

**Material for the 1st meeting
of the SCIENTIFIC ADVISORY BOARD
of the INSTITUTE FOR LIMNOLOGY
of the AUSTRIAN ACADEMY OF SCIENCE**

Mondsee, 23-24 October 2008

Director of the Institute:

Prof. Dr. Thomas WEISSE

ADDRESS during the current reconstruction of the main building

Laboratories: TechnoZ Mondsee, Technoparkstraße 4, 5310 Mondsee

Offices: Gewerbepark, Herzog Odilostraße 101, 5310 Mondsee

Table of contents

1. Preface
2. Annual Report 2007
3. Jahresbericht 2006 (in German with English summary)
4. Jahresbericht 2005 (in German with English summary)
5. Mid-Term Research Programme 2006-2010
6. Mid-Term Research Programme 2001-2005
7. Peer-reviewed publications 2006-2008
8. Supplementary material to the Annual Reports
 - 8.1 Key note presentations at international meetings 2006-2008
 - 8.2 Editors and Editorial Board Members 2006-2008
 - 8.3 Portraits of the Working Groups
 - 8.4 Collected Reprints

Note: Click on a [chapter](#) to proceed directly to the respective section

1. Preface

The present CD-ROM summarizes the most relevant information with respect to the first meeting of the Scientific Advisory Board of the Institute for Limnology of the Austrian Academy of Science in October 2008. Following this preface, you will find the Annual Report 2007 with the budget breakdown and details on the personnel and extramural funding in its annex. Since the latter contains confidential information, this report is not identical with the shortened version that is freely available in the Internet. The annual reports 2006 and 2005 were written in German with an English summary. The current Mid-Term Research Programme and the previous one follow in chapters 5 and 6. More information on our recent research, including annual reports dating back to the year 1999, can be downloaded from the Institute's web site (visit <http://www.oeaw.ac.at/limno/research.htm>). Chapter 7 summarizes the peer-reviewed publications of the years 2006-2008, including several papers in press. The last chapter of this CD presents supplementary material that cannot be easily deduced from the annual reports. The portraits of the working groups consider only the current research; results of previous working groups that were finished with the retirement of the responsible scientist (e.g. Dan Danielopol, head of the groundwater ecology and evolution group until the end of 2007) can be found in the annual reports.

The Institute for Limnology underwent a transition from a more traditional research institution, dealing with system's oriented, holistic freshwater research, towards a more focused, process-oriented research laboratory in recent years. We have increasingly used aquatic organisms to address fundamental ecological and evolutionary issues. This shift in our research priorities is reflected by the list of publications (Ch. 7). In the list of authors, we differentiated between the (on average) 10 staff scientists and their associates and graduate students. Seven papers were published in the limnological core journals 'Limnology and Oceanography', 'Journal of Paleolimnology' and 'Freshwater Biology' (ranked number 1, 3 and 6 in their respective categories according to the THOMSON *Journal Citation Reports*[®] 2007) over the past three years. The median impact factor (IF) of the limnological journals was 1.1 in 2007; the top ranked limnological journal, Limnology and Oceanography, is the only one in this category with an IF >3. Journals of fisheries biology/ecology typically have lower impact factors; several microbiological journals have higher ones. To a large extent, this difference reflects the different size of the scientific community in the various fields and the effort that is necessary to 'produce' a publication in a prestigious journal. Microbial ecology takes benefit from the short generation time and the relative ease of the experimental manipulation of aquatic microbes; 11 papers were published by staff scientists in 'Environmental Microbiology' and 'Applied and Environmental Microbiology' (both with IF >4) during 2006-2008. Results with general ecological and evolutionary relevance appeared

in the journals 'Molecular Ecology', 'Molecular Biology and Evolution', 'BMC Evolutionary Biology', and 'Global Change Biology'. The IF of these journals ranged from 4.1 (BMC Evol. Biol.) to 6.4 (Mol. Biol. Evol.) in 2007.

