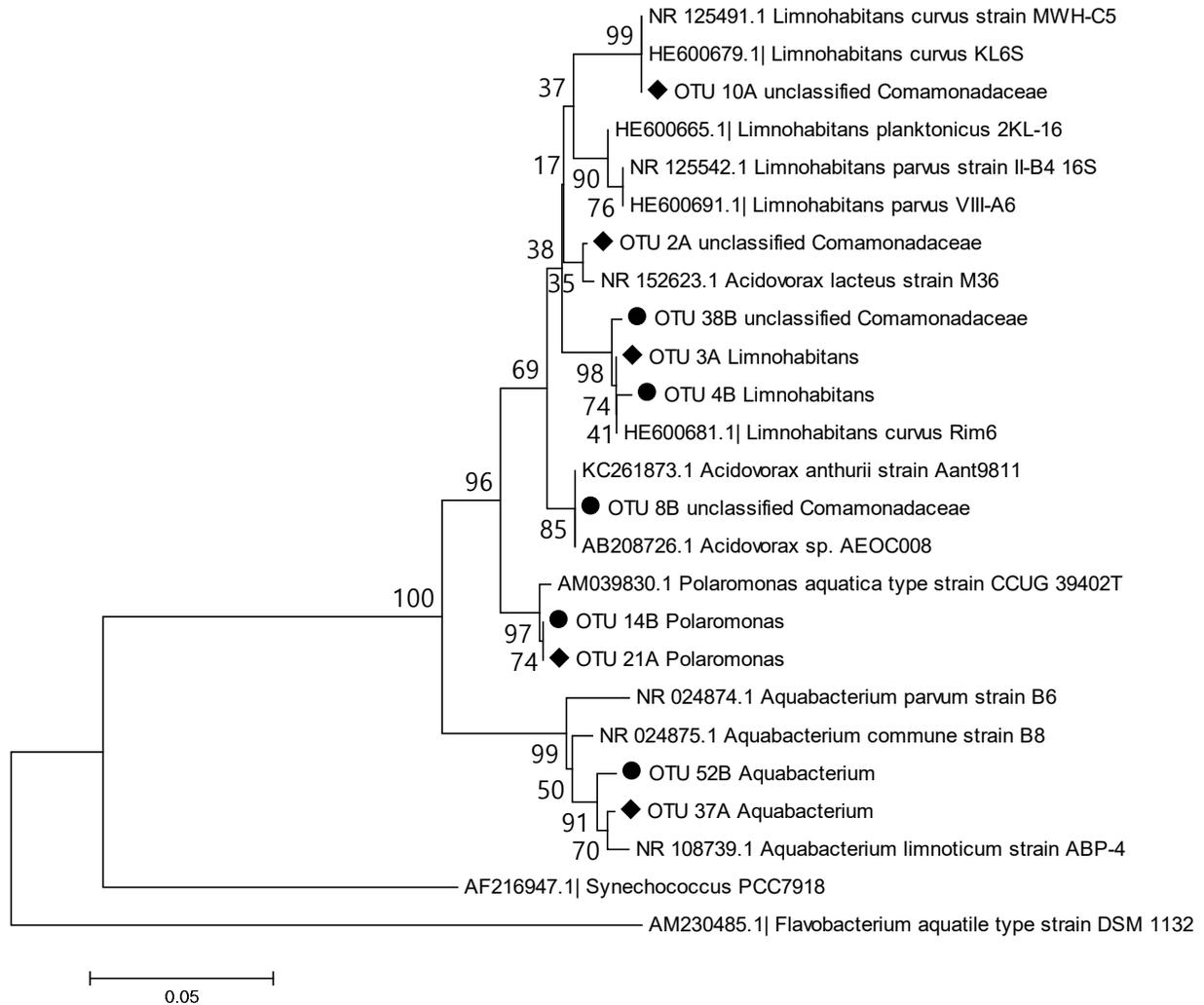


Abbildung 117: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S –Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der *Comamonadaceae*; die Berechnung des Stammbaum erfolgte mit der Software MEGA5 basierend auf der Neighbor-Joining –Methode [188] und dem Jukes-Cantor-Modell; Zahlen an den Abzweigungen entsprechen bootstrap-Werten nach 500 Wiederholungen; Bezeichnung der OTUs: A = Sequenzierung von Proben von 2013 mit GS FLX-Titanium series chemistry, B= Sequenzierung von Proben der Jahre 2012 und 2014 mit GS FLX-++Titanium series chemistry

Methylophilales

Die häufigste Gattung innerhalb der *Methylophilales* in diesem Datensatz ist *Candidatus Methylopumilus*. Die Gattung wurde anhand von Isolaten von Salcher und Kollegen (2015) etabliert, ebenso wie die beiden Arten *Candidatus Methylopumilus planktonicus* (ehem. LD28) und *Candidatus Methylopumilus turicensis* (ehem. PRD01a001B) [57]. Die jeweils sequenzstärksten OTUs der *Methylophilaceae* 13A und 9B wurden als *Candidatus Methylopumilus* identifiziert und weisen deutliche Übereinstimmung mit den entsprechenden 16S rDNA-Abschnitten verschiedener Stämme von *Candidatus Methylopumilus*

4 Diskussion

planctonicus auf (Abbildung 118). OTU 47A (OM43clade) und OTU 65B (unclassified *Methylophilaceae*) clustern hingegen deutlich mit Stämmen von *Candidatus Methylopumilus turicensis*.

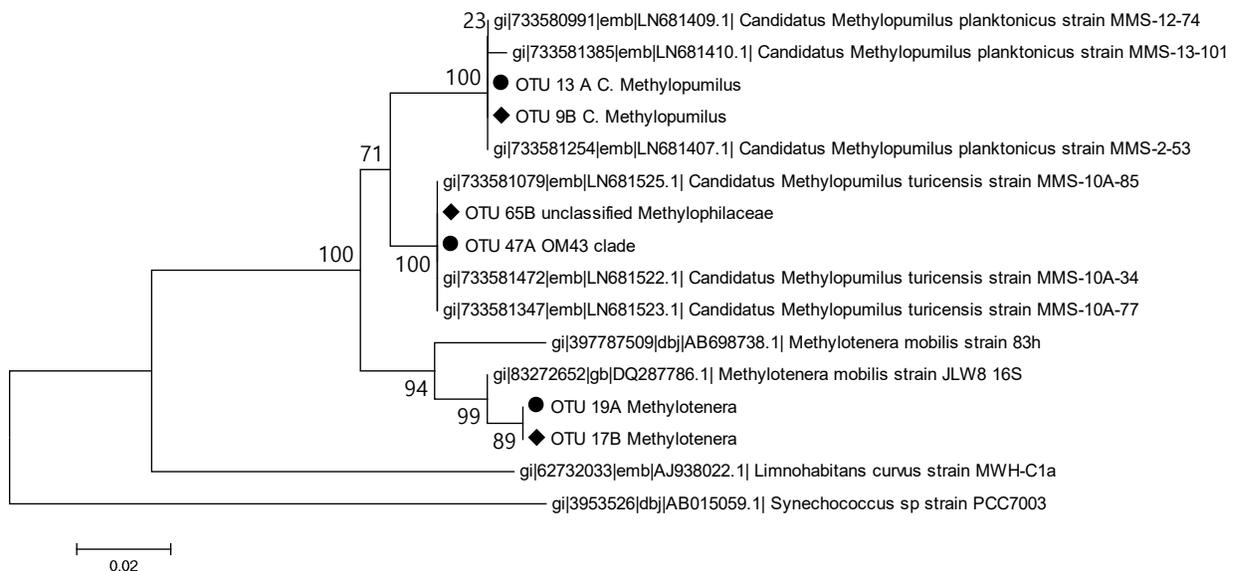


Abbildung 118: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S –Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der *Methylophilaceae*; die Berechnung des Stammbaums erfolgte mit der Software MEGAS basierend auf der Neighbor-Joining –Methode [188] und dem Jukes-Cantor-Modell [189] ; Zahlen an den Abzweigungen entsprechen bootstrap-Werten nach 500 Wiederholungen; Bezeichnung der OTUs: A = Sequenzierung von Proben von 2013 mit GS FLX-Titanium series chemistry, B= Sequenzierung von Proben der Jahre 2012 und 2014 mit GS FLX-++Titanium series chemistry

Die saisonale Verteilung von *Candidatus Methylopumilus* im Zürichsee wies Maxima im Frühjahr und Spätherbst in Zusammenhang mit Phytoplanktonentwicklungen auf [57]. Psychrophiles Wachstum konnte sowohl anhand von Isolaten als auch durch höhere Zellzahlen im Hypolimnion nachgewiesen werden [57]. Darüber hinaus korrelierte die Abundanz beider Stämme mit unterschiedlichen Faktoren. Die Abundanz von *C. M. planctonicus* korrelierte positiv mit dem Gesamt-Chlorophyll und dem von *P. rubescens*, für *C. M. turicensis* wurden dagegen positive Zusammenhänge zur Ammoniumkonzentration und dem Diatomeen-Chlorophyll a festgestellt. Die Häufigkeit beider Stämme korrelierte positiv mit der Phosphat- und Nitratkonzentration [57].

Im hier analysierten Datensatz traten die höchsten Anteile von *C.M. planctonicus* im April und Oktober 2014 auf, lokale Maxima wurden in den anderen Jahren jedoch zu verschiedenen Jahreszeiten erreicht (Abbildung 119). Auffällig sind die höheren Sequenzanteile von *C. Methylopumilus turicensis* in der Vorsperre Forchheim.

4 Diskussion

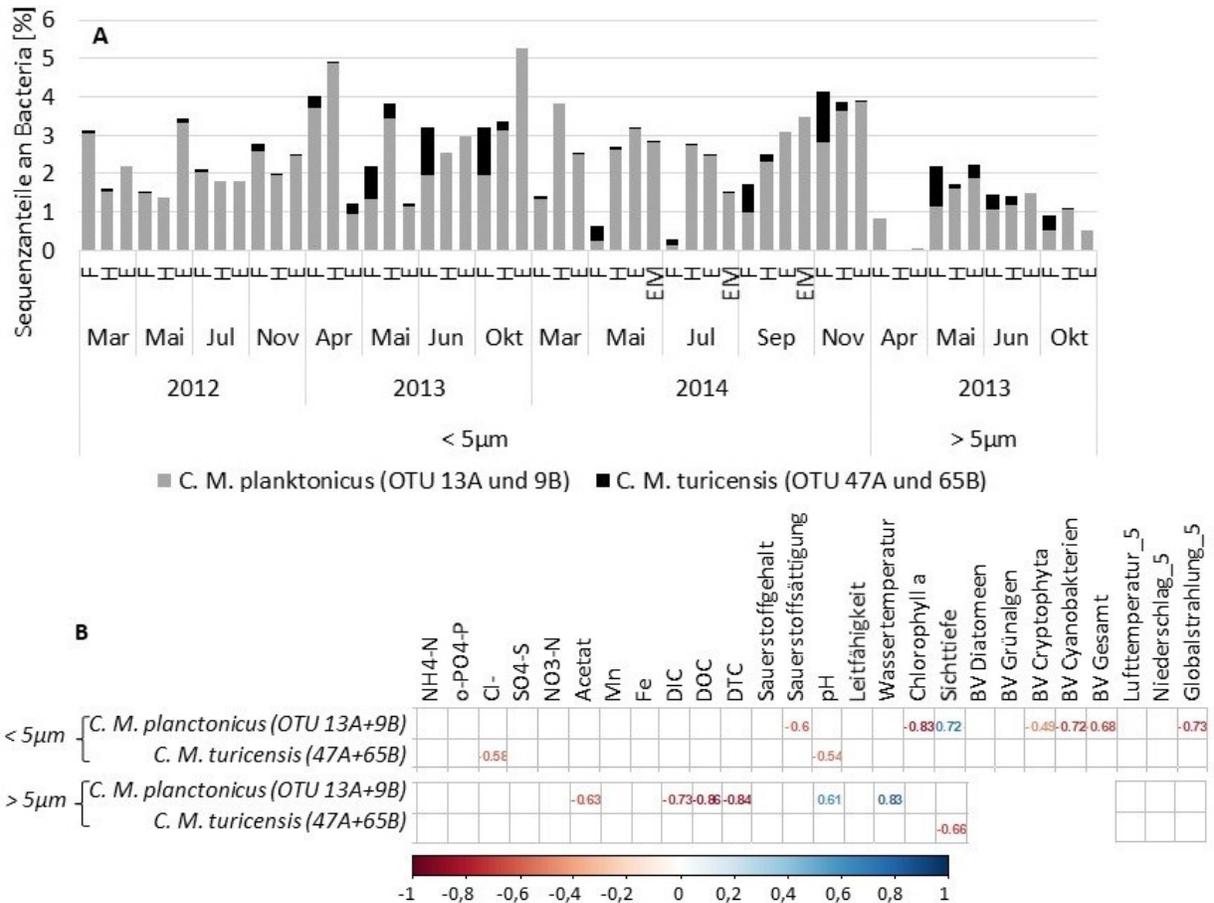


Abbildung 119: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile von *C. Methylopusmilus planctonicus* und *C. Methylopusmilus turicensis* (A) sowie Korrelationen mit Umweltfaktoren ($p < 0,05$) (B)

Im Unterschied zu den Ergebnissen von Salcher und Kollegen zeigen die Sequenzanteile von *C. M. planctonicus* in der Größenfraktion $>5\mu\text{m}$ (Daten 2013) sogar einen positiven Zusammenhang zur Wassertemperatur, für die anderen Größenfraktionen (Daten 2012, 2013 und 2014) sowie *C. M. turicensis* konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Abbildung 119 B). Nach den Ergebnissen von Salcher und Kollegen trat *C. Methylopusmilus* selten in den warmen oberflächennahen Wasserschichten auf, dagegen häufiger im Hypolimnion. In 2 m Wassertiefe, wie hier untersucht, kann daher die saisonale Verteilung vermutlich nicht entsprechend nachverfolgt werden und eine Vergleichbarkeit der Korrelationen zu Umweltfaktoren zu der Studie von Salcher und Kollegen ist nicht gegeben. Darüber hinaus wurde in der genannten Studie nicht zwischen freilebenden und assoziierten Bakterien unterschieden. In der Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$ korrelierte die relative Abundanz von *C. Methylopusmilus* deutlich negativ mit der Chlorophyll a-Konzentration, dem Cryptophyta-, Cyanobakterien- und Gesamt-Biovolumen sowie positiv mit der Sichttiefe, was ebenfalls im Kontrast zu den Ergebnissen von Salcher und Kollegen steht. Für die Größenfraktion $> 5\mu\text{m}$ wiesen die Sequenzanteile von *C.M. planctonicus* dagegen negative Zusammenhänge zu DIC, DOC, DTC, pH-Wert und Acetat-Konzentration auf. Die Sequenzanteile von *C. M.*

4 Diskussion

turicensis korrelierten ebenfalls negativ mit der Sichttiefe ($>5\mu\text{m}$) sowie mit dem pH-Wert und der Chloridkonzentration. Letztgenannter Zusammenhang erklärt sich aus den höheren Abundanzen des Stammes in der Vorsperre, wo gleichzeitig niedrigere Chloridkonzentrationen vorherrschen.

4.2.3.4 Alphaproteobacteria

Die höchsten Abundanzen innerhalb der *Alphaproteobacteria* erreichen OTUs, die als Chesapeake-Delaware_Bay-group innerhalb der SAR11-clade identifiziert werden (SILVA reference files release 128), Die zu dieser Gruppe zugehörigen Sequenzen fallen fast vollständig in ein OTU, was für eine hohe Sequenzidentität der Organismen spricht. Die Sequenzen werden in der Datenbank rdp als *Candidatus pelagibacter* innerhalb der *Pelagibacterales* identifiziert, das erste Isolat der marinen SAR 11 clade *C. Pelagibacter ubique* HTCC1062 [209] ist der nächsten Verwandte der Sequenzen, weist aber in sequenzierten Abschnitt der 16S rDNA nur 88 % Sequenzidentität mit diesem auf (ncbi BLAST 05/2018). Im Folgenden wird die Bezeichnung *C. Pelagibacter* verwendet.

Die Sequenzanteile von *C. Pelagibacter* wiesen eine ausgeprägte Saisonalität mit maximalen Werten im Sommer (2012, 2014) und Herbst (2013) auf (Abbildung 120).

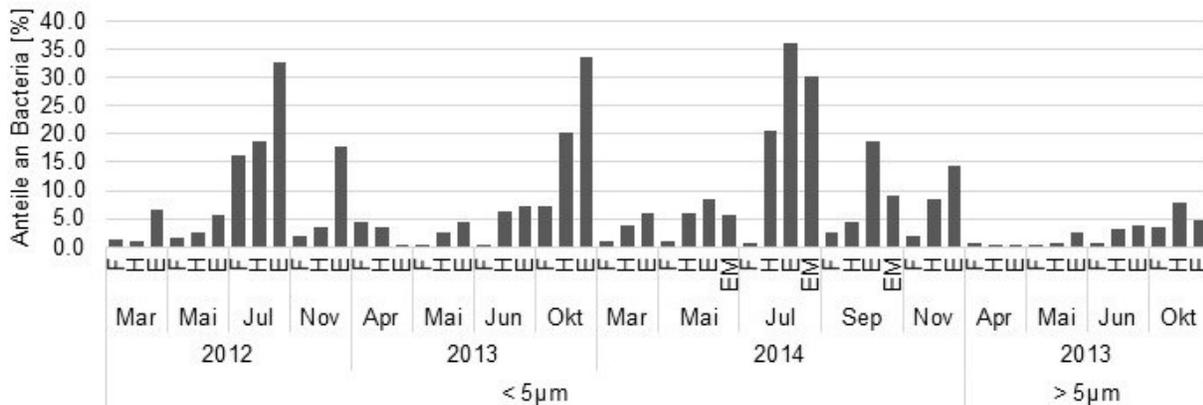


Abbildung 120: Saisonale und lokale Variationen der Sequenzanteile von *C. Pelagibacter*

In Übereinstimmung mit dieser jahreszeitlichen Verteilung wurde eine positive Korrelation der Sequenzanteile in der Fraktion der freilebenden Bakterien zur Wassertemperatur nachgewiesen. Eine ähnliche saisonale Entwicklung von *C. Pelagibacter* [40] sowie die positive Korrelation zur Wassertemperatur wurde auch in anderen Süßwasserökosystemen festgestellt [31].