More than two thirds of the Institute's research is conducted in internationally peer-reviewed projects, funded by the Austrian Science Fund (FWF) and the EU. Graduate students and/or PostDoc researchers are actively involved in each of the currently 12 extramurally funded projects. Even though these research issues are primarily related to basic research, there is a gradual transition to applied limnology, for instance with respect to the toxin production of cyanobacteria. Several recent national projects were related to the EU Water Framework Directive and issues of water protection and nature conservation. The International Postgraduate Programmes in Limnology (IPGL) play a leading role at the interface between research and education. The IPGL has an excellent national and international reputation regarding the transfer of knowledge to African and Asian (mainly China) countries. Several current and future research projects are based upon the long-term cooperation with former IPGL students.

MISSION STATEMENT

Our mission is to investigate and advance scientific understanding of freshwater ecosystems, and to disseminate this knowledge through scholarly publication and education. As an ecological discipline, limnology is the comprehensive science of the biological properties of inland waters in their physical-chemical environment. We use aquatic model organisms, reaching from bacteria to fish species, to investigate patterns and processes of general ecological and evolutionary relevance. We are especially interested in understanding the proximate and ultimate factors responsible for the distribution, interactions, and specific adaptations of freshwater organisms. Our emphasis is on process oriented basic research, but our research results are also used for consulting and in the search for solutions in the planning, use and protection of inland waters. Our present research provides the basis for the sustainable use and protection of the water quality of our fresh waters. We provide training for national and international graduate students and post-doctoral fellows within various research projects and the International Post-Graduate training course in Limnology. Our current research focuses on investigating the origin and maintenance of diversity of aquatic organisms and communities at various levels, ranging from molecules (genes and proteins) over organisms and populations to communities.

Research focus

Ecophysiology and Evolutionary Ecology of aquatic organisms and communities

Prokaryotic microorganisms

Environmental
Microbiology

Martin Hahn

Physiology & Molecular
Ecology of cyanobacteria

Rainer Kurmayer

Eukaryotic microorganisms

Diversity and Ecology of
Flagellates and Microalgae

Jens Boenigk

Quantitative Algal Ecology

Martin Dokulil

Microbial Ecology

Thomas Weisse

Multicellular Eukaryotes

Evolution of asexual
aquatic organisms

Dunja Lamatsch

Experimental Evolutionary
Ecology (Rotifers)

Claus-Peter Stelzer

Ecology of
Freshwater Fish

Josef Wanzenböck

River Ecology & Palaeolimnology

Stream Ecology

Maria Leichtfried

Palaeolimnology

Roland Schmidt

2. Annual Report 2007



**AUSTRIAN
ACADEMY OF SCIENCES**

ANNUAL REPORT 2007

INSTITUTE FOR LIMNOLOGY

PERIOD OF REPORT:

1.1.2007- 31.12.2007

HEAD OF THE INSTITUTE:

Prof. Dr. Thomas WEISSE

ADRESS:

MONDSEESTR. 9, 5310 MONDSEE

INHALTSVERZEICHNIS

MISSION STATEMENT	3
1 WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT	4
1.1 Zusammenfassung des wissenschaftlichen Berichts 2007 (deutsch)	4
1.2 Zusammenfassung des wissenschaftlichen Berichts 2007 (englisch).....	6
1.3 Übereinstimmung/Abweichung zum Mittelfristigen Forschungsprogramm 2007- 2011	8
1.4 Aktuelle Fassung des Mittelfristigen Forschungsprogramms 2008-2012	18
1.5 Wissenschaftliche Tätigkeit 2007 und damit verbundene Forschungsergebnisse 19	
2 TABELLARISCHE DARSTELLUNG UND WISSENSCHAFTLICHE KENNZAHLEN	55
3 ERLÄUTERUNGEN ZUR FINANZIERUNG 2007–2013.....	91
3.1 Erläuterungen zum Rechnungsabschluss 2007	91
3.2 Erläuterungen zum Budgetvoranschlag 2008	91
3.3 Erläuterungen zum Budgetantrag 2009-2013	91
4 ANHANG: BUDGETBLÄTTER 2007-2013.....	93

Note: The forms used for writing this report were provided in German. Similarly, the default language of the ÖAW software program AkademIS that generated parts of chapter 1.5 and all Tables of chapter 2 is German. Headings have been translated in most, but not all sections; inserting English text and some figures required extensive formatting. An English version of the original Mittelfristiges Forschungsprogramm (Mid-term Research Programme) 2006-2010 was unavailable; accordingly, the comments made in section 1.3 are also in German. An updated English version of the Mid-term Research Programme has been reported in chapter 1.4.

MISSION STATEMENT

Our mission is to investigate and advance scientific understanding of freshwater ecosystems, and to disseminate this knowledge through scholarly publication and education. As an ecological discipline, limnology is the comprehensive science of the biological properties of inland waters in their physical-chemical environment. We use aquatic model organisms, reaching from bacteria to fish species, to investigate patterns and processes of general ecological and evolutionary relevance. We are especially interested in understanding the proximate and ultimate factors responsible for the distribution, interactions, and specific adaptations of freshwater organisms. Our emphasis is on process oriented basic research, but our research results are also used for consulting and in the search for solutions in the planning, use and protection of inland waters. Our present research provides the basis for the sustainable use and protection of the water quality of our fresh waters. We provide training for national and international graduate students and post-doctoral fellows within various research projects and the International Post-Graduate training course in Limnology. Our current research focuses on investigating the origin and maintenance of diversity of aquatic organisms and communities at various levels, ranging from molecules (genes and proteins) over organisms and populations to communities.

1 WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

1.1 Zusammenfassung des wissenschaftlichen Berichts 2007

Das Institut für Limnologie konnte seine Forschungsarbeiten im Jahre 2007 auf hohem Niveau fortführen, v.a. dank des hohen Anteils an lukrierten Drittmitteln, der im Berichtszeitraum ca. 1 Mio € betrug (s. Kap. 2 und 3). Im Berichtsjahr wurden 2 EU-/ESF-, 9 FWF-Projekte und das Polynucleobacter-Genom-Projekt durchgeführt bzw. beendet. Vier FWF-Projekte wurden 2007 neu bewilligt und begonnen. Sieben der 10 auf Planstellen angestellten Wissenschaftler des Instituts leiteten zumindest ein eigenes, international begutachtetes Forschungsprojekt. Alle dieser Projekte beziehen sich inhaltlich direkt auf den gegenwärtigen Institutsschwerpunkt, d.h. die Untersuchung der Entstehung und des Erhaltes der Diversität aquatischer Organismen und Gemeinschaften. Die langjährige Forschung zur vergleichenden Morphologie und evolutionären Ökologie der Grundwasser-Crustaceen und der Grundwasser-Ökosysteme wurde mit der Pensionierung des verantwortlichen Wissenschaftlers (Dan Danielopol) zum Jahresende abgeschlossen. Diese Wissenschaftler-Stelle wurde mit Dunja Lamatsch nachbesetzt, die molekulare und cytogenetische Untersuchungen zur Evolution und Ökologie von poeciliiden Fischen, Daphnien und Ostracoden durchführen wird. Ihre Untersuchungen werden das Bindeglied zwischen unserer Forschung an Protisten, Evertebraten und in der Fischökologie verstärken.