Die höchsten Sequenzanteile von *C. Pelagibacter* im Jahresverlauf wurden stets an der Entnahmestelle erreicht, insgesamt waren die Anteile in der Vorsperre am niedrigsten und stiegen in Fließrichtung deutlich an. Heinrich und Kollegen (2013) stellten für die saisonale Dynamik von *C. Pelagibacter* eine positive

4 Diskussion

Korrelation zur Wassertransparenz sowie geringere Abundanzen mit höheren Phytoplankton-biovolumina fest [40]. Zwischen den hier untersuchten Probenahmestellen steigt die Sichttiefe in Fließrichtung kontinuierlich an, parallel dazu wurden auch steigende Sequenzanteile von *C. Pelagibacter* gefunden. In Einklang mit den Ergebnissen von Heinrich und Kollegen fielen die Sequenzanteile von *C. Pelagibacter* im Frühjahr zur stärksten Phytoplanktonentwicklung am geringsten aus, auch die hier festgestellte negative Korrelation der Sequenzanteile mit dem Sauerstoffgehalt passt zu diesem Zusammenhang. Darüber hinaus bestand auch eine deutliche Korrelation zum Biovolumen der Cyanobakterien ($R^2 = 0,74$). Hinter dieser Korrelation muss jedoch kein direkter Zusammenhang stehen, zu den höheren Abundanzen beider Gruppen in den Sommer- und Herbstmonaten können auch jeweils andere Faktoren (Wassertemperatur, Konkurrenz anderer Phytoplankter bzw. Bakteriengruppen) beitragen. Eine positive Korrelation zu gelösten Nährstoffen (Phosphat, Ammonium, Nitrat, Silikat) [40]) wurde anhand der hier vorliegenden Daten nicht gefunden, es bestand sogar eine schwache negative Korrelation zur Nitratkonzentration. Möglicherweise bestehen aber generelle Unterschiede hinsichtlich der Nährstoffregulierung zwischen dem von Heinrich und Kollegen untersuchten Gewässer und der Talsperre Saidenbach, für die z.B. gezeigt wurde, dass das Phytoplanktonwachstum zumindest zeitweise silikatlimitiert ist [4]. Hinsichtlich der Relationen zur Abundanz anderer Bakteriengruppen zeigten die Sequenzanteile von *C. Pelagibacter* vor allem negative Korrelationen zu Vertretern der *Comamonadaceae* (*Aquabacterium* $R^2 = -0,45$, *Limnohabitans* $R^2 = -0,42$, unklassifizierte *Comamonadaceae* $R^2 = -0,59$) und zu *Pseudarcicella* ($R^2 = -0,37$). Für diese Gattungen bzw. Taxa ist bekannt, dass sie schnell mit Wachstumsantworten auf starke Phytoplanktonentwicklungen reagieren, was auf *C. Pelagibacter* nicht zutrifft, sodass die negative Korrelation naheliegend ist. Ebenfalls negativ korrelierten die Sequenzanteile zu denen von *Sphingopyxis*, hier liegt höchstwahrscheinlich das gehäufte Auftreten von *Sphingopyxis* in der Vorsperre Forchheim zugrunde, in der *C. Pelagibacter* die niedrigsten Sequenzanteile erreicht. Für *Sphingopyxis* ist die Fähigkeit zum Abbau organischer Stoffe wie Huminstoffe bekannt [210]. Diese Substanzen könnten in der flacheren, weniger stabil geschichteten Vorsperre Forchheim durch mehr Sedimentkontakt mit der Wassersäule verstärkt auftreten und die Häufigkeit von *Sphingopyxis* darin erklären.

Die in diesem Datensatz gezeigte Saisonalität und lokale Verteilung der Abundanzen von *C. Pelagibacter* steht im Einklang mit den aus der Literatur bekannten Charakteristika der Gattung. Dazu zählt die geringe Konkurrenzfähigkeit gegenüber anderen Bakteriengruppen während hoher Phytoplanktonproduktion [40], [15] und dem Erreichen höherer Abundanzen im Anschluss daran [45] vor allem bei erhöhten Konzentrationen gelöster Nährstoffe. Bestehende Unterschiede im Detail können z.B. auf Charakteristika

4 Diskussion

der untersuchten Gewässer zurückzuführen sein, darüber hinaus können auch weitere hier nicht untersuchte Einflussfaktoren (z.B. Predation) eine Rolle spielen.

4.2.3.5 *Verrucomicrobia*

Die Sequenzen der OTUs der *Verrucomicrobia* weisen zu den meisten kultivierten Organismen nur Sequenzidentitäten von < 90 % auf. Anhand von Sequenzen nicht kultivierter Organismen wurden typische Süßwasserlinien innerhalb der *Verrucomicrobia* etabliert, u.a. FukuN18, Sta2-35, LD19, CL120-10, CRE-PA29 [24], [68]. Für die phylogenetische Analyse im Vergleich mit den hier detektierten OTUs wurde jeweils eine Sequenz aus bekannten Süßwasserlinien der *Verrucomicrobia* verwendet und die zugehörige Bezeichnung an die des Organismus angefügt (Abbildung 121).

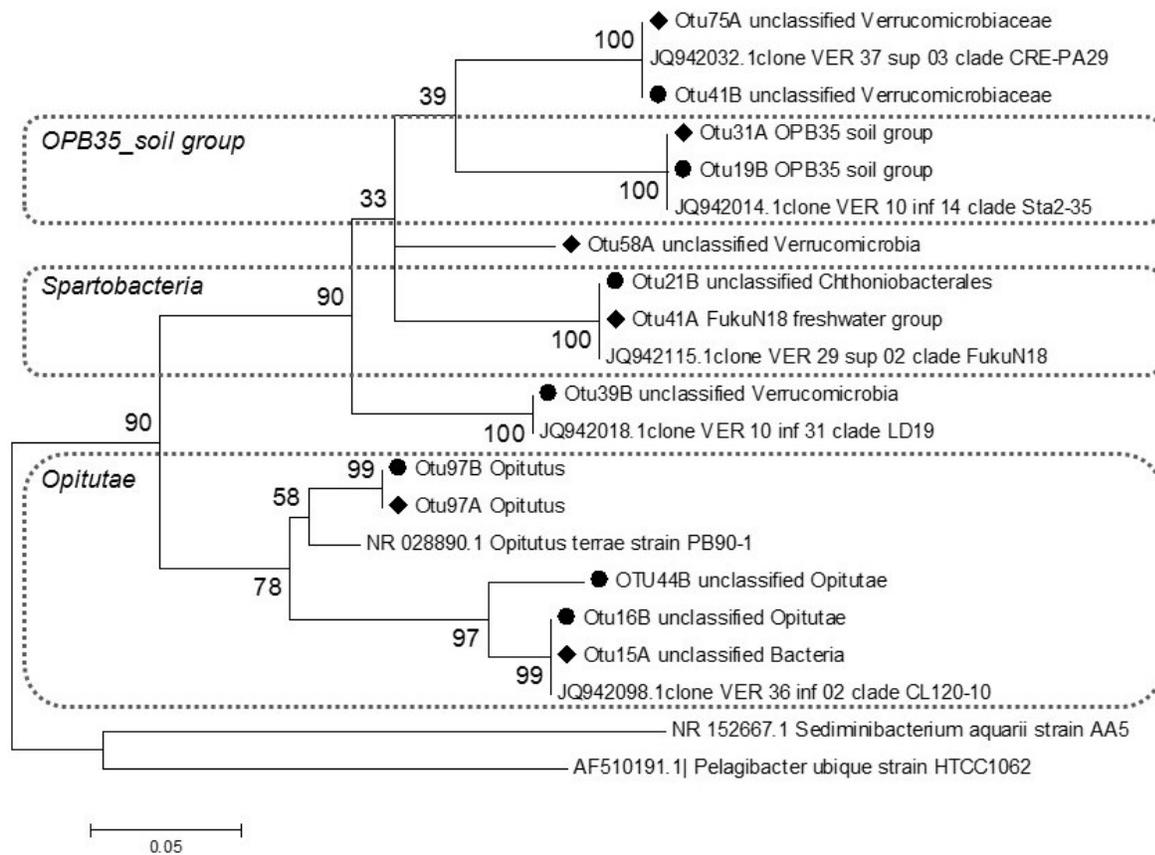


Abbildung 121: Phylogenetischer Stammbaum abundanter OTUs der 16S –Amplikon-Pyrosequenzierungen und kultivierter Stämme der *Verrucomicrobia*; die Berechnung des Stammbaums erfolgte mit der Software MEGA5 basierend auf der Neighbor-Joining –Methode [188] und dem Jukes-Cantor-Modell [189] ; Zahlen an den Abzweigungen entsprechen bootstrap-Werten nach 500 Wiederholungen; Bezeichnung der OTUs: A = Sequenzierung von Proben von 2013 mit GS FLX-Titanium series chemistry, B= Sequenzierung von Proben der Jahre 2012 und 2014 mit GS FLX-++Titanium series chemistry

Die Sequenzen der OTUs 41A und 21B clustern mit der Sequenz eines Vertreters der clade FukuN18, die in der Studie von Parveen und Kollegen (2013) das zweithäufigste OTU darstellte und vorwiegend Klone aus

4 Diskussion

der partikel-assoziierten Fraktion enthielt. Auch im hier untersuchten Datensatz sind die Sequenzanteile der beiden OTUs in der Größenfraktion $>5\mu\text{m}$ höher, mit Ausnahme eines Großteils der Proben von Mai bis November 2014, in denen ähnlich hohe Anteile erreicht wurden (Abbildung 122). OTUs 31A und 19B clustern hingegen deutlich mit einem Vertreter der durch freilebende Organismen dominierten clade Sta2-35. Die Anteile der entsprechenden Sequenzen sind auch in der Talsperre Saldenbach in der Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$ höher. Höhere Anteile der OTUs 31A und 19B in der Größenfraktion $>5\mu\text{m}$ wurden vor allem in zwei Proben aus der Vorsperre Forchheim erreicht, was zu der positiven Korrelation mit der DOC- und DTC-Konzentration beiträgt. In der Größenfraktion $< 5\mu\text{m}$ wurden für die Sequenzanteile der OTUs 31A und 19B sowie 41A und 21B kaum ausgeprägte Korrelationen zu den untersuchten Umweltfaktoren festgestellt.

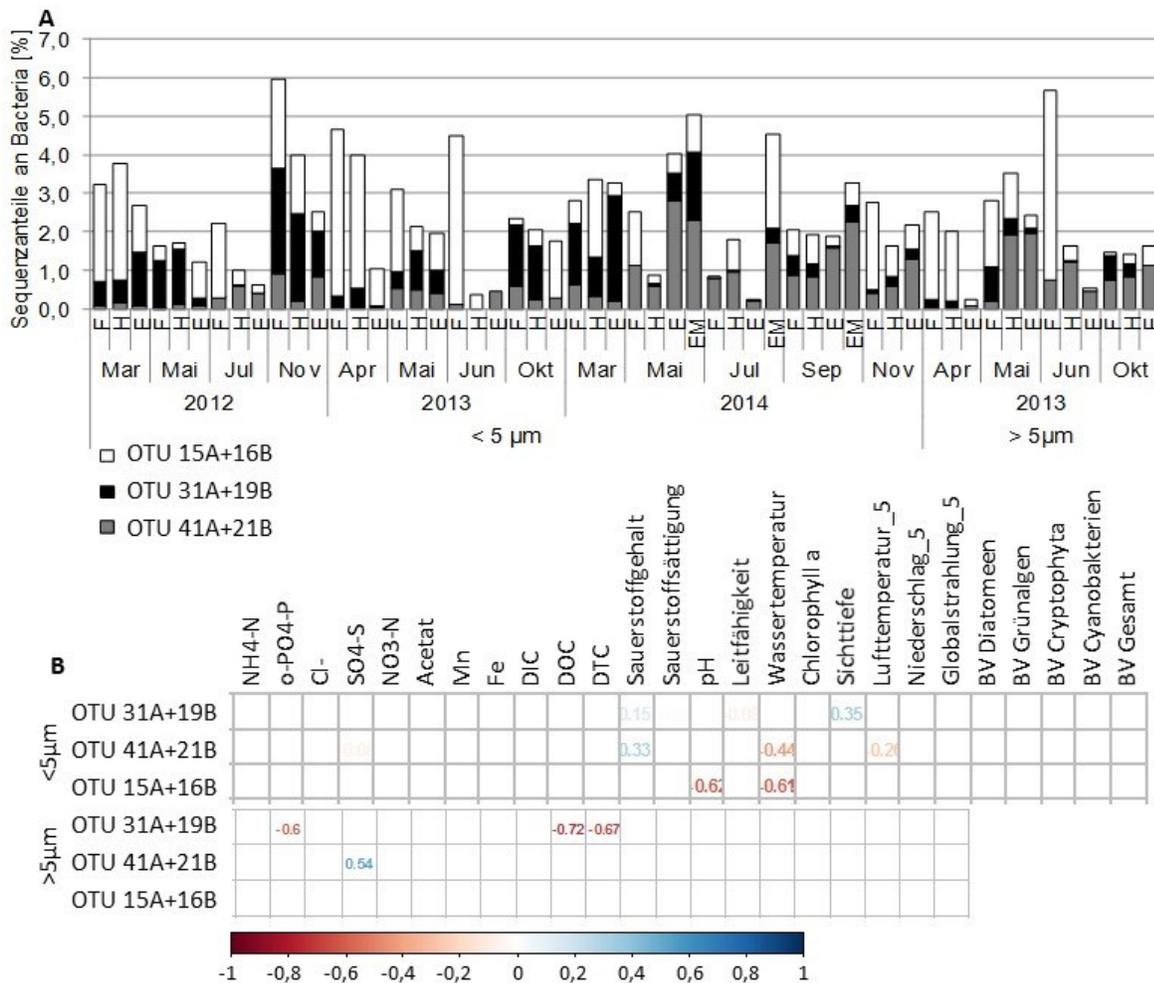


Abbildung 122: Saisonale und lokale Variation der Sequenzanteile abundanter OTUs der Verrucomicrobia (A) sowie Korrelationen mit Umweltfaktoren ($p < 0,05$) (B)

Die OTUs 15A und 16B sind die sequenzreichsten OTUs der *Verrucomicrobia* und gehören zu den *Opiritae*. Unter den bekannten Süßwasserlinien der *Verrucomicrobia* weisen sie die höchste Sequenzidentität mit

4 Diskussion

einem Vertreter der Clade CL120-10 auf, die nach Parveen und Kollegen (2013) durch partikel-assoziierte Organismen dominiert ist. Im hier untersuchten Datensatz unterscheiden sich die Sequenzanteile der beiden OTUs zwischen den Größenfraktionen nicht deutlich. Die Sequenzanteile der freilebenden *Bacteria* korrelieren negativ mit pH-Wert und Wassertemperatur, was für erhöhte Abundanzen im Frühjahr und Herbst, jedoch nicht für einen Zusammenhang mit starken Phytoplanktonentwicklungen, spricht. Für die *Opitutae* (sowie die *Verrucomicrobiae*) wurden in zwölf nordamerikanischen Binnenseen ebenfalls höhere Abundanzen im Frühjahr gezeigt [211].

OTUs 75A und 41B clustern mit einem Vertreter der durch partikel-assoziierte *Verrucomicrobia* dominierten clade CRE-PA29, die mit ca. einem Fünftel der gewonnenen Klone die höchste Abundanz in der Studie von Parveen und Kollegen (2013) erreichte. Für die OTUs 58A und 39B konnten jeweils keine Entsprechungen zwischen den beiden Sequenzierungen gefunden werden. Beide OTUs werden als *unclassified Verrucomicrobia* identifiziert, die Sequenzunterschiede zwischen beiden sind aber zu groß, als dass sie in ein gemeinsames Cluster geordnet werden. OTU39B zeigt die höchste Sequenzidentität zu einem Vertreter der clade LD19 und darüber hinaus zu dem deutlich weniger abundanten OTU 162A (nicht dargestellt in Abbildung 111). OTU 58A wird im Datenbankabgleich mit rdp (Ribosomal Database Project, [39]) mit einer Identität von 100 % als *Prostheco bacter* identifiziert und weist nach ncbi die höchste Sequenzähnlichkeit zu den entsprechenden Sequenzabschnitten der Stämme *Prostheco bacter fluviatilis* HAQ-1 und *Prostheco bacter algae* EBTL04 [212] auf. Der letztgenannte Stamm wurde aus einer Kultur mit *Ankistrodesmus gracilis* isoliert, was für eine mögliche Assoziation der Organismen mit Chlorophyta spricht.

4 Diskussion

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit ist die Analyse des Phyto- und Bakterioplanktons in der Talsperre Saidenbach sowie die Identifizierung von Einflussfaktoren auf deren Zusammensetzung. Dazu wurde die mikrobielle Gemeinschaft im Freiwasser von 2013 bis 2015 monatlich in einer Vorsperre sowie an drei Probenahmestellen im Hauptbecken der Talsperre untersucht. Zur Quantifizierung und Differenzierung des Bakterioplanktons wurden Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusssytometrie, CARD-FISH, denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese, Klonierung und 16S-Amplikonsequenzierung eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Korrelations- und Clusteranalysen sowie NMDS unter Einbeziehung hydrophysikalischer und hydrochemischer Parameter, meteorologischer Daten sowie der Daten zur Phytoplanktongemeinschaft. Darüber hinaus wurden Verfahren zum Monitoring typischer Organismengruppen im Pelagial etabliert bzw. auf ihre Eignung hin untersucht: Die spektrofluorometrische Erfassung von Phytoplanktongruppen mit Hilfe einer Tauchsonde wurde anhand mikroskopischer Analysen des Phytoplanktons validiert. Für die Quantifizierung und Differenzierung des autotrophen Picoplanktons (APP) wurde eine durchflusssytometrische Methodik entwickelt und die Resultate ebenfalls anhand mikroskopischer Zählungen überprüft.

Die mit der FluoroProbe Sonde (bbe Moldaenke GmbH) ermittelten Chlorophyll-Konzentrationen für vier Algengruppen zeigten im Vergleich zu den mikroskopischen Analysen gute Übereinstimmung für die spektrale Gruppe der Diatomeen (incl. Haptophyceen, Dinophyceen, Chrysophyceen), während für die spektralen Gruppen der Grünalgen (incl. Desmidiaceen), Cyanobakterien und Cryptophyta z.T. deutliche Abweichungen auftraten. Die relative Zusammensetzung des Phytoplanktons wies ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen FluoroProbe-Messungen und Mikroskopie auf, die vor allem in einer Überschätzung des Anteils von Grünalgen und einer generellen Unterschätzung von Cyanobakterien anhand der Sondenmessungen bestanden. Ein wesentlicher Vorteil der Sondenmessungen besteht jedoch in der Möglichkeit zur *in-situ* Aufnahme von Tiefenprofilen. Die Abschätzung der Zusammensetzung und Abundanz des Phytoplanktons in der Wassersäule vor Ort kann zur gezielten Probenahme genutzt werden und ergänzend Informationen zu nicht mikroskopisch analysierten Horizonten liefern. Die Sondenmessungen eignen sich jedoch nicht als Ersatz für mikroskopische Analysen und sollten nicht unabhängig von diesen betrachtet werden.

5 Zusammenfassung

Für die Quantifizierung des APP wurde eine durchflusszytometrische Methodik entwickelt, die im Vergleich zur Mikroskopie präzise Zellzahlen ergab und auch die Anteile phycocyanin- und phycoerythrinhaltiger Picoplankter zutreffend widerspiegelte. Der geringe Zeitaufwand für die durchflusszytometrischen Messungen ermöglicht es, das APP in einer höheren räumlichen und zeitlichen Auflösung zu untersuchen. Die statistische Auswertung in Hinblick auf die erhobenen Umweltparameter zeigte für die Abundanz der Picoplankter in den oberflächennahen Wasserschichten signifikante Zusammenhänge zur Wassertemperatur und dem pH-Wert. Unter den untersuchten Nährstoffen spielte nur die Nitratkonzentration in der Vorsperre und im Unterwasservorbecken eine Rolle.

In der bakteriellen Gemeinschaft der Talsperre Saidenbach und der Vorsperre Forchheim wurden als dominante Taxa anhand von Klonierung und 16S-Amplikonsequenzierung typische Süßwasservertreter der jeweiligen Phyla nachgewiesen, z.B. *hgcl-clade (Actinobacteria)*, *Limnohabitans (Betaproteobacteria)* und *C. Pelagibacter (Alphaproteobacteria)*. Clusteranalysen für DGGE-Profile und 16S-Amplikonsequenzierungsdaten zeigten häufig Ähnlichkeiten der mikrobiellen Gemeinschaft in Vorsperre und Unterwasservorbecken sowie teilweise mit Proben späterer Zeitpunkte aus den weiter stromabwärtsgelegenen Probenahmestellen (S, E). Dies spiegelt möglicherweise einen Längstransport der Arten in der Talsperre wider und bedeutet für die Bewirtschaftung, dass in Vorsperren nicht nur Nährstoffelimination durch gezieltes Phytoplanktonwachstum und –sedimentation stattfindet, sondern sich auch Bakteriengruppen etablieren, die sich bei geeigneten ökologischen Bedingungen auf stromabwärts gelegene Kompartimente der Talsperre ausbreiten können.

Die Zusammensetzung des Bakterioplanktons zeigte für einen Teil der Proben jahresübergreifend wiederkehrende saisonale Muster. Vor allem Proben des Jahres 2013 unterschieden sich jedoch deutlich von den entsprechenden Zeiträumen der anderen Jahre, worin sich meteorologische Besonderheiten (verkürzte Frühjahrszirkulation, sommerliches Starkregenereignis) widerspiegeln. Für die untersuchten Umweltparameter wurden in den aufeinanderfolgenden Jahren jeweils verschiedene Zusammenhänge zur Zusammensetzung des Bakterioplanktons festgestellt. Sowohl anhand der 16S-Amplikonsequenzierungsdaten als auch der DGGE-Profile konnten keine jahresübergreifend wirksamen Umweltfaktoren ermittelt werden, was auch auf den kurzen Untersuchungszeitraum von drei Jahren zurückzuführen ist. Vor allem ist aber davon auszugehen, dass im Gewässerökosystem stets mehrere Faktoren zusammenwirken und mehrstufige, z.T. zeitlich verzögerte Beziehungen zwischen den abiotischen und biotischen Komponenten bestehen.

5 Zusammenfassung

Für die Entwicklung der Ökosystemkomponenten spielen vor allem in den meso- und oligotrophen Standgewässern auch die Zirkulations- und Schichtungsverhältnisse eine entscheidende Rolle, die derzeit durch klimatische Veränderungen einem starken Wandel unterworfen sind. Die entsprechenden Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft sind nicht absehbar und sollten in Anbetracht ihrer Stoffwechsellleistungen im Gewässer ein wesentliches Element langfristiger Untersuchungen sein. Effiziente Verfahren zur Untersuchung verschiedener Komponenten des Phyto- und Bakterioplanktons können dazu einen wichtigen Beitrag leisten.

6 Literaturverzeichnis

- [1] D. Uhlmann und W. Horn, „Ökologie von Stauseen,“ *Biologie in unserer Zeit*, Bd. 36, pp. 92-101, 2006.
- [2] D. & H. W. Uhlmann, *Hydrobiologie der Binnengewässer*, Stuttgart: Ulmer Verlag, 2001, p. 528.
- [3] E. Hoehm, „Bewertungsverfahren für die Biokomponente Phytoplankton für natürliche Gewässer, Trophieklassifikation und Qualitätssicherung,“ Freiburg, 2015.
- [4] H. Horn, W. Horn, L. Paul, D. Uhlmann und I. Röske, „Drei Jahrzehnte kontinuierliche Untersuchungen an der Talsperre Saidenbach. Fakten, Zusammenhänge, Trends,“ Neunzehnhain, 2006.
- [5] H. Horn, W. Horn und L. R. K. R. I. Paul, „Abschlussbericht - Die biotische Struktur von Stauseen,“ Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, Leipzig, 2016.
- [6] K. Schöne und B. Andreas, *Talsperren in Sachsen.*, Leipzig: Klingenberg Buchkunst, 2007, p. 232.
- [7] K. Röske, R. Sachse, C. Scheerer und I. Röske, „Microbial diversity and composition of the sediment in the drinking water reservoir Saidenbach (Saxonia, Germany).,“ *Systematic and Applied Microbiology*, Bd. 35, pp. 35-44, 2012.
- [8] K. Röske, I. Röske und D. Uhlmann, „Characterization of the bacterial population and chemistry in the bottom sediment of a laterally subdivided drinking water reservoir system.,“ *Limnologica*, Bd. 38, p. 367–377, 2008.
- [9] „Kompaktlexikon der Biologie,“ 2001. [Online]. Available: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/plankton/9117>. [Zugriff am 24 Januar 2015].
- [10] L. Krienitz, „Algae (Including Cyanobacteria): Planktonic and Attached,“ in *Plankton of Inland Waters*, G. Likens, Hrsg., Academic Press, 2010, p. 412.
- [11] R. Robarts und G. Carr, „Bacteria, Bacterioplankton,“ in *Plankton of Inland Waters*, G. E. Likens, Hrsg., Academic Press, 2010, p. 412.
- [12] T. White, „The importance of relative shortage of food in animal ecology,“ *Oecologia*, Nr. 33, p. 233–242, 1978.
- [13] C. B. Huffaker, „The phenomenon of predation and its roles in nature,“ *Proceedings of the Advanced Study Institute on Dynamics of Numbers in Population*, pp. 327-343, 1970.
- [14] R. J. Newton, S. E. Jones, A. M. K. D. Eiler und S. Bertilsson, „A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria,“ *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Bd. 75, Nr. 1, pp. 14-49, 2011.
- [15] B. Roszak und R. Colwell, „Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment,“ *Microbiological Reviews*, Bd. 51, Nr. 3, pp. 365-379, 1987.
- [16] M. Hahn, H. Lünsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. Höfle, J. Boenigk und P. Stadler, „Isolation of novel Ultramicrobacteria Classified as Actinobacteria from Five Freshwater Habitats in Europe and Asia,“ *Appl. Env. Microbiol.*, Bd. 69, p. 1442–1451, 2003.
- [17] M. Hahn und M. Höfle, „Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. Mini-Review.,“ *FEMS Microbiology Ecology*, Nr. 35, pp. 113-121, 2001.
- [18] J. Pernthaler, T. Posch, K. Simek, J. Vrba, A. Pernthaler, F. Glöckner, U. Nübel, R. Psenner und R. Amann, „Predator-specific enrichment of actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture.,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 67, p. 2145–2155, 2001.
- [19] M. W. Hahn, E. R. B. Moore und M. G. Höfle, „Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla.,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Nr. 65, pp. 25-35, 1999.

- [20] S. Langenheder und K. Jürgens, „Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation,“ *Limnol. Oceanogr.*, Bd. 46, Nr. 1, p. 121–134, 2001.
- [21] K. Šimek, K. Hornák, M. Masín, U. Christaki, J. Nedoma, M. Weinbauer und J. Dolan, „Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir,“ *Aquat. Microb. Ecol.*, Nr. 31, pp. 123-135, 2003.
- [22] G. Zwart, B. Crump, M. Kamst-van Agterveld, HagenF. und S.-K. Han, „Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers,“ *Aquat. Microb. Ecol.*, Bd. 28, pp. 141-155, 2002.
- [23] A. Yannarell und A. Kent, „Bacteria, Distribution and Community Structure,“ in *Plankton of Inland Waters*, G. Likens, Hrsg., Academic Press, 2010, p. 412.
- [24] F. Glöckner, E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler und R. Amann, „Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of Actinobacteria,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 66, p. 5053–5065, 2000.
- [25] M. Allgaier und H.-P. Grossart, „Seasonal dynamics and phylogenetic diversity of free-living and particle-associated bacterial communities in four lakes in northeastern Germany,“ *Aquat. Microb. Ecol.*, Bd. 45, p. 115–128, 2006.
- [26] R. Newton, S. Jones, M. Helmus und K. McMahon, „Phylogenetic Ecology of the Freshwater Actinobacteria acl Lineage,“ *Appl. Env. Microbiol.*, Bd. 73, p. 7169–7176., 2007.
- [27] R. Ghai, C. Mizuno, A. C. Picazo, A. und F. Rodriguez-Valera, „Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing,“ *Molecular Ecology*, Bd. 23, p. 6073–6090, 2014.
- [28] F. Warnecke, R. Amann und J. Pernthaler, „Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages,“ *Environ. Microbiol.*, Bd. 6, p. 242–253, 2004.
- [29] E. S. Lindström, M. P. Kamst-Van Agterveld und G. Zwart, „Lindström, E. S., Kamst-Van Agterveld, M. P. and Zwart, G. (2005) Distribution of Typical Freshwater Bacterial Groups Is Associated with pH, Temperature, and Lake Water Retention Time,“ *AEM*, Bd. 71, Nr. 12, p. 8201–8206, 2005.
- [30] R. Stepanauskas, M. A. Moran, B. A. Bergamaschi und J. T. Hollibaugh, „Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system,“ *Aquat Microb Ecol*, Bd. 31, p. 85–98, 2003.
- [31] M. Allgaier, S. Brückner, E. Jaspers und H.-P. Grossart, „Intra- and inter-lake variability of free-living and particle-associated Actinobacteria communities,“ *Environmental Microbiology*, Bd. 9, Nr. 11, p. 2728–2741, 2007.
- [32] A. Sharma, K. Sommerfeld, G. Bullerjahn, A. Matteson, S. Wilhelm, J. Jezbera, U. Brandt, F. Doolittle und M. Hahn, „Actinorhodopsin genes discovered in diverse freshwater habitats and among cultivated freshwater Actinobacteria,“ *The ISME Journal*, Bd. 3, pp. 726-737, 2009.
- [33] J. Jezberová, J. Jezbera und M. Hahn, „Insights into Variability of Actinorhodopsin Genes of the LG1 Cluster in Two Different Freshwater Habitats,“ *Plos One*, Nr. 7, 2013.
- [34] M. García, B. Swan, N. Poulton, M. Gomez, D. Masland, M. Sieracki und R. Stepanauskas, „High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton,“ *The ISME Journal*, Nr. 6, pp. 113-123, 2012.
- [35] M. Salcher, J. Pernthaler und T. Posch, „Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria ‘that rule the waves’ (LD12),“ *The ISME Journal*, Nr. 5, pp. 1242-1252, 2011.

- [36] M. Bahr, H. J.E. und M. Sogin, „Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR11 cluster,“ *Aquat Microb Ecol*, Bd. 11, pp. 271-277, 1996.
- [37] Q. Wang, M. G. Garrity, J. Tiedje und J. R. Cole, „Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy,“ *Appl Environ Microbiol.*, Bd. 73, Nr. 16, pp. 5261-7, 2007.
- [38] F. Heinrich, A. Eiler und S. Bertilsson, „Seasonality and environmental control of freshwater SAR11 (LD12) in a temperate lake (Lake Erken, Sweden),“ *Aquat Microb Ecol.*, Bd. 70, p. 33–44, 2013.
- [39] M. Salcher, T. Posch und J. Pernthaler, „In situ substrate preferences of abundant bacterioplankton populations in a prealpine freshwater lake,“ *The ISME Journal*, Nr. 7, p. 896–907, 2013.
- [40] M. P. Ferla, J. Thrash, S. Giovannoni und W. Patrick, „New rRNA Gene-Based Phylogenies of the Alphaproteobacteria Provide Perspective on Groups, Mitochondrial Ancestry and Phylogenetic Instability,“ *Plos One*, Bd. 8, Nr. 12, 2013.
- [41] K. Šimek, J. Vrba, P. J. T. Posch, P. Hartmann, J. Nedoma und R. Psenner, „Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes,“ *Appl Environ Microbiol*, Bd. 63, Nr. 2, pp. 587-595, 1997.
- [42] K. Jürgens, J. Pernthaler, S. Schalla und R. Amann, „Morphological and Compositional Changes in a Planktonic Bacterial Community in Response to Enhanced Protozoan grazing,“ *App Environ Microbiol*, Bd. 65, Nr. 3, pp. 1241-1250, 1999.
- [43] I. L. Bagatini, A. Eiler, S. Bertilsson, D. Klaveness, L. Tessarolli und A. Vieira, „Host-Specificity and Dynamics in Bacterial Communities Associated with Bloom-Forming Freshwater Phytoplankton,“ *Plos One*, Bd. 9, Nr. 1, 2014.
- [44] A. Willems, „The family comamonadaceae,“ in *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, E. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt und F. Thompson, Hrsg., Berlin Heidelberg: , Springer, 2014, p. 777–851.
- [45] V. Kasalicky, J. Jezbera, M. Hahn und K. Šimek, „The Diversity of the Limnohabitans Genus, an Important Group of Freshwater Bacterioplankton, by Characterization of 35 Isolated Strains,“ *PLoS ONE*, Bd. 8, Nr. 3, 2013.
- [46] K. Šimek, V. Kasalický, J. Jezbera, J. Jezberová und M. Hahn, „Broad habitat range of the phylogenetically narrow R-BT065 cluster, representing a core group of the betaproteobacterial genus Limnohabitans,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 76, p. 631–639, 2010.
- [47] K. Šimek, K. Hornák, J. Jezbera, M. Masín, J. Nedoma, J. Gasol und M. Schauer, „Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster of beta-proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Nr. 71, p. 2381–2390, 2005.
- [48] K. Šimek, J. Pernthaler, M. Weinbauer, K. Hornák, J. Dolan, J. Nedoma, M. Mašín und R. Amann, „Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Nr. 67, pp. 2723-2733, 2001.
- [49] M. W. Hahn, E. Lang, M. Tarao und U. Brandt, „Polynucleobacter rarus sp. nov., a free-living planktonic bacterium isolated from an acidic lake,“ *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Nr. 61, p. 781–787, 2011.
- [50] M. Hahn, E. Lang, U. Brandt und C. Spröer, „Polynucleobacter acidiphobus sp. nov., a representative of an abundant group of planktonic freshwater bacteria,“ *Int J Syst Evol Microbiol.*, Nr. 61, pp. 788-94., 2011.
- [51] M. Hahn, E. Lang, U. Brandt, Q. Wu und T. Scheuerl, „Emended description of the genus Polynucleobacter and the species Polynucleobacter necessarius and proposal of two subspecies,

- P. necessarius subsp. necessarius subsp. nov. and P. necessarius subsp. asymbioticus subsp. nov.," *Int J Syst Evol Microbiol.*, Nr. 59, 2009.
- [52] M. Hahn, E. Lang, U. Brandt, H. Lünsdorf, Q. Wu und E. Stackebrandt, „Polynucleobacter cosmopolitanus sp. nov., free-living planktonic bacteria inhabiting freshwater lakes and rivers.," *Int J Syst Evol Microbiol.*, Nr. 60, pp. 166-173, 2010.
- [53] Q. L. Wu und M. Hahn, „High predictability of the seasonal dynamics of a species-like Polynucleobacter population in a freshwater lake," *Environmental Microbiology*, Bd. 8, Nr. 9, p. 1660–1666, 2006.
- [54] Q. L. Wu, G. Zwart, M. Schauer, M. Kamst-van Agterveld und M. Hahn, „Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau,China," *Appl. Environ. Microbiol.*, Nr. 72, p. 5478–5485, 2006.
- [55] M. M. Salcher, S. Neuenschwander, T. Posch und J. Pernthaler, „The ecology of pelagic freshwater methylootrophs assessed by a high-resolution monitoring and isolation campaign," *The ISME Journal*, Nr. 9, pp. 2442-2453, 2015.
- [56] D. Kirchmann, „The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. Mini-Review," *FEMS Microbiology Ecology*, Nr. 39, pp. 91-100, 2002.
- [57] W. Ludwig, J. Euzéby und W. Whitman, „Taxonomic outlines of the phyla Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes," in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Bde. 1 von 2 Volume Four The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes, J. T. S. D. R. B. B. P. H. B. J. P. N. L. W. W. L. W. B. W. Noel R. Krieg, Hrsg., 2010.
- [58] C. Lemarchand, L. Jardillier, J. Carrias, M. Richardot und D. Debroas, „Community composition and activity of prokaryotes associated to detrital particles in two contrasting lake ecosystems," *FEMS Microbiol Ecol*, Nr. 57, p. 442–451, 2006.
- [59] A. Eiler, S. Langenheder, S. Bertilsson und L. Tranvik, „Heterotrophic Bacterial Growth Efficiency and Community Structure at Different Natural Organic Carbon Concentrations," *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 69, Nr. 7, pp. 3701-3709, 2003.
- [60] A. Eiler und S. Bertilsson, „Flavobacteria blooms in four eutrophic lakes: linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability.," *Appl. Environ. Microbiol.*, Nr. 73, p. 3511–3518, 2007.
- [61] J. Z. E. Pernthaler, F. Warnecke und K. Jürgens, „Bloom of Filamentous Bacteria in a Mesotrophic Lake: Identity and Potential Controlling Mechanism," *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 70, Nr. 10, p. 6272–6281, 2004.
- [62] J. Comte, S. Jacquet, S. Viboud, D. Fontvieille, A. Millery und G. D. I. Paolini, „Microbial community structure and dynamics in the largest natural french lake (Lake Bourget)," *Microb Ecol.*, Bd. 52, Nr. 1, pp. 72-89, 2006.
- [63] M. Schauer, J. Jiang und M. Hahn, „Recurrent Seasonal Variations in Abundance and Composition of Filamentous SOL Cluster Bacteria (Saprospiraceae, Bacteroidetes) in Oligomesotrophic Lake Mondsee (Austria)," *AEM*, Bd. 72, Nr. 7, pp. 4704-4712, 2006.
- [64] M. Schauer und M. Hahn, „Diversity and Phylogenetic Afilations of Morphologically Conspicuous Large Filamentous Bacteria Occurring in the Pelagic Zones of a Broad Spectrum of Freshwater Habitats," *Appl. Environ. Microbiol.*, Nr. 71, pp. 1931-1940, 2005.