Höhepunkte unserer Grundlagenforschung im Jahre 2007 waren

- die Characterisierung verschiedener Mutanten des kolonienbildenden Cyanobakteriums *Planktothrix* spp., die >90% des großen, Microcystin-synthetisierenden Gen-Clusters verloren haben
- der Beginn der Auswertung der Genom-Sequenz des freilebenden, heterotrophen Bakteriums *Polynucleobacter* sp.
- die Analyse der Multigen-Phylogenie der häufigen, *Spumella*-ähnlichen Süßwasser- Flagellaten
- die vergleichende Analyse der innerartlichen Variabilität eines Süßwasser-Ciliaten (*Meseres corlissi*) auf den Ebenen der Gene, Ultrastruktur (Morphologie) und Ökophysiologie
- die Entdeckung, dass asexuelle Stämme des Rädertierchens *Brachionus calyciflorus* das chemische Signal für die Einleitung der sexuellen Reproduktion noch aussenden, aber nicht länger auf dieses Signal antworten können
- der Nachweis der genetischen Differenzierung der Coregonen-Larven im Traunsee in Bezug zu ihrem zeitlich-räumlichen Erscheinungsmustern
- der mit Hilfe kalibrierter Algen, Geochemie und Palynologie erfolgte Nachweis römerzeitlicher und mittelalterlicher Wärmeperioden im Alpenraum, mit Temperaturen ähnlich wie heute, gekoppelt mit Intensivierung der Landnutzung und Erhöhung des Potenzials für Erosion und Nährstoffeintrag,

Die Forschungsergebnisse wurden in 24 anonym begutachteten Publikationen und durch >30 mündliche und Poster-Beiträge auf nationalen und internationalen Tagungen veröffentlicht.

Innerhalb der Angewandten Limnologie hat sich das Institut an der internationalen Messkampagne auf der Donau (Joint Danube Survey 2), die von der Internationalen Kommission für den Schutz der Donau veranstaltet wurde, beteiligt. Dabei wurden über 100 Proben genommen, um die wesentlichen Kenngrößen zu messen, die das Flussplankton charakterisieren.

Neun Wissenschaftler veranstalteten Vorlesungen und Praktika an den Universitäten in Salzburg, Wien und Innsbruck. Die Lehr- und Forschungsaktivitäten des Internationalen Post-Graduierten Trainingskurses in Limnologie (IPGL), der seit über 30 Jahren vom Institut koordiniert wird, wurden durch mehrere, von der EU und der Afrikanischen Entwicklungs-Bank finanzierten Projekte verstärkt. Die Verbreitung der wichtigsten Ergebnisse des internationalen, transdisziplinären Workshops, der Ende 2006 in Kenya veranstaltet worden war, wurde fortgesetzt. Die Forschung im Rahmen des internationalen Fisch-Farm-Projektes (BOMOSA) in Ostafrika wurde intensiviert.

Die Planung des für 2008/2009 anstehenden Umbaus des Institutsgebäudes in Mondsee wurde am Jahresende aktualisiert und verstärkt.

1.2 Summary of the Annual Report 2007

The Institute for Limnology could continue its research at a high level in 2007, mainly thanks to a high proportion of extramural funds, which contributed approximately 1 million € to the total budget (see chapters 2 and 3). Two EU/ESF projects, 9 FWF (Austrian Science Fund) projects and the genome project on *Polynucleobacter* were continued or finished during the period of this report. Four FWF projects were approved and started in 2007. Seven of the 10 scientists employed on tenure or tenure-track positions headed at least one internationally peer-reviewed research project. All those projects are directly related to the Institute's research focus, i.e. investigating the origin and maintenance of diversity of aquatic organisms and communities. The long-term research on comparative morphology and evolutionary ecology of groundwater crustacea and groundwater ecosystems has been finished with the retirement of the responsible scientist (Dan Danielopol) at the end of the year 2007. This research position was filled with Dunja Lamatsch, who will perform molecular and cytogenetic analyses on the evolution and ecology of poeciliid fishes, daphnids, ostracods. Her research will strengthen the link between our research on protists, invertebrates and in fisheries ecology.