- [65] M. Schauer, C. Kamenik und M. Hahn, „Ecological Differentiation within a Cosmopolitan Group of Planktonic Freshwater Bacteria (SOL Cluster, Saprospiraceae, Bacteroidetes),“ *Appl. Environ. Microbiol.* October 2005, Bd. 71, Nr. 10, pp. 5900-5907, 2005.
- [66] B. Parveen, I. Mary, A. Vellet, V. Ravet und D. Debroas, „Temporal dynamics and phylogenetic diversity of free-living and particle-associated Verrucomicrobia communities,“ *FEMS Microbiol Ecol*, Nr. 83, p. 189–201, 2013.
- [67] E. Kolmonen, K. Sivonen, J. Rapala und K. Haukka, „Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland,“ *Aquat Microb Ecol*, Nr. 36, p. 201–211, 2004.
- [68] J. Arnds, K. Knittel, U. Buck, M. Winkel und R. Amann, „Development of a 16S rRNA-targeted probe set for Verrucomicrobia and its application for fluorescence in situ hybridization in a humic lake,“ *Systematic and Applied Microbiology*, Nr. 33, p. 139–148, 2010.
- [69] E. Lindström, K. Vrede und E. Leskinen, „Response of a member of the Verrucomicrobia, among the dominating bacteria in a hypolimnion, to increased phosphorus availability,“ *J. Plankton Res.*, Bd. 26, Nr. 2, pp. 241-246., 2004.
- [70] J. W. Schopf, „The fossil record: Tracing back the roots of the cyanobacterial lineage,“ in *The ecology of cyanobacteria*, B. A. Whitton und M. Potts, Hrsg., Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2000, pp. 13-35.
- [71] C. F. Delwiche und J. D. Palmer, in *Origins of the Algae and Their Plastids*, D. Bhattacharya, Hrsg., Berlin, Springer, 1997, p. 53–96.
- [72] H. W. Paerl und J. Huisman, „Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms,“ *Environmental Microbiology Reports*, Bd. 1, Nr. 1, p. 27–37, 2009.
- [73] H. Paerl, N. Hall und E. Calandrino, „Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change,“ *Science of the Total Environment*, Bd. 409, p. 1739–1745, 2011.
- [74] L. R. Mur, O. M. Skulberg und H. Utkilen, „Cyanobacteria in the environment,“ in *Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, I. Chorus und J. Bartram, Hrsg., 1999.
- [75] D. M. Kehoe, „Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria,“ *PNAS*, Bd. 107, Nr. 20, pp. 9029-9032, 2010.
- [76] A. Grossmann, D. Bhaya und Q. He, „Tracking the Light Environment by Cyanobacteria ad the dynamic nature of light harvesting,“ *The Journal of biological Chemistry*, Bd. 276, Nr. 15, p. 11449–11452, 2001.
- [77] R. Castenholz, „Subsection III. Order Oscillatoriales,“ in *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, J. Staley, M. Bryant, N. Pfennig und J. Holt, Hrsg., Baltimore, Williams and Wilkins, 1989, p. 1771–1780.
- [78] A. Wilmotte, „Molecular evolution and taxonomy of the Cyanobacteria.,“ in *The molecular biology of cyanobacteria*, D. Bryant, Hrsg., Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic, 1994, p. 1–25.
- [79] S. Turner, „Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria.,“ *Pl Syst Evol (Suppl)*, Bd. 11, p. 13–52, 1997.
- [80] R. W. Castenholz, „Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria.,“ in *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, 2 Hrsg., Bd. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. , G. Garrity, D. Boone und R. Castenholz, Hrsg., New York, Springer-Verlag, 2001.

- [81] J. Komárek, „Modern classification of cyanobacteria,“ in *Cyanobacteria: An Economic Perspective*, 1 Hrsg., N. Sharma, A. K. Rai und L. J. Stal, Hrsg., John Wiley & Sons, Ltd., 2014.
- [82] J. Johansen und D. Casamatta, „Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm,“ *Algological Studies*, Bd. 117, pp. 71-93, 2005.
- [83] J. Komárek, „Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches,“ *Algae*, Bd. 21, pp. 349-375, 2006.
- [84] H. Horn und W. Horn, „Sedimentation – the Main Loss Factor in Waters Dominated by Diatoms. Results of Long-Term Investigations,“ *Internat. Rev. Hydrobiol.*, Bd. 85, p. 191–208, 2000.
- [85] H. Horn, L. Paul, W. U. D. Horn und I. Röske, „Climate change impeded the re-oligotrophication of the Saidenbach reservoir,“ *International Review of Hydrobiology*, Nr. 100, pp. 43-60, 2015.
- [86] H. Horn, „The relative importance of climate and nutrients in controlling phytoplankton growth in Saidenbach Reservoir,“ *Hydrobiologia*, Bd. 504, p. 159–166, 2003.
- [87] G. Olsen, D. Lane, S. L. Giovannoni und N. Pace, „Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach,“ *Ann. Rev. Microbiol.*, Nr. 40, pp. 337-365, 1986.
- [88] G. Rothe, „Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie,“ in *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, U. Sack, A. Tárnok und G. Rothe, Hrsg., Basel, Karger, 2007, pp. 27-70.
- [89] BD Biosciences, „Multiparametric Analysis of Aquatic Organisms Using Flow Cytometry. White paper,“ 2011.
- [90] D. Marie, F. Partensky, D. Vaultot und C. Brussaard, „Enumeration of Phytoplankton, Bacteria, and Viruses in Marine Samples,“ *Current Protocols in Cytometry.*, Bd. 10, Nr. 11, 2001.
- [91] BD Biosciences, Heidelberg, D, „Kits and Templates for the BD Accuri™ C6,“ 2014. [Online]. Available: <http://www.bdbiosciences.com/jp/go/templates/kitsandtemplates.jsp>. [Zugriff am 2014].
- [92] BD Biosciences, „Accuri Absolute counting guide. Technical Note,“ 2010. [Online]. Available: http://www.dddmag.com/sites/dddmag.com/files/legacyimages/White_Papers/Accuri_Absolute_Counting_Guide_V2.pdf.
- [93] M. Beutler, K. Wiltshire, B. Meyer, C. Moldaenke, C. Lüring, M. Meyerhöfer, U. P. Hansen und H. Dau, „A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ,“ *Photosynthesis Research*, Bd. 72, pp. 39-53, 2002.
- [94] J. Wehr und R. Sheath, *Freshwater algae of North America. Ecology and classification.*, San Diego: Academic Press, Elsevier, San Diego, 2003, 2003.
- [95] C. Reynolds, *Ecology of phytoplankton*, Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- [96] H. MacIntyre, T. Kana, T. Anning und R. Geider, „Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria,“ *Journal of Phycology*, Nr. 38, pp. 17-38, 2002.
- [97] M. Beutler, K. Wiltshire, M. Arp, J. Kruse, C. Reineke, C. Moldaenke und U.-P. Hansen, „A reduced model of the fluorescence from the cyanobacterial photosynthetic apparatus designed for the in situ detection of cyanobacteria,“ *Biochimica et Biophysica Acta*, Nr. 1604, pp. 33-46, 2003.
- [98] B. Desortová, „Relationship between Chlorophyll a-Concentration and Phytoplankton Biomass in Several Reservoirs in Czechoslovakia,“ *Int. Rev. ges. Hydrobiol.*, Bd. 66, Nr. 2, pp. 153-169, 1981.
- [99] L. Vörös und J. Padisak, „Phytoplankton biomass and chlorophyll-a in some shallow lakes in central Europe,“ *Hydrobiologia*, Bd. 215, pp. 111-119, 1991.

- [100] T. Buchaca, M. Felip und J. Catalan, „A comparison of HPLC pigment analyses and biovolume estimates of phytoplankton groups in an oligotrophic lake,“ *Journal of Plankton Research*, Bd. 27, Nr. 1, pp. 91-101, 2005.
- [101] R Core Team, „R: A language and environment for statistical computing,“ R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Austria, 2016.
- [102] D. Lane, „16S/23S rRNA sequencing,“ in *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, E. Stackebrandt und M. Goodfellow, Hrsg., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1991, pp. 115-175.
- [103] G. Muyzer, E. Dewaal und A. Uitterlinden, „Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16S Ribosomal-RNA,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Nr. 59, pp. 695-700., 1993.
- [104] U. Nübel, F. Garcia-Pichel und G. Muyzer, „PCR primers to amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology 63: 3327-3332,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Nr. 63, pp. 3327-3332, 1997.
- [105] G. Zwart, M. Kamst-van Agterveld, I. van der Werff-Staverman, F. Hagen, H. Hoogveld und H. Gons, „Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake,“ *Environmental Microbiology*, Nr. 7, pp. 365-377, 2005.
- [106] J. Overmann, M. Coolen und C. Tuschak, „Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments,“ *Arch Microbiol*, Nr. 172, p. 83–94, 1999.
- [107] H. U. Uphoff, A. Felske, W. Fehr und I. Wagner-Döbler, „The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates,“ *FEMS Microbiology Ecology*, Nr. 35, pp. 249-258, 2001.
- [108] R. Amann, W. Ludwig und K. Schleifer, „Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation,“ *Microbiol Rev.*, Bd. 59, Nr. 1, pp. 143-169, 1995.
- [109] C. Lepere, A. Wilmotte und B. Meyer, „Molecular Diversity of Microcystis strains (Cyanophyceae, Chroococcales) Based on 16S rDNA Sequences,“ *Systematics and Geography of Plants*, Nr. 70, pp. 275-283, 2000.
- [110] J. Messing, W. Ray und M. Kivie, „New M13 vectors for cloning,“ in *Methods in Enzymology*, Amsterdam, The Netherlands, Academic Press, 1983, p. pp 20–78.
- [111] G. Muyzer und K. Smalla, „Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology,“ *Antonie Van Leeuwenhoek*, Bd. 73, Nr. 1, pp. 127-141, 1998.
- [112] S. DasSarma und E. Fleischmann, *Archaea: A Laboratory Manual – Halophiles*. s.l., New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1995, p. 269–272..
- [113] Roche Diagnostics GmbH, „Roche 454 Sequencing Brochure,“ 2006. [Online]. Available: https://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc411/roche-454-gs20-sequencing_system.pdf. [Zugriff am 2017].
- [114] J. F. Petrosino, S. Highlander, R. A. Luna, R. Gibbs und J. Vresalovic, „Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification (Review);“ *Clinical Chemistry*, Bd. 55, Nr. 5, p. 856–866, 2009.
- [115] P. Schloss, D. Gevers und S. Westcott, „Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies,“ *PLoS One*, Bd. 6, Nr. 12, p. e27310, 2011.
- [116] P. Schloss, S. Westcott, T. Ryabin, J. Hall, M. Hartmann, E. Hollister, R. Lesniewski, B. Oakley, D. Parks, C. Robinson, J. Sahl, B. Stres, G. Thallinger, D. Van Horn und C. Weber, „Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities,“ *AEM*, Bd. 75, Nr. 23, pp. 7537-7541, 2009.

6 Literaturverzeichnis

- [117] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies und F. Glöckner, „The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools,“ *Nucl. Acids Res.* 41, Bd. 41, pp. D590-D596, 2013.
- [118] K. Kubota, „CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement and Future Applications,“ *Microbes Environ.*, Bd. 28, Nr. 1, pp. 3-12, 2013.
- [119] A. Pernthaler, J. Pernthaler und R. Amann, „Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria,“ *Appl. Environ. Microbiol. June*, Bd. 68, Nr. 6, pp. 3094-3101, 2002.
- [120] T. Ezaki und S. Suzuki, „Achromopeptidase for lysis of anaerobic gram-positive cocci,“ *J Clin Microbiol.*, Bd. 16, Nr. 5, pp. 844-846, 1982.
- [121] R. Amann, B. J. Binder, R. Olson, S. Chisholm, R. Devereux und D. Stahl, „Combination of 16S Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow-Cytometry for Analyzing Mixed Microbial-Populations,“ *Applied and Environmental Microbiology* 56: 19, Nr. 56, pp. 1919-1925, 1990.
- [122] H. Daims, A. Bruhl, R. Amann, K. Schleifer und M. Wagner, „The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. Systematic and Applied Microbiology 22: 434-44,“ *Systematic and Applied Microbiology*, Nr. 22, pp. 434-444, 1999.
- [123] G. Wallner, R. Amann und W. Beisker, „Optimizing Fluorescent In situ Hybridization with Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms,“ *Cytometry*, Nr. 14, pp. 136-143, 1993.
- [124] A. Neef, Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Dissertation, München, Technische Universität, 1997.
- [125] W. Manz, R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner und K. Schleifer, „Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria - Problems and Solutions.,“ *Systematic and Applied Microbiology* 15: 593-600, Nr. 15, pp. 593-600, 1992.
- [126] Q. Wang, G. Garrity, J. Tiedje und J. Cole, „Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy,“ *Appl Environ Microbiol*, Bd. 73, Nr. 16, pp. 5261-7, 2007.
- [127] S. G. W. M. W. M. E. & L. D. Altschul, „Basic local alignment search tool.,“ *tool. J Mol Biol.*, Bd. 215, pp. 403-410, 1990.
- [128] K. Tamura, J. Dudley, M. Nei und S. Kumar, „MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.,“ *Molecular Biology and Evolution*, Bd. 24, pp. 1596-1599, 2007.
- [129] K. Pearson, „Pearson, K. (1926) On the coefficient of radical likeliness.,“ *Biometrika*, Bd. 18, pp. 105-117, 1926.
- [130] R. Sokal und C. Michener, „A statistical method for evaluating systematic relationships,“ *University of Kansas Science Bulletin*, Bd. 38, p. 1409–1438, 1958.
- [131] J. Oksanen, F. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. Minchin, R. O’Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. Henry, H. Stevens, E. Szoecs und H. Wagner, „vegan: Community Ecology Package,“ 2017.
- [132] D. Sarkar, Lattice: Multivariate Data Visualization with R, New York: Springer, 2008.
- [133] G. L. Simpson, „permute: Functions for Generating Restricted Permutations of Data,“ 2016.
- [134] R. Kindt und R. Coe, „Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methodsfor ecological and biodiversity studies.,“ World Agroforestry Centr (ICRAF), Nairobi, 2005.

- [135] LfULG Sachsen, „Gewässerkundlicher Monatsbericht August 2015,“ August 2015. [Online]. Available: https://www.umwelt.sachsen.de/umwelt/wasser/download/Monatsbericht_2015_08_.pdf. [Zugriff am 2016].
- [136] LfULG Sachsen, „Agrarmeteorologisches Messnetz Sachsen; Station Forchheim,“ 2016. [Online]. Available: <http://www.landwirtschaft.sachsen.de/Wetter09/asp/inhalt.asp?seite=twerte>. [Zugriff am 2016].
- [137] J. B. H. Schwoerbel, Einführung in die Limnologie, 10. Auflage Hrsg., Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2013.
- [138] F.-X. Fu, M. E. Warner, Y. F. Y. Zhang und D. A. Hutchins, „Effects of increased temperature and CO₂ on Photosynthesis, Growth and Elemental ratios in marine Synechococcus and Prochlorococcus (Cyanobacteria),“ *Journal of Phycology*, Bd. 43, pp. 485-496, 2007.
- [139] T. Rutten, B. Sandee und A. Hofman, „Phytoplankton Monitoring by High Performance Flow Cytometry: A Successful Approach?,“ *Cytometry*, Nr. 64A, p. 16–26, 2005.
- [140] M. Zuker, „Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.,“ *Nucleic Acids Res.*, Bd. 31, Nr. 13, pp. 3406-3415, 2003.
- [141] J. SantaLucia, „A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics.,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Bd. 95, pp. 1460-1465, 1998.
- [142] N. Peyret, Prediction of Nucleic Acid Hybridization: Parameters and Algorithms, Detroit, MI : PhD dissertation, Wayne State University, Department of Chemistry, 2000.
- [143] V. Riou, M. Périot und I. Biegala, „Specificity Re-evaluation of Oligonucleotide Probes for the Detection of Marine Picoplankton by Tyramide Signal Amplification-Fluorescent In Situ Hybridization,“ *Frontiers in Microbiology*, Bd. 8, 2017.
- [144] A. Chao, „Nonparametric estimation of the number of classes in a population,“ *Scand J Stat.*, Bd. 11, Nr. 4, pp. 265-270, 1984.
- [145] A. Chao und S. Lee, „Estimating the Number of Classes via Sample Coverage.,“ *J Am Stat Assoc.*, Bd. 87, pp. 210-217, 1992.
- [146] S. Di Rienzi, I. W. K. Sharon, O. Koren, L. Hug, B. Thomas, J. Goodrich, J. Bell, T. Spector, J. Banfield und R. Ley, „The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to Cyanobacteria,“ *Elife*, 2013.
- [147] C. Blackwood, A. Oaks und J. S. Buyer, „Phylum- and Class-Specific PCR Primers for General Microbial Community Analysis.,“ *AEM*, Bd. 71, Nr. 10, 2005.
- [148] H. Luo, L. Thompson, U. Stingl und A. Hughes, „Selection Maintains Low Genomic GC Content in Marine SAR11 Lineages,“ *Mol Biol Evol*, Bd. 32, Nr. 10, pp. 2738-2748, 2015.
- [149] R. S. a. W. A. M. Weyant, „Roseomonas,“ in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons Inc., 2015.
- [150] F. Gich, K. Schubert, A. Bruns, H. Hoffelner und J. Overmann, „pecific Detection, Isolation, and Characterization of Selected,Previously Uncultured Members of the Freshwater Bacterial Community,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 70, Nr. 10, p. 5908–5919, 2005.
- [151] Q. G. M. G. J. M. T. a. J. R. C. Wang, „Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy,“ *Appl Environ Microbiol.*, Bd. 73, Nr. 16, pp. 5261-5267, 2007.
- [152] J. Gregor und B. Maršálek, „Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods.,“ *Water Research*, Bd. 38, Nr. 3, pp. 517-522, 2004.

- [153] J. Gregor, R. Geris, B. Marsalek, J. Hetesa und P. Marvan, „Gregor, J. et al., 2005. In situ quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer. *Hydrobiologia*, Band 548, p. 141–151.“ *Hydrobiologia*, Bd. 548, pp. 141-151, 2005.
- [154] A. Ghadouani und R. Smith, „Ghadouani, A. & Smith, R., 2005. Phytoplankton Distribution in Lake Erie as Assessed by a New in situ Spectrofluorometric Technique. *J. Great Lakes Res.*, Issue 31, p. 154–167.“ *J. Great Lakes Res.*, Nr. 31, pp. 154-167, 2005.
- [155] A. Rolland, F. Rimet und S. Jacquet, „Rolland, A., Rimet, F. & Jacquet, S., 2010. A 2-year survey of phytoplankton in the Marne Reservoir (France): A case study to validate the use of an in situ spectrofluorometer by comparison with algal taxonomy and chlorophyll a measurements.“ *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, Bd. 398, Nr. 02, pp. 1-19, 2010.
- [156] X. Liu, B. Huang, Z. Liu, L. Wang, H. Wei, C. Li und Q. Huang, „High-resolution phytoplankton diel variations in the summer stratified central Yellow Sea. *J. Oceanogr.*, Issue 68, p. 913–927.“ *J. Oceanogr.*, Nr. 68, pp. 913-927, 2012.
- [157] T. L. Richardson, E. Lawrenz, J. Pinckney, R. Guajardo, E. Walker, H. Paerl und H. MacIntyre, „Spectral fluorometric characterization of phytoplankton community composition using the Algae Online Analyser.“ *Water Res*, Nr. 44, p. 2461– 2472, 2010.
- [158] E. A. Goldman, E. M. Smith und T. L. Richardson, „Estimation of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) and photosynthetic activity of estuarine phytoplankton using a multiple-fixedwavelength spectral fluorometer.“ *Water Res.*, Nr. 47, p. 1616–1630, 2013.
- [159] J. H. See, L. Campbell, T. Richardson, J. Pincknell und R. Shen, „Combining new technologies for determination of phytoplankton community structure in the northern Gulf of Mexico.“ *Journal of Phycology*, Bd. 41, pp. 305-310, 2005.
- [160] M. Felip und J. Catalan, „The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima.“ *J. Plankton Res.*, Bd. 22, Nr. 1, pp. 91-106, 2000.
- [161] N. Escoffier, C. Bernard, S. Hamlaoui, A. Groleau und A. Catherine, „ Quantifying phytoplankton communities using spectral fluorescence: the effects of species composition and physiological state.“ *J. Plankton Res.*, Bd. 37, Nr. 1, p. 233–247, 2015.
- [162] A. Catherine, N. Escoffier, A. Belhocine, B. Nasri, S. Hamlaoui, C. Yéprémian, C. Bernard und M. Troussellier, „On the use of the FluoroProbe (R), a phytoplankton quantification method based on fluorescence excitation spectra for large-scale surveys of lakes and reservoirs.“ *Water Res.*, Nr. 46, pp. 1771-1784, 2012.
- [163] G. Dubelaar und R. Jonker, „Flow Cytometry as a tool for the study of phytoplankton.“ *Scientia Marina*, Bd. 64, Nr. 2, pp. 135-156, 2000.
- [164] H. Horn und W. Horn, „Bottom-up or top-down – How is the autotrophic picoplankton mainly controlled?“ *Limnologica*, Bd. 38, p. 302–312, 2008.
- [165] R. Robarts und G. Carr, „Bacteria, Bacterioplankton.“ in *Plankton of Inland waters*, G. Likens, Hrsg., Elsevier Academic Press, 2010.
- [166] F. O. Glöckner, B. M. Fuchs und R. Amann, „Glöckner, F. O., Fuchs, B. M., & Amann, R. (1999). Bacterioplankton Compositions of Lakes and Oceans: a First Comparison Based on Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3721–3726.“ *Applied and Environmental Microbiology*, Bd. 65, Nr. 8, p. 3721–3726, 1999.
- [167] V. Kisand und J. Wikners, „V. Kisand, J. Wikner / *Journal of Microbiological Methods* 54 (2003) 183–191: Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences.“ *Journal of Microbiological Methods*, Bd. 54, pp. 183-184, 2003.

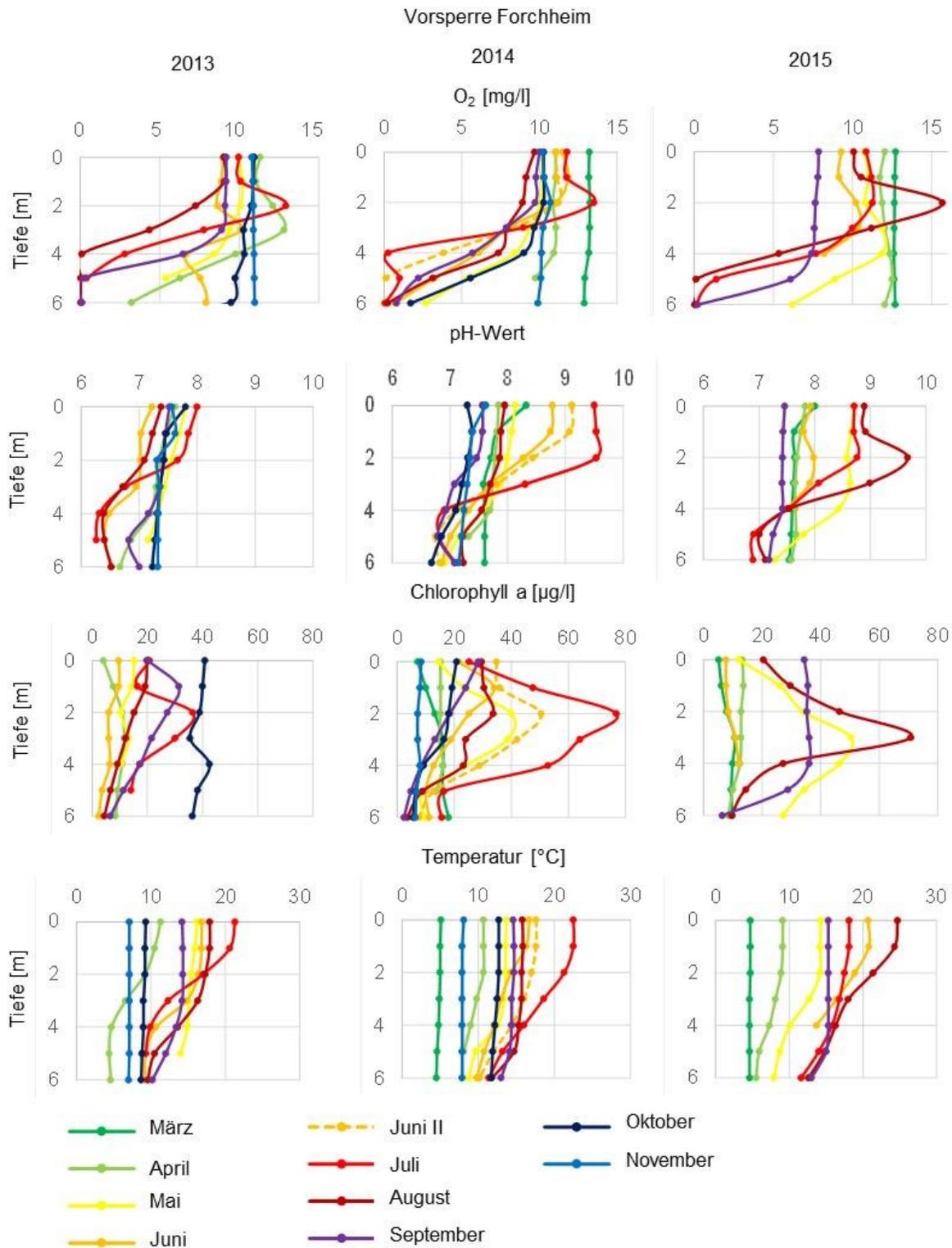
- [168] E. van Hannen, W. Mooij, M. van Agterveld, H. Gons und H. Laanbroek, „Detritus-Dependent Development of the Microbial Community in an Experimental System: Qualitative Analysis by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis,“ *Appl Environ Microbiol.* 1999 Jun; 65(6): 2478–2484. PMID: PMC91365, Bd. 65, Nr. 6, p. 2478–2484, 1999.
- [169] A. Speksnijder, G. Kowalchuk, S. De Jong, E. Kline, J. Stephen und H. Laanbroek, „Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences.,“ *Appl Environ Microbiol.*, Bd. 67, Nr. 1, pp. 469-472, 2001.
- [170] J. W. Neilson, F. L. Jordan und R. M. Maier, „Analysis of Artifacts Suggests DGGE Should Not Be Used For Quantitative Diversity Analysis,“ *Journal of Microbiological Methods*, Bd. 92, Nr. 3, p. 256–263, 2013.
- [171] T. Větrovský und P. Baldrian, „The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses.,“ *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 2, 2013.
- [172] S. Louca, M. Doebeli und L. W. Parfrey, „Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome*, 6, 41. <http://doi.org/10.1186/s40168-018-0420-9>,“ *Microbiome*, Bd. 6, Nr. 41, 2018.
- [173] S. Rösel, M. Allgaier und H. Grossart, „Long-Term Characterization of Free-Living and Particle-Associated Bacterial Communities in Lake Tiefwaren Reveals Distinct Seasonal Patterns,“ *Microb Ecol*, Bd. 64, p. 571–583, 2012.
- [174] A. Shade, A. Kent, S. E. Jones, R. Newton, E. Triplett und K. McMahon, „Interannual dynamics and phenology of bacterial communities in a eutrophic lake,“ *Limnology and Oceanography*, Bd. 52, Nr. 2, pp. 487-494, 2007.
- [175] A. Kent, A. Yannarell, J. Rusak, E. Triplett und K. McMahon, „Synchrony in aquatic microbial community dynamics,“ *ISME*, Bd. 1, p. 38–47, 2007.
- [176] K. Van der Gucht, T. Vandekerckhove, N. Vloemans, S. Cousin, K. Muylaert, K. Sabbe, M. Gillis, S. Declerk, L. De Meester und W. Vyverman, „Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure,“ *FEMS Microbiology Ecology*, Bd. 53, p. 205–220, 2005.
- [177] M. Lirós, Ö. Inceoğlu, T. García-Armisen, A. Anzil, B. P. L.-M. Leporcq und e. al., „Bacterial Community Composition in Three Freshwater Reservoirs of Different Alkalinity and Trophic Status.,“ *PLoS ONE*, Bd. 9, Nr. 12, 2014.
- [178] M. Avila, P. Staehr, F. Barbosa, E. Chartone-Souza und A. Nascimento, „Seasonality of freshwater bacterioplankton diversity in two tropical shallow lakes from the Brazilian Atlantic Forest,“ *FEMS Microbiology Ecology*, Bd. 93, Nr. 1, 2017.
- [179] J. Keshri, A. Pradeep Ram, P. Nana und T. Sime-Ngando, „Taxonomical Resolution and Distribution of Bacterioplankton Along the Vertical Gradient Reveals Pronounced Spatiotemporal Patterns in Contrasted Temperate Freshwater Lakes,“ *Microbial Ecology*, pp. 1-15, 2018.
- [180] A. Eiler, F. Heinrich und S. Bertilsson, „Coherent dynamics and association networks among lake bacterioplankton taxa,“ *ISME*, Bd. 6, p. 330–342, 2012.
- [181] J. Jezbera, A. Sharma, U. Brandt, F. Doolittle und M. Hahn, „Candidatus Planktophila limnetica, an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton,“ *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Bd. 59, p. 2864–2869, 2009.
- [182] T. W. Ghylis, S. L. Garcia, F. Moya, B. O. Oyserman, P. Schwientek, K. Forest, J. Mutschler, J. Dwulit-Smith, L. Chan, M.-G. M., S. A., R. Stepanauskas, H. Grossart, W. T., F. Warnecke, R. Malmstrom, B. S. und K. McMahon, „Comparative single-cell genomics reveals potential ecological niches for the freshwater actinobacteria lineage,“ *ISME J.*, Bd. 8, p. 2503–2516, 2014.

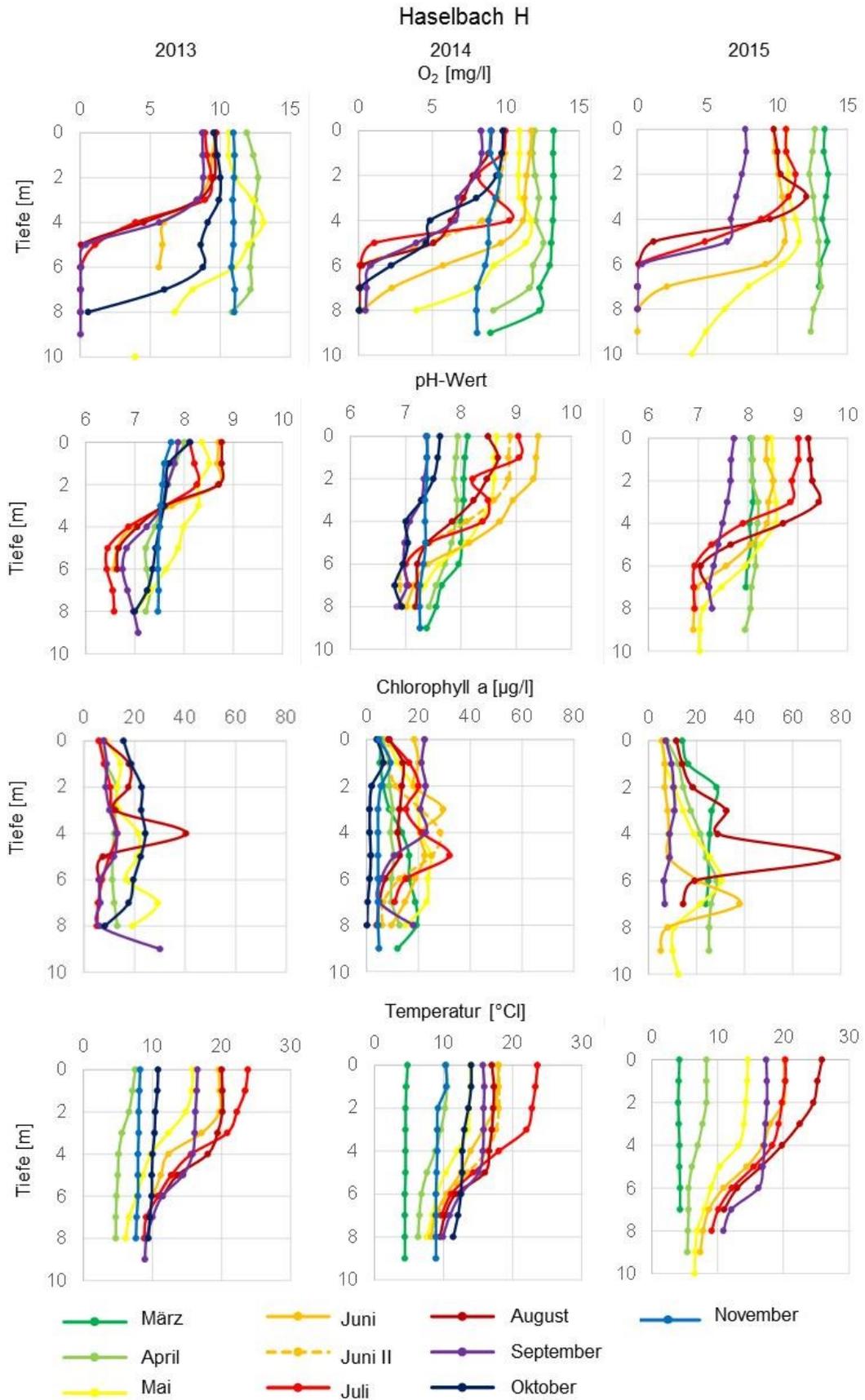
- [183] N. Saitou und M. Nei, „The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees,“ *Molecular Biology and Evolution*, Bd. 4, pp. 406-425, 1987.
- [184] T. Jukes und C. Cantor, „Evolution of protein molecules.,“ *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, 1969.
- [185] P. Kämpfer, N. Lidders und E. Falsen, „Hydrotalea flava gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes and allocation of the genera [...] to the family Chitinophagaceae fam. nov.,“ *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Bd. 61, Nr. 3, pp. 518-523, 2010.
- [186] Y. Kim, B. Kim, K. Kang und T. Ahn, „Sediminibacterium aquarii sp. nov., isolated from sediment in a fishbowl,“ *Int J Syst Evol Microbiol*, Bd. 66, Nr. 11, pp. 4501-4505, 2016.
- [187] H. Kang, H. Kim, Y. Joung, T. Jang und K. Joh, „Ferruginibacter paludis sp. nov., isolated from wetland freshwater, and emended descriptions of Ferruginibacter lapsinans and Ferruginibacter alkalientus,“ *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Bd. 56, p. 2635–2639, 2015.
- [188] L. Jin, H. Lee, H. La, S. Ko, C. Ahn und H. Oh, „Ferruginibacter profundus sp. nov., a novel member of the family Chitinophagaceae, isolated from freshwater sediment of a reservoir.,“ *Antonie Van Leeuwenhoek*, Bd. 106, Nr. 2, pp. 319-323, 2014.
- [189] D. Holmes, K. Nevin, T. Woodard, A. Peacock und D. Lovley, „Prolixibacter bellariivorans gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting, psychrotolerant anaerobe of the phylum Bacteroidetes, isolated from a marine-sediment fuel cell,“ *Int J Syst Evol Microbiol*, Bd. 57, Nr. 4, pp. 701-7, 2007.
- [190] A.-H. Li, H.-C. Liu und Y. Zhou, „Pedobacter alpinus sp. nov., isolated from a plateau lake,“ *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Bd. 65, p. 3782–3787, 2015.
- [191] V. Gallego, M. García und A. Ventosa, „Pedobacter aquatilis sp. nov., isolated from drinking water, and emended description of the genus Pedobacter.,“ *Int J Syst Evol Microbiol.*, Bd. 56, Nr. 8, pp. 1853-1858, 2006.
- [192] K. Hirooka, R. Asano und Y. Nakai, „Hirooka K, Asano R, Nakai Y. Change in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge during selective incubation for MPN determination. *J and Microbiol Biotechnol* 2009;36:679–685.,“ *J Ind Microbiol Biotechnol*, Bd. 36, p. 679–685, 2009.
- [193] C. Cheng, Z. Zaichao, D. Aizhonga, W. Jiayan, X. Jingfa und S. Yujiao, „Bar-Coded Pyrosequencing Reveals the Bacterial Community during Microcystis water Bloom in Guanting Reservoir, Beijing,“ *Procedia Engineering*, Bd. 18, p. 341 – 346, 2011.
- [194] M. Cottrell und D. Kirchman, „Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga[^]Flavobacteria cluster consuming low- and high- molecular-weight dissolved organic matter,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 66, pp. 1692-1697, 2000.
- [195] Y. Liu, H. Li, J. Jiang, Y. Liu, X. Song, C. Xu und Z. Liu, „Algoriphagus aquatilis sp. nov., isolated from a freshwater lake,“ *Int J Syst Evol Microbiol*, Bd. 59, Nr. 7, pp. 1759-1763, 2009.
- [196] Q. L. Wu und M. W. Hahn, „High predictability of the seasonal dynamics of a species-like Polynucleobacter-Population in a freshwater lake,“ *Environmental Microbiology*, Bd. 8, Nr. 9, pp. 1660-1666, 2006.
- [197] M. Hahn, J. Schmidt, A. Pitt, S. Taipale und E. Lang, „Reclassification of four Polynucleobacter necessarius strains as representatives of P. asymbioticus comb. nov., P. duraquae sp. nov., P. r yangtzensis sp. nov. and P. sinensis sp. nov., and emended description of Polynucleobacter necessarius.,“ *Int J Syst Evol Microbiol*, Bd. 66, Nr. 8, pp. 2883-92, 2016.