Highlights of our basic research in 2007 were the

- characterization of various mutants of colonial cyanobacteria (*Planktothrix* spp.) that lost >90% of the large microcystin synthesizing gene cluster
- beginning evaluation of the genome sequencing of a free-living, heterotrophic bacterium (*Polynucleobacter* sp.)
- analysis of the multigene phylogeny of common, *Spumella*-like freshwater flagellates
- comparative analysis of the intraspecific variability of a freshwater ciliate (*Meseres corlissi*) at the level of genes, ultrastructure (morphology) and ecophysiology
- finding that asexual strains of the rotifer *Brachionus calyciflorus* still release the chemical signal for the onset of sexual reproduction, but that they cannot any longer respond to this signal
- demonstration of genetic differentiation of coregonid larvae from Lake Traunsee in relation to their temporal-spatial patterns of occurrence.
- inference of Roman and Medieval warm periods in the Alps, using calibrated algae, geochemistry and palynology: temperatures were close to present, coupled with intense land use and increasing the potential for erosion and nutrient flux

Research results were disseminated by 24 peer-reviewed publications and >30 oral and poster presentations at national and international scientific meetings.

Within the field of Applied Limnology, the Institute participated in the international Joint Danube Survey 2 organized by the International Commission for the Protection of the Danube. More than 100 samples were taken to measure major parameters characterizing the algal river plankton.

Nine scientists held lecture and field courses at the universities in Salzburg, Vienna and Innsbruck. Teaching and research activities of the International Post-Graduate training course in Limnology (IPGL), managed by the Institute for over 30 years, were reinforced by several projects funded by the EU and the African Development Bank. Dissemination of the outcome of the international, transdisciplinary workshop in Kenya, held at the end of

2006, was continued. Research was enhanced within the international, EU funded fish-farming project (BOMOSA) in East Africa.

Planning for the extension of the laboratory building at Mondsee during 2008/2009 was renewed and intensified at the end of the year.

1.3 Übereinstimmung/Abweichung zum Mittelfristigen Forschungsprogramm 2007-2011

1. Hauptzielrichtung des Forschungsprogramms des Instituts für Limnologie

Die Untersuchung der *“Ökophysiologie und Evolutionsökologie aquatischer Organismen und Lebensgemeinschaften“* soll weiterhin die Hauptzielrichtung des Instituts für Limnologie bleiben, wobei es im neuen Mittelfristigen Forschungsprogramm (MFFP) jedoch zu deutlichen inhaltlichen und strukturellen Änderungen kommen soll. Aufbauend auf dem Schwerpunktthema des MFFP 2001-2005 und unter Berücksichtigung der strukturellen Veränderungen infolge des Institutsausbaus und der Nachbesetzung von 4 Wissenschaftlerstellen in den kommenden 3 Jahren streben wir eine Modifizierung des bisherigen Forschungsprogramms im MFFP 2006-2010 an. Im bisherigen Schwerpunktthema, der Untersuchung der *“Entstehung und Erhaltung der Diversität und Komplexität auf der Ebene des Individuums, der Population, der Art und des Ökosystems“*, wurden vor allem zwei wesentliche neue Themenkreise erschlossen: (1) innerhalb der mikrobiellen Ökologie wurde anhand mehrerer Organismengruppen eine bisher unbekannte ausgeprägte intraspezifische Diversität nachgewiesen; (2) die Klima-bezogenen Untersuchungen innerhalb der Algenökologie und der Päläolimnologie belegten die große Bedeutung des Einzugsgebietes sowie die Fernwirkung großklimatischer Ereignisse auf die Seenökosysteme. Im MFFP 2006-2010 wird eine Synthese dieser beiden Themenkreise angestrebt, die eine Ergänzung der limnologischen Forschungsarbeit durch komplementäre terrestrische und evolutionstheoretische Untersuchungen und im Hinblick auf eine zukunftsweisende Ausrichtung des Instituts unter dem veränderten gesellschaftlichen

Anmerkungen/Begründungen bei Änderung des MFP gegenüber der im April 2005 formulierten Fassung

Die erste Nachbesetzung (G. Falkner) erfolgte im Herbst 2006 (C.-P. Stelzer); die Stelle von D. Danielopol wurde mit D. Lamatsch zum 15.1.2008 wieder besetzt. Die Nachbesetzungen der Stellen von M. Dokulil und U. Humpesch stehen zum 1.1.2009 an.