- [198] M. Hahn, E. Lang, U. Brandt, H. Lünsdorf, Q. Wu und E. Stackebrandt, „Polynucleobacter cosmopolitanus sp. nov., free-living planktonic bacteria inhabiting freshwater lakes and rivers.,” *Int J Syst Evol Microbiol.*, Bd. 60, pp. 166-173, 2010.
- [199] J. Jezbera, J. Jezberova, U. Koll, K. Hornak, K. Simek und M. W. Hahn, „Contrasting trends in distribution of four major planktonic betaproteobacterial groups along a pH gradient of epilimnia of 72 freshwater habitats,” *FEMS Microbiology Ecology*, Bd. 81, Nr. 2, pp. 467-479, 2012.
- [200] S. Chun, Y. Cui, S. Ko, H. Lee, A. Srivastava, H. Oh und C. Ahn, „Acidovorax lacteus sp. nov., isolated from a culture of a bloom-forming cyanobacterium (*Microcystis* sp.),” *Antonie Van Leeuwenhoek.*, Bd. 110, p. 1199–1205, 2017.
- [201] L. Gardan, C. Dauga, P. Prior, M. Gillis und G. Saddler, „Acidovorax anthurii sp. nov., a new phytopathogenic bacterium which causes bacterial leaf-spot of anthurium.,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Bd. 50, p. 235–246, 2000.
- [202] W. Chen, N. Cho, S. Yang, A. Arun, C. Young und S. Sheu, „Aquabacterium limnoticum sp. nov., isolated from a freshwater spring,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Bd. 62, p. 698–704, 2012.
- [203] S. Kalmbach, W. Manz, J. Wecke und U. Szewzyk, „Aquabacterium gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system.,” *Int J Syst Bacteriol*, Bd. 49, pp. 769-777, 1999.
- [204] S. Giovannoni, H. Tripp, S. Givan, M. Podar, K. Vergin, D. Baptista, L. Bibbs, J. Eads, T. Richardson, M. Noordewier, M. Rappe, J. Short, J. Carrington und E. Mathur, „Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium,” *Science*, Bd. 309, pp. 1242-1245, 2005.
- [205] K. M. L. Hutalle-Schmelzer, E. Zwirnmann, A. Krüger und H. Grossart, „Enrichment and cultivation of pelagic bacteria from a humic lake using phenol and humic matter additions,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, Bd. 72, p. 58–73, 2010.
- [206] E. Chiang, M. B. M. Schmidt, B. Biddanda, A. Burtner und T. e. a. Johengen, „Verrucomicrobia are prevalent in north-temperate freshwater lakes and display class-level preferences between lake habitats,” *PLoS ONE*, Bd. 13, 2018.
- [207] J. Lee, B. Park, S. Woo, J. Lee und J. Park, „Prostheco bacter algae sp. nov., isolated from activated sludge using algal metabolites.,” *Int J Syst Evol Microbiol.*, Bd. 64, Nr. 2, pp. 663-667, 2014.

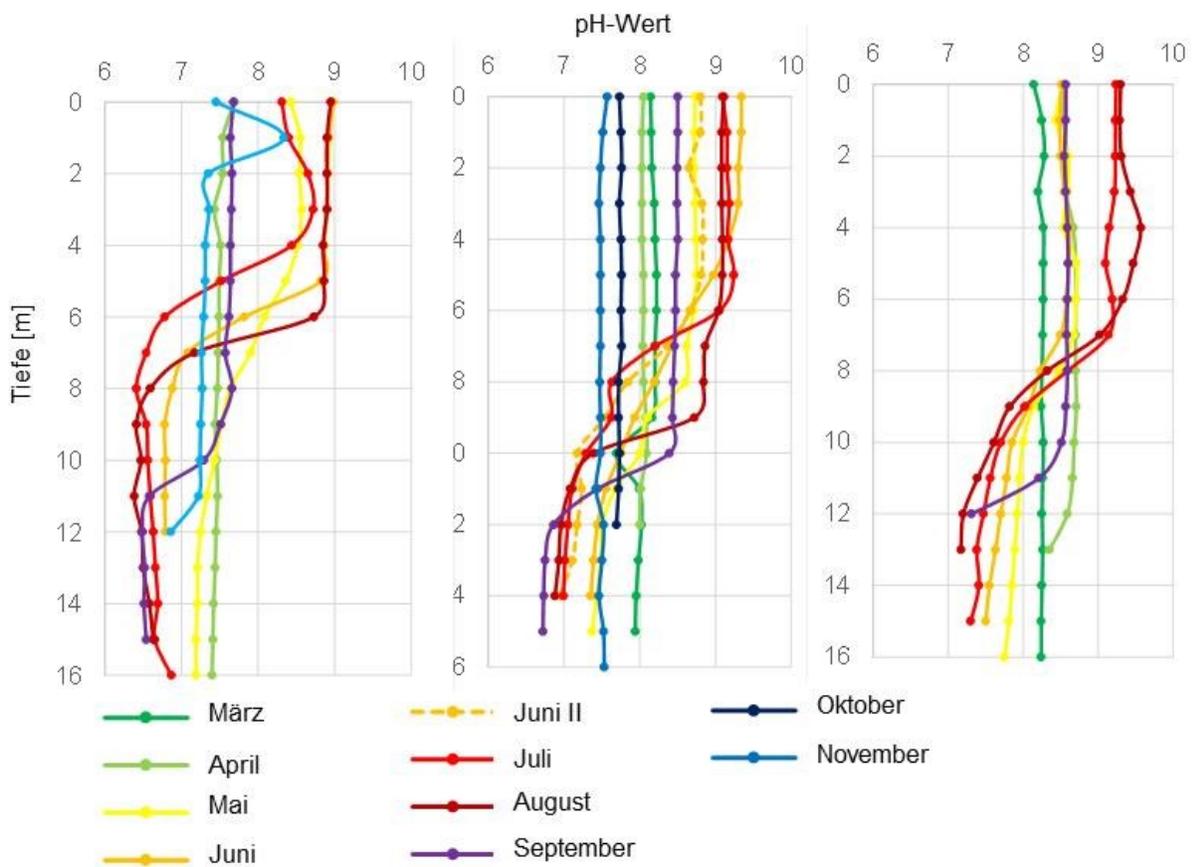
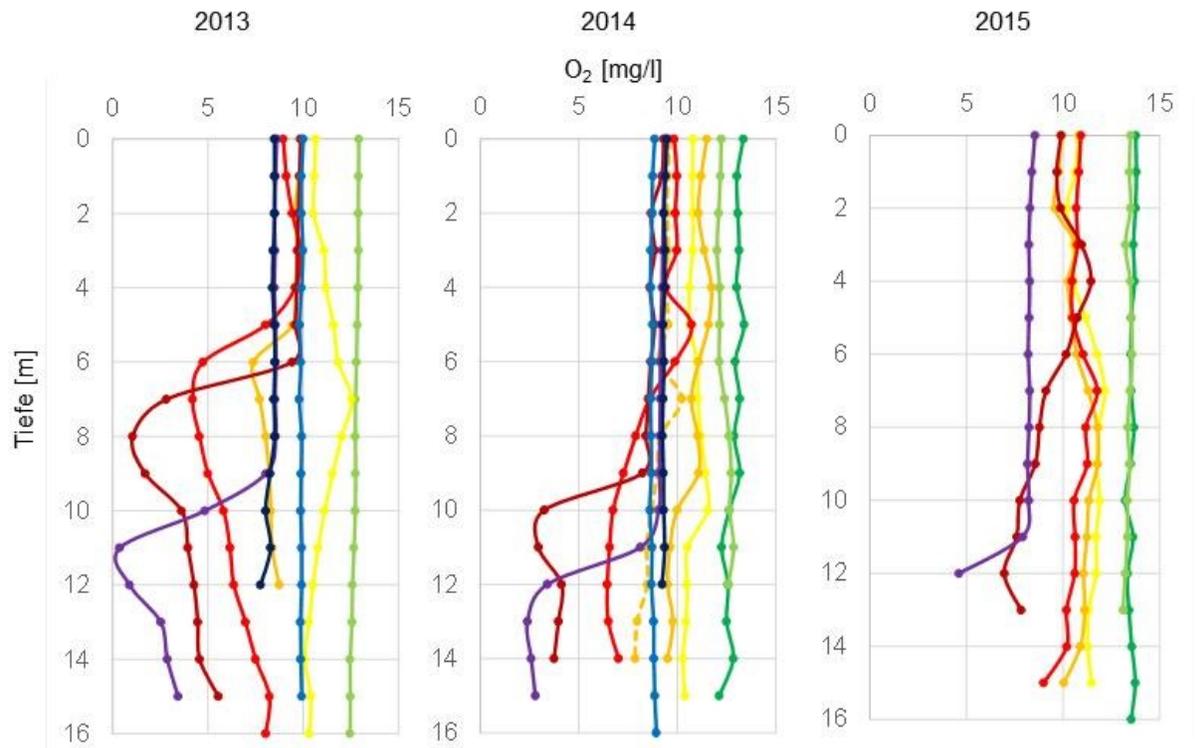
VI Anlagen

A 1: Hydrophysikalische Parameter



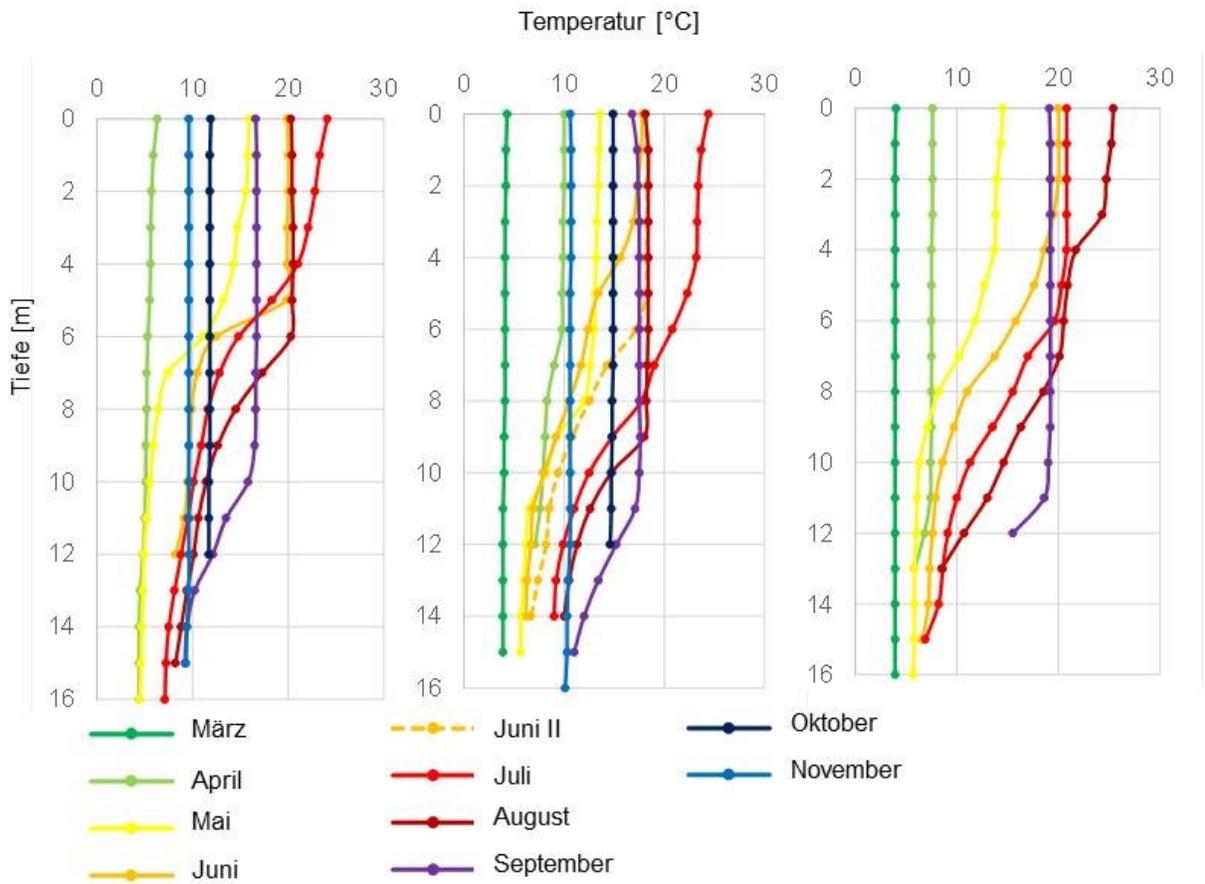
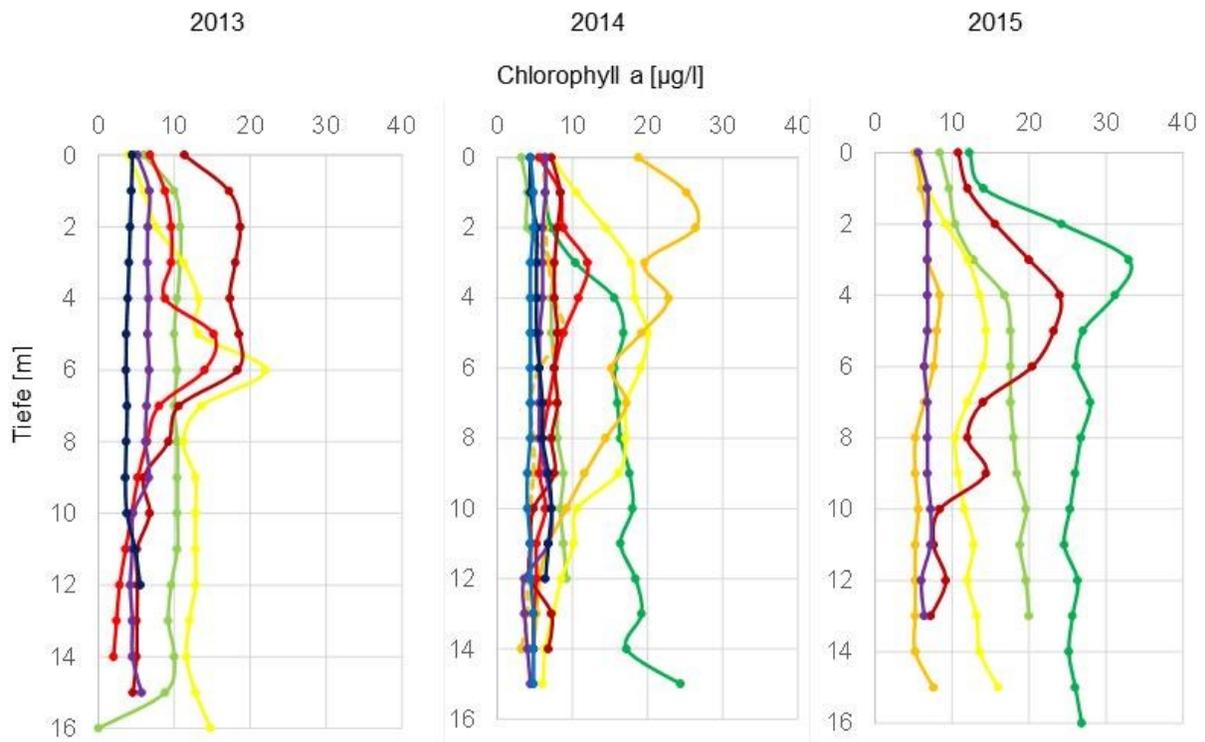


Haselbach S

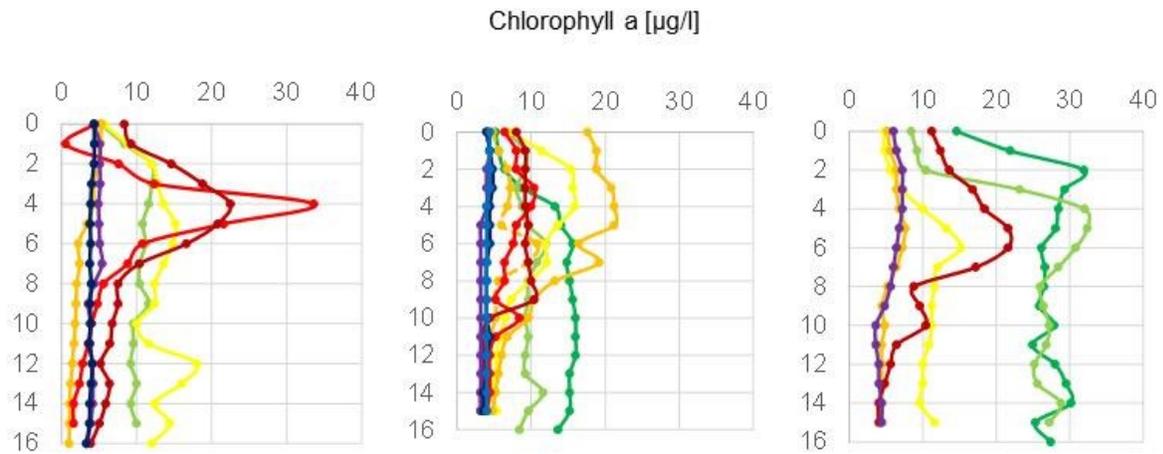
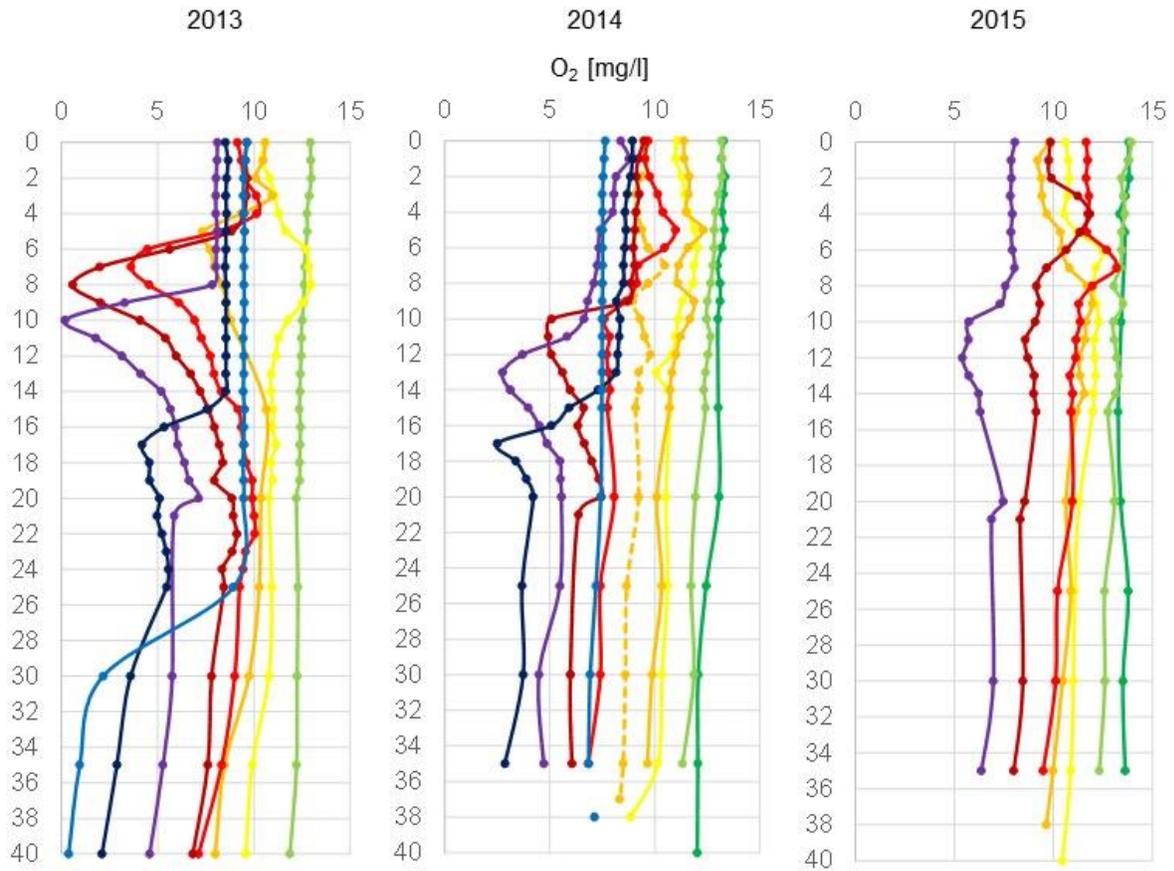


- März
- - -●- - - Juni II
- Oktober
- April
- Juli
- November
- Mai
- August
- September
- Juni

Haselbach S

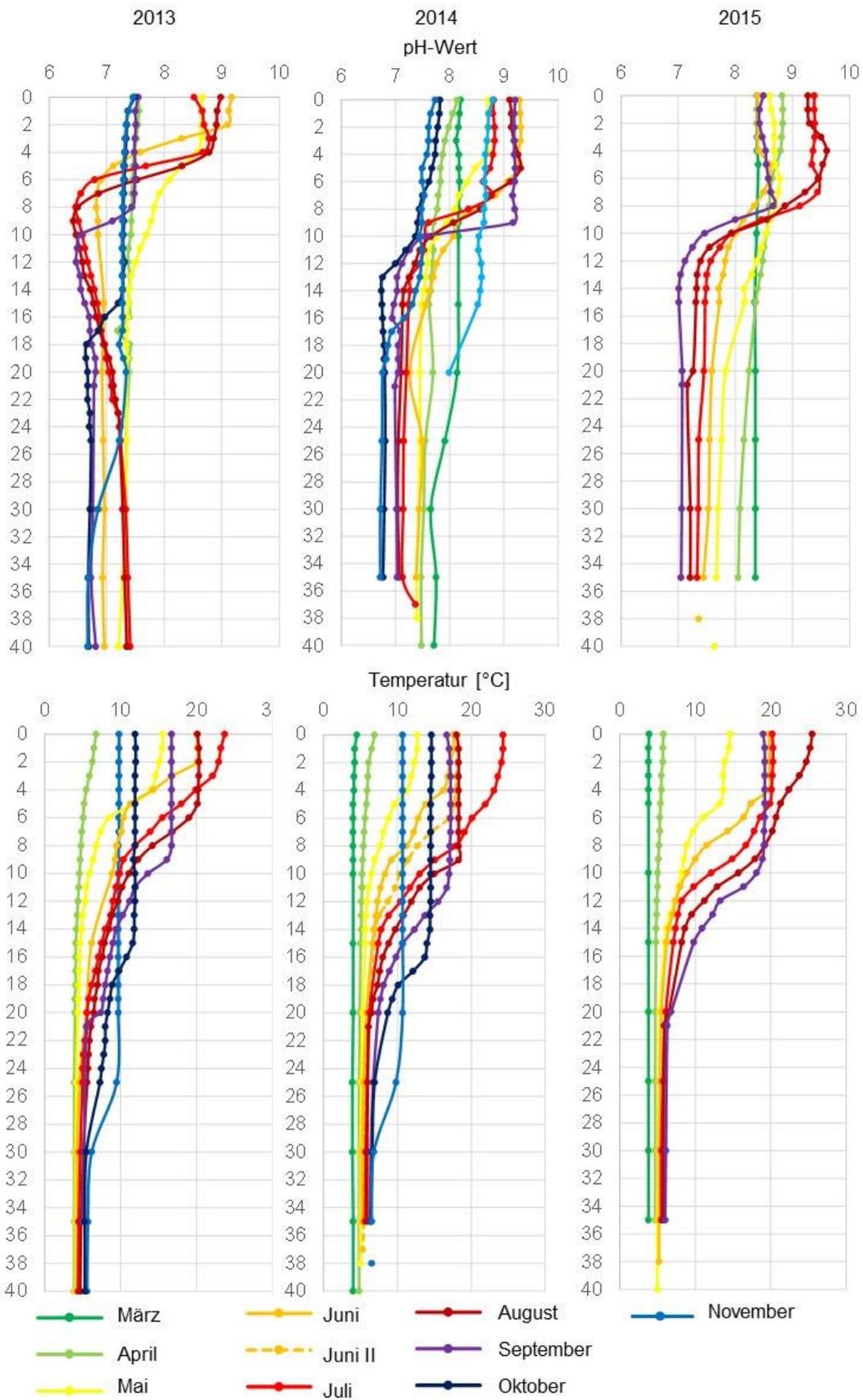


Entnahmestelle

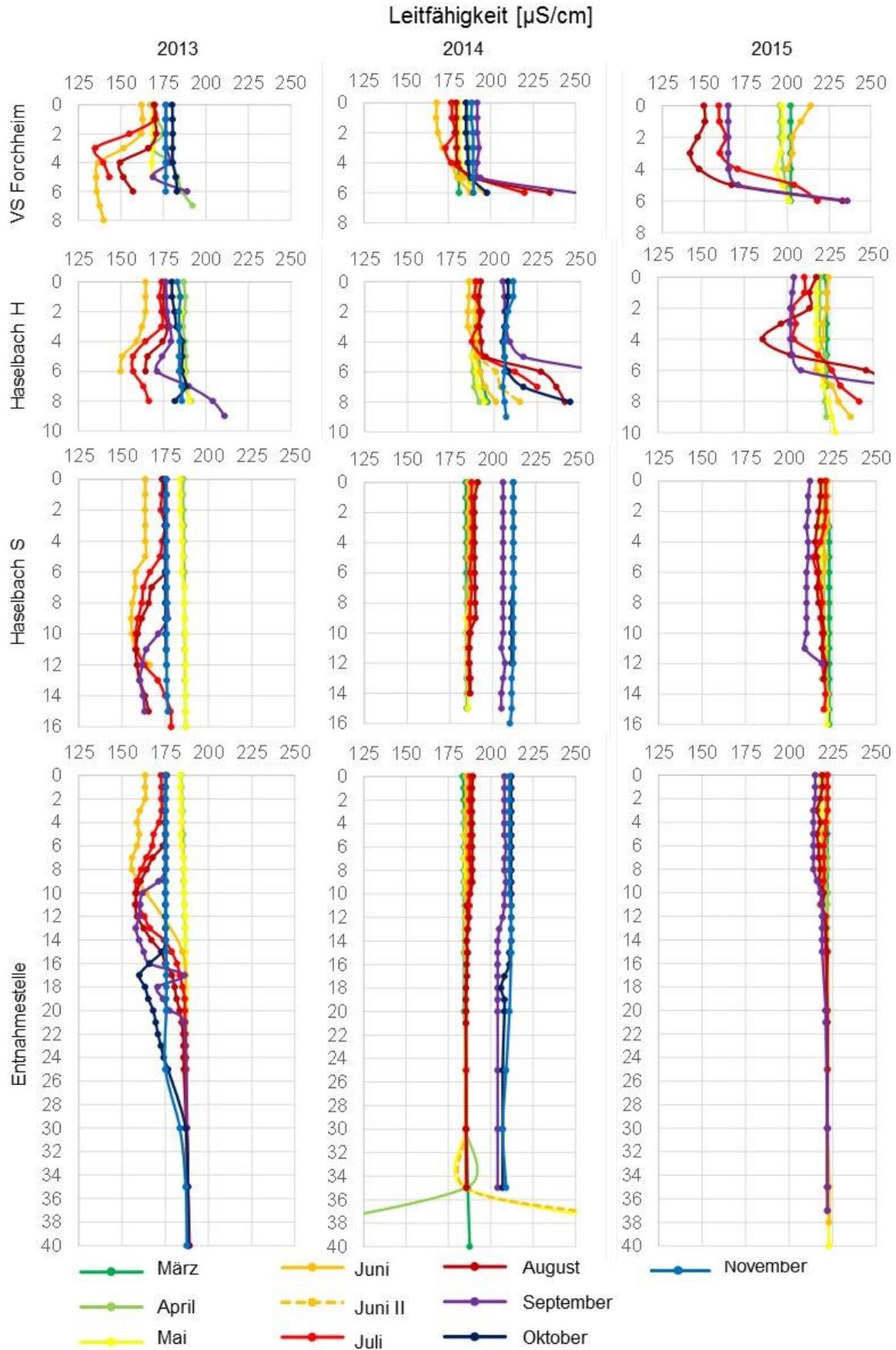


- März
 - April
 - Mai
 - Juni
- - -●- - - Juni II
 - Juli
 - August
 - September
- Oktober
 - November

Entnahmestelle



VI Anlagen



A2: Chemische Parameter

Stelle, Tiefe	Datum	NH ₄ -N	O-PO ₄ - P	C ⁻	SO ₄ -S	NO ₃ -N	Acetat	Mn- AAS	Fe- AAS	DIC	DOC	DTC
		[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
F 2m	22.04.2013	0.58	0.011	14.39	13	5.6	0.53	0	0.07	6.39	7.81	14.19
	21.05.2013	0.27	0.001	15.1	14.14	4.81	0.54	0	0.07	1.97	2.19	4.16
	25.06.2013	0.11	0.001	10.84	10.02	2.52	0.52	0.03	0.12	4.45	5.83	10.28
	23.07.2013	0.11	0.004	12.57	10.43	2.46	0.52	0.03	0.12	2.38	3.92	6.3
	20.08.2013	0.13	0.003	11.5	10.32	1.91	0.54	0.05	0.15	4.97	8.12	13.09
	17.09.2013	0.12	0.003	11.74	10.85	1.78	0.61	0.02	0.09	5.91	5.31	11.21
	15.10.2013	0.1	0.001	14.63	12.83	3.14	0.53	0.01	0.15	6.51	7.15	13.65
	12.11.2013	0.17	0.007	12.06	11.45	2.93	0.73	0.02	0.2	5.64	5.07	10.71
	10.03.2014	0.12	0.001	17.29	18.98	5.34	0.67	0.01	0.03	4.68	4.63	9.31
	14.04.2014	0.13	0.003	16.26	15.64	3.75	0.61	0.00	0.06	5.04	4.55	9.58
	12.05.2014	0.08	0.000	13.35	15.39	3.29	0.52	0.37	0.00	5.31	6.03	11.34
	03.06.2014	0.13	0.005	14.11	13.40	3.07	0.00	0.00	0.07	5.46	5.94	11.40
	30.06.2014	0.18	0.004	15.04	14.56	2.82	0.51	0.00	0.05	6.20	5.88	12.08
	28.07.2014	0.09	0.004	13.02	13.64	2.29	0.50	0.01	0.07	5.73	6.07	11.81
	26.08.2014	0.25	0.001	15.50	14.03	1.90	0.46	0.00	0.04	7.23	5.14	12.38
	22.09.2014	0.15	0.003	12.90	13.49	3.33	0.46	0.00	0.09	5.64	5.22	10.86
	20.10.2014	0.11	0.003	11.31	13.30	3.54	0.46	0.00	0.09	4.90	3.77	8.67
	17.11.2014	0.12	0.004	13.47	15.97	4.86	0.51	0.03	0.11	5.31	3.84	9.15
	16.03.2015	0.13	0.003	18.23	13.61	5.17	0.61	0.00	0.00	6.02	7.60	13.63
	13.04.2015	0.10	0.003	16.02	12.32	4.65	0.00	0.02	0.14	4.39	5.46	9.85
11.05.2015	0.20	0.005	14.59	12.20	3.67	0.00	0.02	0.02	4.50	5.96	10.47	
08.06.2015	0.13	0.001	17.22	16.19	4.26	0.50	0.02	0.06	5.77	4.45	10.22	
13.07.2015	0.08	0.003	9.15	10.25	2.08	0.00	0.01	0.10	4.84	5.46	10.30	
10.08.2015	0.17	0.001	9.18	10.39	1.63	0.62	0.02	0.04	4.53	8.06	12.59	
07.09.2015	0.17	0.001	11.05	11.56	1.68	0.00	0.00	0.01	6.05	5.47	11.52	
H 2m	22.04.2013	0.17	0.014	17.76	11.9	5.49	0.64	0	0.12	6.02	7.74	13.76
	21.05.2013	0.08	0.001	19.78	14.72	5.29	0.57	0	0.05	1.8	2.35	4.15
	25.06.2013	0.09	0.001	13.21	9.48	2.25	0.5	0.01	0.04	4.29	5.08	9.37
	23.07.2013	0.08	0.003	13.55	9.99	2.31	0.55	0.05	0.16	2.01	2.85	4.86
	20.08.2013	0.12	0.006	14.25	9.98	2.11	0.52	0.01	0.05	4.63	6.63	11.27
	17.09.2013	0.18	0.005	14.29	10.08	1.99	0.57	0.01	0.03	5.38	7.36	12.74
	15.10.2013	0.11	0.003	14.6	10.61	2.56	0.55	0.04	0.23	6.38	5.35	11.72
	12.11.2013	0.12	0.004	14.62	11.06	2.72	0.46	0	0.11	6.06	5.13	11.18
	10.03.2014	0.11	0.001	22.04	18.52	4.83	0.45	0.01	0.02	5.52	4.75	10.27
	14.04.2014	0.09	0.001	18.71	14.41	3.44	0.56	0.00	0.04	5.55	4.68	10.23
	12.05.2014	0.11	0.000	16.90	14.61	3.36	0.56	0.12	0.00	5.51	5.71	11.22
	03.06.2014	0.17	0.003	18.19	13.94	2.90	0.44	0.00	0.04	5.25	6.32	11.57
	30.06.2014	0.09	0.001	18.26	14.27	2.68	0.49	0.00	0.02	6.26	5.25	11.51
	28.07.2014	0.13	0.004	17.59	13.90	2.40	0.52	0.00	0.06	6.52	7.75	14.26
	26.08.2014	0.14	0.003	19.22	14.14	1.97	0.00	0.00	0.02	7.29	5.82	13.11
	22.09.2014	0.17	0.001	14.97	13.45	2.39	0.49	0.02	0.04	6.48	4.38	10.86
	20.10.2014	0.14	0.001	15.53	13.99	3.16	0.48	0.00	0.05	6.24	4.25	10.49
	17.11.2014	0.10	0.065	19.32	16.54	3.80	0.49	0.00	0.01	6.21	4.26	10.47
	16.03.2015	0.11	0.003	22.49	14.38	4.46	0.57	0.00	0.05	6.59	6.23	12.81
	13.04.2015	0.12	0.001	20.45	13.06	4.19	0.00	0.02	0.05	4.99	5.89	10.89
11.05.2015	0.13	0.003	18.31	12.34	3.35	0.00	0.02	0.06	5.34	5.91	11.25	
08.06.2015	0.12	0.001	22.69	16.14	4.11	0.00	0.02	0.00	6.16	4.73	10.89	
13.07.2015	0.07	0.001	15.01	11.55	2.37	0.00	0.00	0.06	5.64	5.29	10.93	
10.08.2015	0.14	0.003	17.55	12.72	2.43	0.00	0.04	0.11	5.53	7.36	12.89	
07.09.2015	0.16	0.000	17.95	13.15	2.17	0.00	0.00	0.03	6.82	5.37	12.19	