Kontext, der eine deutlichere Wahrnehmung und unmittelbarere Anwendung der Erkenntnisse der Grundlagenforschung erfordert, erscheint eine Namensänderung in "Institut für Aquatische und Evolutionäre Ökologie" sinnvoll. Ein weiteres Ziel der Namensänderung ist die Signalwirkung im Hinblick auf die Erschließung eines neuen, interdisziplinären Themenbereichs.

2. Prioritätenkatalog

Anstelle des bisherigen tritt das modifizierte Schwerpunktthema "*Ausmaß, Entstehung und ökologische Bedeutung der intraspezifischen Diversität aquatischer Mikro- und Makroorganismen*", das von allen Arbeitsrichtungen mit höchster Priorität bearbeitet werden soll. Stärker als bisher sollen hierbei grundsätzliche Unterschiede zwischen pro- und eukaryontischen Organismen untersucht werden. Die Genomforschung der letzten Jahre zeigte, dass Mikroorganismen einer Art sich häufig enorm in ihrer genetischen Ausstattung unterscheiden, während intraspezifische genetische Unterschiede bei höheren Organismen (z. B. bei Wirbeltieren) vergleichsweise gering ausfallen, obwohl auch bei letzteren spezifische Anpassungen an das Habitat ("Ökotypen") bekannt sind. Diese offenbar grundsätzlichen Unterschiede in der intraspezifischen genetischen Diversität zwischen Mikro- und Makroorganismen haben in der ökologischen Forschung bisher wenig Beachtung gefunden. Die ökologische Bedeutung der intraspezifischen genetischen Diversität ("microdiversity") soll in unserem Hause an aquatischen Makroorganismen (z. B. den Coregonen in der Fischökologie) und Mikroorganismen (heterotrophe Bakterien, photoautotrophe Cyanobakterien, Pilze und Protisten) unter Verwendung neuester molekulargenetischer Methoden und unter Einbeziehung

Das neue Arbeitsgebiet 'Evolution und Ökologie asexueller aquatischer Organismen' (Stelzer, Lamatsch) verstärkt diesen Wunsch

s. hierzu das laufende, fischereiökologische FWF-Projekt (Wanzenböck)

des terrestrischen Umfeldes untersucht werden. Letzteres ist vor allem für die frei lebenden Mikroorganismen wichtig, für die gegenwärtig eine prinzipiell globale und ubiquitäre Verbreitung angenommen wird. Die zentrale Herausforderung eines solchen Forschungsprogramms ist die Verknüpfung der charakterisierten intraspezifischen genetischen Diversität mit ökologischen Aspekten, wie sie im MFFP 2001-2005 bezüglich der Frage der Biogeographie von Mikroorganismen innerhalb der mikrobiellen Ökologie bereits erforscht wird. Besitzen Arten mit einer größeren genetischen Diversität ein größeres ökologisches Potenzial, d. h. größere ökologische Reaktionsnormen gegenüber den jeweils wichtigen Umweltparametern, oder wird die ökologische Amplitude nur durch einige wenige Schlüsselgene und nicht über eine Genom-weite genetische Variabilität bestimmt? Bei der Beantwortung dieser zentralen Fragen müssen die unterschiedlichen Zeitskalen von kurzfristigen, reversiblen Akklimatisierungen bis hin zu genetisch fixierten evolutiven Adaptationen der Organismen berücksichtigt werden. Die Paläo(limno)logie bietet hierbei die Möglichkeit, langfristige Veränderungen zu analysieren, die der experimentellen evolutionsökologischen Forschung an rezenten Organismen nicht zugänglich sind.

Das skizzierte Forschungsprogramm ist international themenführend innerhalb der aquatischen Ökologie und verknüpft zudem die Limnologie mit der terrestrischen Ökologie und der theoretischen Evolutionsökologie. Das neue Forschungsprogramm wird dadurch dem bereits im MFFP 2001-2005 formuliertem Anspruch gerecht, die Limnologie als Teilgebiet der Ökologie zu begreifen und Impulse für das übergeordnete Fachgebiet zu geben. Aquatische Organismen und Ökosysteme sollen weiterhin als relativ leicht zugängliche Objekte genutzt werden, um allgemeine ökologische und evolutionsbiologische Frage-

s. hierzu die FWF-Projekte zur Diversität der Bakterien (Hahn), Cyanobakterien (Kurmayer), Chrysoomonaden (Boenigk) und Ciliaten (Weisse)

s. hierzu die laufenden Genom-Projekte zu *Polynucleobacter* und *Planktothrix*

s. die beiden paläolimnologischen FP (Schmidt, Danielopol)

stellungen zu bearbeiten. Obwohl die Forschungsthemen primär der Grundlagenforschung zuzurechnen sind, sind die Übergänge zur Angewandten Limnologie fließend. Dies trifft z. B. auf die Untersuchung der Toxinproduktion bei Cyanobakterien sowie der Ökologie der Grundwasserorganismen zu. Die Grundwasservorräte werden für die Wasserversorgung des Menschen im 21. Jahrhundert zunehmend wichtiger, und die (Mikro-) Organismen bewirken die Stoffumsetzungen einschließlich der Detoxifikation schädlicher Xenobiotika. Dennoch sind die genetische Diversität und die physiologischen Leistungen der (Mikro-)Organismen des Grundwassers nahezu unbekannt. Die Wechselwirkung zwischen Grundlagenforschung und Angewandter Limnologie wird auch bei der Beurteilung der ökologischen Funktionsfähigkeit der Gewässer, die in der EU-Wasserrahmenrichtlinie verbindlich vorgeschrieben ist, deutlich. Das Institut ist gewillt, sich als zweite Priorität die notwendige umfassende Fachkompetenz zu erhalten, um weiterhin beratend für Bundes- und Länderbehörden tätig sein zu können.

In dritter Priorität wird das Institut in der Lehre tätig sein. Der Internationale Postgraduiertenlehrgang Limnologie (IPGL) verkörpert die Schnittstelle zwischen Forschung und Lehre im besonderen Maße. Der IPGL-Kurs genießt national und international als vorbildliches Projekt im Rahmen des Wissenstransfers von den entwickelten in die afrikanischen und asiatischen (China) Schwellenländer einen hervorragenden Ruf. Mehrere aktuelle und zukünftige Forschungsprojekte des Instituts in tropischen und subtropischen Ländern sind aus der fortgesetzten Zusammenarbeit mit ehemaligen IPGL-Kursabsolventen entstanden. Die habilitierten Wissenschaftler(innen) werden weiters an den Universitäten Salzburg, Wien und Innsbruck lehren. Dabei wird jedoch, stärker als an den Universitäten zumeist üblich, die unmittelbare Einbindung der Examenskandidat(inn)en in die Forschungstätigkeit des Instituts angestrebt.

dazu mehrere Projekte der Algenökologie (Dokulil) und Fischökologie (Wanzenböck)

das IPGL-Programm wurde 2005-2007 kontinuierlich ergänzt, um mehrere Module erweitert und stärker auf Aktivitäten direkt in den Zielländern (v.a.in Ostafrika) fokussiert

s. Publikationsliste

3. Änderungen in den Prioritäten im Vergleich zum bisherigen Forschungsprogramm

Die in den ersten beiden Abschnitten ausgeführten Änderungen der Prioritäten ergeben sich aus den neu gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnissen (Modifizierung des Schwerpunktthemas) im Rahmen des veränderten gesellschaftlichen Umfeldes, dem bevorstehenden Ausscheiden mehrerer langjähriger wissenschaftlicher Mitarbeiter (Falkner, Dokulil, Danielopol, Humpesch) sowie der damit verbundenen Möglichkeit, nach erfolgtem Ausbau des Institutsgebäudes neuen Mitarbeitern ein attraktives Forschungsumfeld bieten zu können. Die Gebäudeadaptierungen und die Nachbesetzungen der Wissenschaftlerstellen sollen auf den Schwerpunkt hinzielen und das bisherige Tätigkeitsfeld des Instituts inhaltlich im Hinblick auf eine allgemeinere ökologische und evolutionsbiologische Ausrichtung erweitern. Hiervon werden die Einbringung neuer Ideen und Synergieeffekte mit dem bisherigen Themenbereich erwartet.