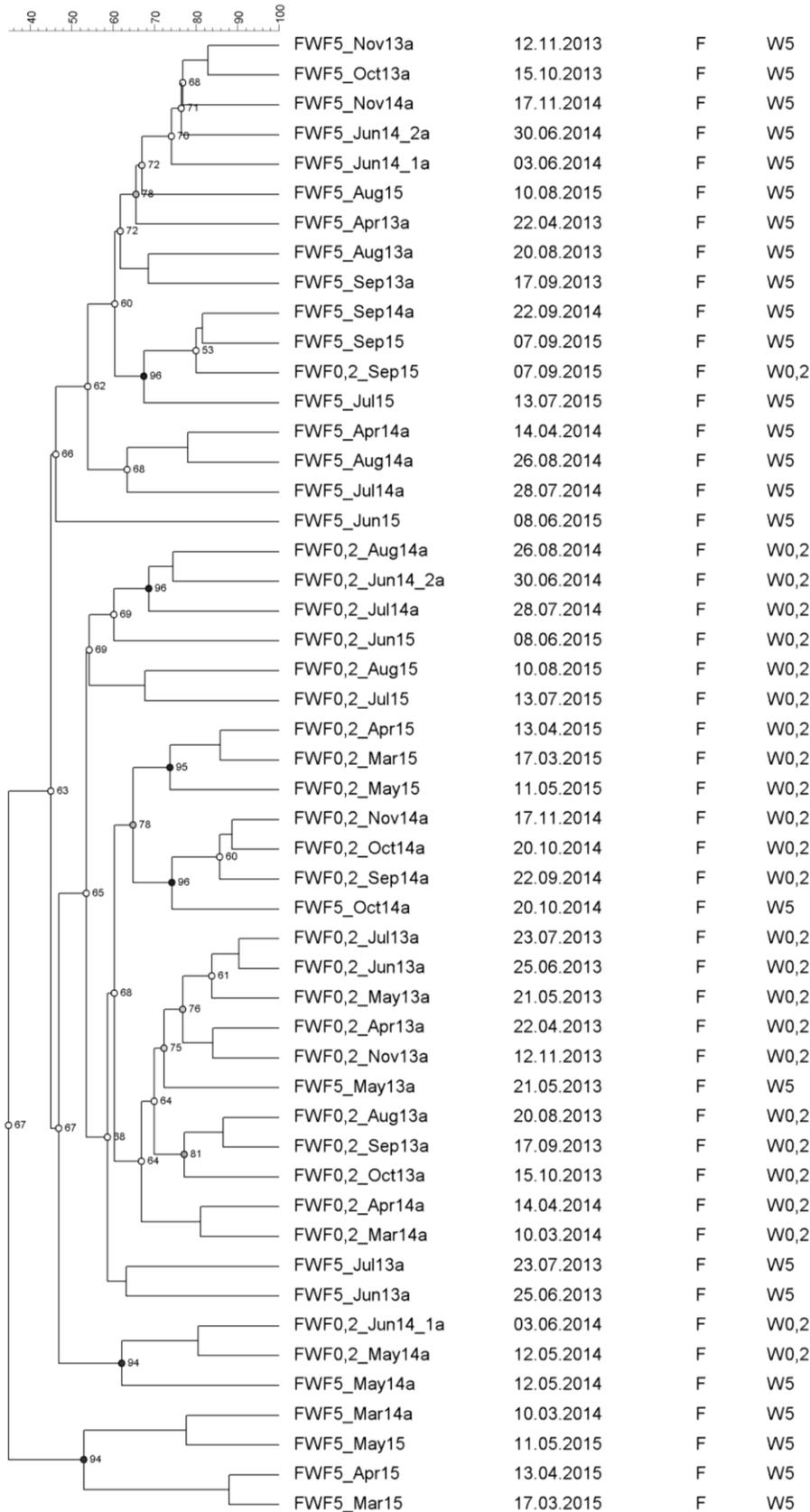
VI Anlagen

Stelle, Tiefe	Datum	NH ₄ -N	o-PO ₄ - P	C ^{l-}	SO ₄ -S	NO ₃ -N	Acetat	Mn- AAS	Fe- AAS	DIC	DOC	DTC
		[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
S 2m	22.04.2013	0.17	0.016	17.17	11.75	5.45	0.56	0	0.05	5.12	7.21	12.33
	21.05.2013	0.08	0.001	19.27	8.83	5.38	0.57	0	0.03	1.77	2.01	3.78
	25.06.2013	0.11	0.001	13.23	9.38	2.23	0.53	0	0.04	4.06	5.35	9.4
	23.07.2013	0.1	0.003	14.91	9.8	2.29	0	0.02	0.06	1.36	3.43	4.78
	20.08.2013	0.19	0.005	14.01	9.85	2.09	0.54	0	0.01	4.87	7.17	12.04
	17.09.2013	0.1	0.003	13.99	10.12	2.04	0.59	0.04	0.19	5.06	6.01	11.07
	15.10.2013	0.09	0.001	14.11	10.24	2.66	0.55	0.01	0.08	5.63	4.8	10.43
	12.11.2013	0.08	0.001	14.38	10.36	2.66	0	0.01	0.03	5.55	4.69	10.24
	10.03.2014	0.09	0.000	22.17	18.45	4.74	0.00	0.01	0.00	5.49	4.73	10.21
	14.04.2014	0.11	0.001	18.69	14.13	3.44	0.96	0.00	0.01	5.38	4.74	10.12
	12.05.2014	0.07	0.000	16.83	14.46	3.45	0.54	0.33	0.00	3.98	5.10	9.08
	03.06.2014	0.12	0.001	18.72	14.05	3.00	0.00	0.00	0.01	5.06	5.49	10.54
	30.06.2014	0.12	0.003	18.70	14.24	2.82	0.00	0.00	0.03	5.46	4.39	9.85
	28.07.2014	0.10	0.003	17.18	14.12	2.75	0.51	0.00	0.00	5.71	6.10	11.82
	26.08.2014	0.11	0.004	18.94	14.04	2.36	0.00	0.00	0.00	6.25	5.22	11.46
	22.09.2014	0.11	0.001	16.72	14.20	2.48	0.00	0.00	0.00	6.25	4.46	10.71
	20.10.2014	0.15	0.002	18.30	14.26	2.70	0.00	0.00	0.00	6.30	4.57	10.88
	17.11.2014	0.10	0.003	20.42	16.85	3.51	0.54	0.00	0.10	6.55	4.36	10.91
	16.03.2015	0.09	0.001	22.88	14.68	3.93	0.55	0.01	0.04	6.64	5.70	12.34
	13.04.2015	0.11	0.003	20.73	13.46	3.86	0.00	0.02	0.03	5.71	5.45	11.17
11.05.2015	0.14	0.000	18.19	12.37	3.35	0.00	0.01	0.06	5.88	5.13	11.01	
08.06.2015	0.12	0.001	23.39	16.39	4.22	0.00	0.02	0.05	6.27	4.96	11.23	
13.07.2015	0.07	0.001	18.26	12.19	2.76	0.00	0.00	0.07	5.21	5.36	10.56	
10.08.2015	0.11	0.001	17.42	12.86	2.52	0.00	0.01	0.09	5.88	6.05	11.93	
07.09.2015	0.12	0.001	19.44	13.85	2.61	0.00	0.00	0.01	6.39	5.24	11.63	
E 2m	22.04.2013	0.20	0.006	17.72	12.43	5.12	0.59	0	0.1	5.04	8.9	13.93
	21.05.2013	0.09	0.002	18.3	14	5.53	0.49	0	0.03	1.72	1.72	3.44
	25.06.2013	0.12	0.002	13.39	9.39	2.3	0.48	0.01	0.17	4.6	5.94	10.54
	23.07.2013	0.09	0.001	14.67	10.08	2.36	0.47	0	0.02	1.52	3.34	4.86
	20.08.2013	0.12	0.001	15.2	9.9	2.13	0.48	0.05	0.14	3.82	5.74	9.56
	17.09.2013	0.12	0.003	14.49	9.95	2.07	0.47	0.04	0.13	5.61	6.08	11.69
	15.10.2013	0.10	0	14.85	10.4	2.68	0.52	0.03	0.18	5.98	4.88	10.86
	12.11.2013	0.09	0.005	14.65	10.15	2.64	0.71	0.05	0.12	5.76	4.89	10.65
	10.03.2014	0.10	0.001	17.76	14.96	3.81	0.63	0.03	0.09	5.76	4.62	10.39
	14.04.2014	0.11	0.005	20.91	13.90	3.42	0.56	0.02	0.13	5.42	5.19	10.61
	12.05.2014	0.08	0.001	16.82	14.31	3.53	0.55	0.01	0.00	6.10	5.30	11.39
	03.06.2014	0.08	0.000	18.04	13.87	2.96	0.49	0.00	0.02	5.21	4.58	9.79
	30.06.2014	0.11	0.003	18.58	14.05	2.81	0.70	0.00	0.03	6.56	6.14	12.70
	28.07.2014	0.07	0.001	15.38	12.72	2.50	0.54	0.00	0.12	5.71	5.70	11.41
	26.08.2014	0.09	0.002	19.27	14.23	2.47	0.00	0.00	0.01	6.08	4.97	11.05
	22.09.2014	0.10	0.001	16.59	14.26	2.52	0.45	0.00	0.00	6.01	3.98	9.99
	20.10.2014	0.10	0.000	16.59	14.13	2.72	0.00	0.00	0.01	6.60	3.69	10.29
	17.11.2014	0.09	0.003	17.76	14.95	3.20	0.48	0.00	0.00	7.10	3.96	11.06
	16.03.2015	0.10	0.001	19.07	12.62	3.29	0.53	0.03	0.18	6.34	4.70	11.04
	13.04.2015	0.10	0.001	19.28	12.48	3.35	0.00	0.02	0.16	5.90	5.49	11.38
11.05.2015	0.11	0.001	18.45	12.20	3.30	0.00	0.01	0.02	5.10	5.21	10.31	
08.06.2015	0.14	0.003	20.59	14.53	3.69	0.00	0.02	0.08	6.18	4.52	10.70	
13.07.2015	0.06	0.000	18.28	12.15	2.82	0.00	0.01	0.13	4.28	4.89	9.18	
10.08.2015	0.12	0.001	17.98	12.92	2.59	0.54	0.00	0.00	6.01	6.44	12.45	
07.09.2015	0.15	0.001	18.71	13.33	2.67	0.00	0.00	0.00	6.44	5.01	11.45	

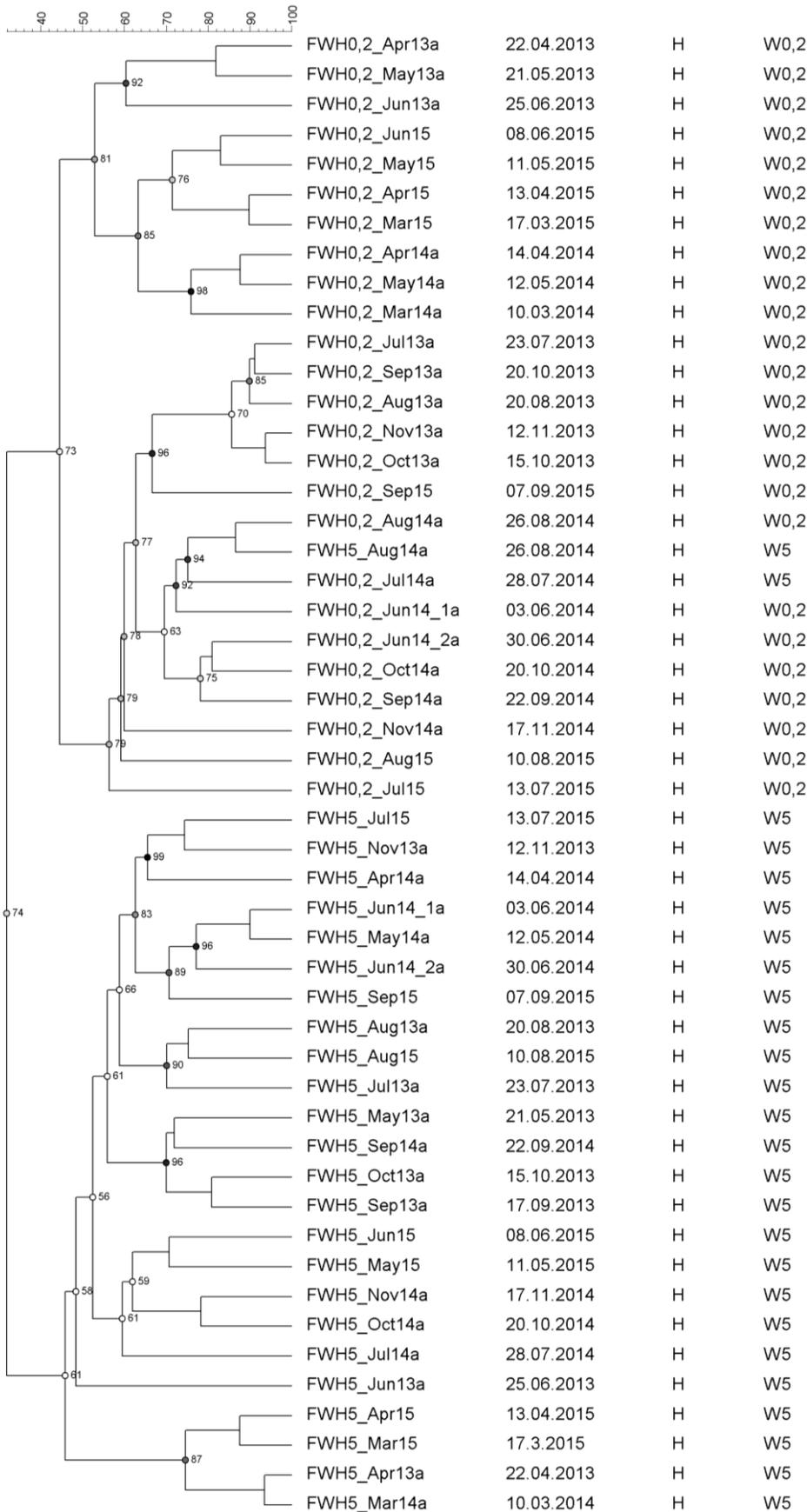
VI Anlagen

Stelle, Tiefe	Datum	NH ₄ -N	o-PO ₄ - P	C ⁻	SO ₄ -S	NO ₃ -N	Acetat	Mn- AAS	Fe- AAS	DIC	DOC	DTC
		[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
E, Meta- limnion	12.05.2014	0.09	0.000	16.60	14.22	3.48	0.52	0.06	0.01	7.21	5.81	13.02
	03.06.2014	0.09	0.001	17.59	13.65	3.17	0.43	0.00	0.02	5.52	3.64	9.16
	30.06.2014	0.11	0.004	19.04	14.25	2.86	0.46	0.00	0.02	6.09	4.89	10.98
	28.07.2014	0.10	0.002	14.88	12.19	2.60	0.55	0.03	0.41	5.86	5.62	11.48
	26.08.2014	0.09	0.000	19.19	14.33	2.49	0.43	0.00	0.14	6.73	4.38	11.11
	22.09.2014	0.15	0.004	17.99	14.35	3.09	0.48	0.00	0.00	6.56	4.65	11.20
	20.10.2014	0.09	0.005	16.90	14.88	6.09	0.00	0.00	0.00	6.08	3.18	9.26
	11.05.2015	0.07	0.000	18.12	12.18	3.30	0.00	0.02	0.02	5.32	4.50	9.82
	08.06.2015	0.10	0.001	19.08	13.68	3.65	0.00	0.02	0.04	6.20	4.25	10.44
	13.07.2015	0.09	0.001	18.20	11.84	2.95	0.00	0.02	0.17	5.49	4.56	10.05
10.08.2015	0.16	0.003	18.38	12.75	2.91	0.61	0.03	0.15	6.85	6.33	13.18	
07.09.2015	0.22	0.003	19.33	12.87	3.04	0.00	0.00	0.01	6.70	5.63	12.33	
E 20m	13.07.2015	0.08	0.007	17.67	11.61	3.10	0.00	0.00	0.11	6.14	5.17	11.31
	10.08.2015	0.11	0.004	17.90	12.64	2.93	0.61	0.01	0.00	6.15	5.57	11.71
	07.09.2015	0.08	0.001	19.27	13.29	3.17	0.00	0.00	0.03	6.52	3.74	10.26

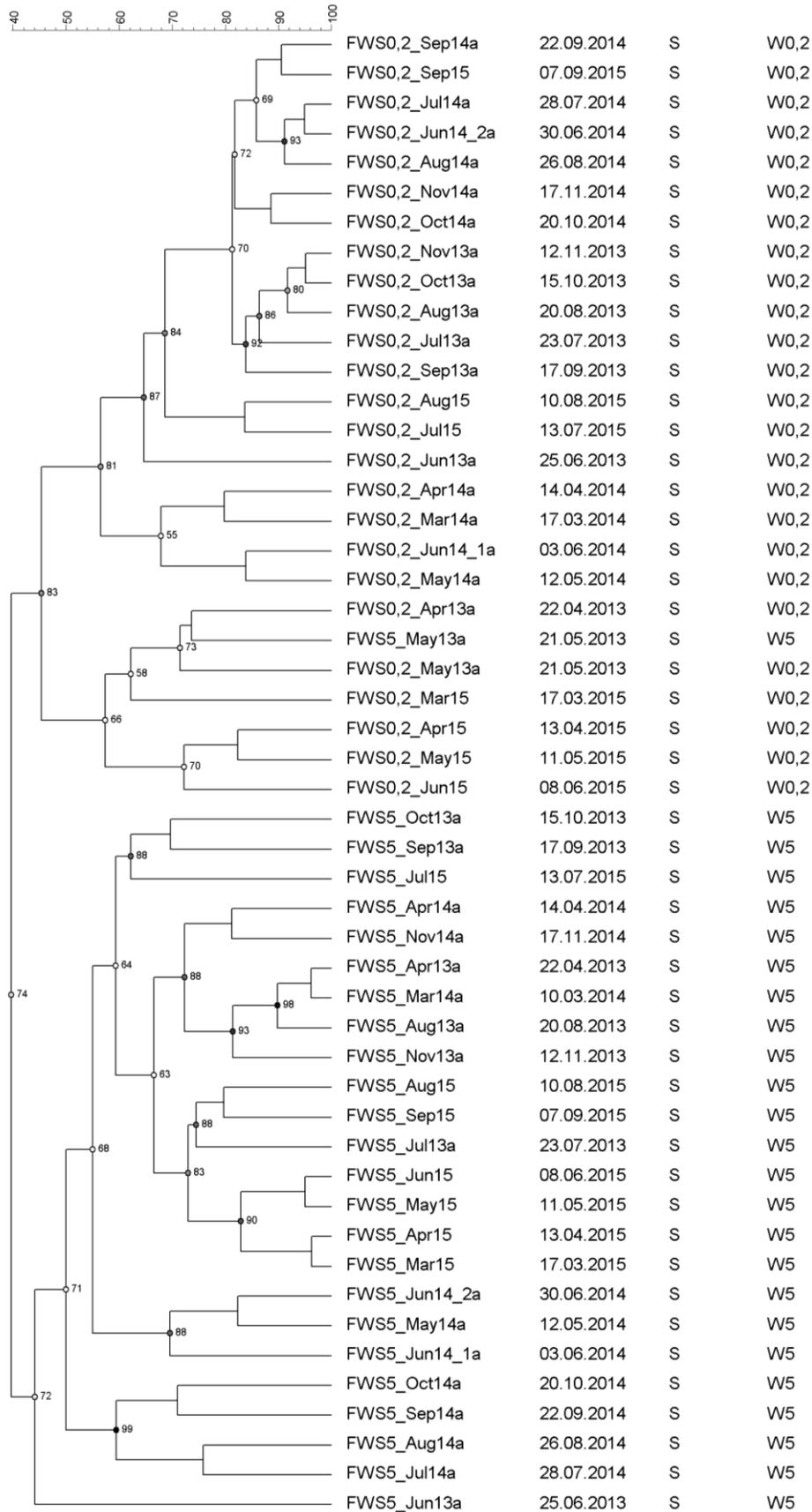
A3: Cluster DGGE-Profil der Stellen F, H, S



VI Anlagen



VI Anlagen



Dank

Dank

Zum Gelingen dieser Arbeit haben zahlreiche Personen beigetragen, denen ich für ihre Unterstützung danken möchte:

Frau Professor Röske möchte ich herzlich für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Unterstützung meines Promotionsvorhabens danken. Ihr und Herrn Prof. Szewzyk danke ich für die Übernahme der Gutachten.

Frau Dr. Kerstin Röske möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die freundliche Zusammenarbeit danken. Ihre zahlreichen Ideen und fachlichen Hinweise haben wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen, ebenso wie die Zusammenarbeit bei Veröffentlichungen sowie die Korrektur der schriftlichen Fassung der Arbeit.

Prof. Dr. med. Enno Jacobs ermöglichte es, die Laborarbeiten in seinem Institut durchzuführen. Ihm und allen Institutsmitarbeitern danke ich für die stets freundliche Zusammenarbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Kolleginnen in der AG Umweltmikrobiologie Jule, Carola, Janine und Olena für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die angenehme Zusammenarbeit im Labor sowie vielerlei fachliche Diskussionen. Carola Scheerer danke ich insbesondere für die Durchführung und mikroskopische Auswertung der CARD-FISH-Analysen und die Gesamtzellzahlbestimmung.

Frau Dr. Heidemarie Horn danke ich für die Einführung in die mikroskopische Phytoplanktonanalyse und viele weitere fachliche Hinweise sowie für die von ihr und Anett Börner durchgeführten Zählungen.

Heiko Herrling gilt mein Dank für die Übernahme der chemischen Analysen. Ihm und Frank Ludwig gebührt darüber hinaus ein großes Dankeschön für die tatkräftige Unterstützung während der Probenahmen! Für die freundliche organisatorische Unterstützung der Probenahmen möchte ich den Mitarbeitern der Staumeisterei Saidenbach (Landestalsperrenverwaltung Sachsen) danken.

Gerit Orzechowski danke ich für seine Unterstützung bei den Messungen am Durchflussszytometer sowie vielerlei Hinweise und fachliche Diskussion zur Methode.

Dr. Lothar Paul stellte ergänzende hydrophysikalische Daten für diese Arbeit bereit und trug in vielen fachlichen Diskussionen limnologisches Hintergrundwissen und Erfahrungen bei.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihren Rückhalt und die Unterstützung während des Studiums und des gesamten Promotionsvorhabens.