4. Kooperationsfähigkeit

Schon im MFFP 2001-2005 waren zahlreiche unserer Drittmittel-finanzierten Forschungsprojekte inter- und transdisziplinär. Dies ist eine grundsätzliche Anforderung an die EU-Projekte, trifft jedoch auch auf die meisten anwendungsorientierten limnologischen Projekte zu. Untersuchungen, die sich mit der Gewässerqualität i. w. S. beschäftigen, müssen stets physikalische, hydrologische, chemische und biologische Aspekte ebenso wie die Frage der unterschiedlichen Nutzungsansprüche (Gewässerqualität wofür?) berücksichtigen. Die Beurteilung der ökologischen Funktionsfähigkeit von Gewässern, ein zentrales Anliegen der EU-Wasserrahmenrichtlinie, erfordert unmittelbar einen interdisziplinären und trans-

Falkner und Humpesch beendeten Ende 2006 ihre Mitarbeit, Danielopol wurde Ende 2007 pensioniert

disziplinären Forschungsansatz. Das Institut hat im Jahr 2004 einen Kooperationsvertrag im Rahmen des sog. Projektes "Water-Tec-Net" unterzeichnet, in dem sich mehrere Betriebe, regionale Entwicklungsvereine und Forschungsinstitute in Oberösterreich zu einer zwischenbetrieblichen Kooperation in Form eines Netzwerkes zusammengeschlossen haben. Die Projektleitung obliegt dem Technologiezentrum Attnang-Puchheim, die heuer auch das Symposium "Innovatives Wassermanagement 2005 im Salzkammergut" unter Beteiligung des Instituts für Limnologie veranstalten wird.

Im Rahmen des IPGL-Kurses wurden in den letzten Jahren Kooperationsvereinbarungen mit niederländischen und tschechischen Partnerinstitutionen getroffen, die eine fachübergreifende Ausbildung der Kursabsolventen zum M.Sc. gewährleisten. Die Aktivitäten des IPGL-Kurses sind eingebettet in zahlreiche internationale Kooperationen, z. B. in Form der "East African - Austria Water Association" (EAAWA) oder im Rahmen der Global Environment Facility. Auf die bilateralen Folgeprojekte in tropischen Ländern, die sich aus IPGL-Kontakten entwickelt haben, wurde bereits oben (Punkt 2) hingewiesen. Alle diese Aktivitäten mit unmittelbarem sozio-ökonomischen Bezug sollen im MFFP 2006-2010 fortgesetzt werden.

Derzeit wird die Einreichung eines Nationalen Forschungsnetzwerkes (NFN) beim FWF zum Themenbereich aquatische Protozoologie unter der Koordination unseres Hauses vorbereitet, das im Genehmigungsfall einen interdisziplinären Schwerpunkt der Forschungsaktivitäten des Institutes im MFFP 2006-2010 bilden wird. Die angestrebte mittelfristige inhaltliche Erweiterung der Forschungstätigkeiten (s. o.) verfolgt das Ziel, die limnologische Forschung stärker als bisher mit den Nachbardisziplinen (terrestrische, chemische und theoretische Ökologie, Geowissenschaften, Umwelttoxikologie) zu verknüpfen.

s. internationaler Workshop in Mombasa im Dezember 2006, EU-Projekt „BOMOSA“, 2006-2009

Die Koordination der österreichweiten Aktivitäten erwies sich schwieriger als erwartet, wird jedoch fortgesetzt

Im Jahresbericht 2004 finden sich nähere Angaben zu den >100 aktuellen nationalen und internationalen Kooperationspartnern des Instituts aus zahlreichen Nachbardisziplinen (<http://www.oeaw.ac.at/limno/research.htm>).

5. Neue Kooperationen

Mit der inhaltlichen Erweiterung werden neue Kooperationsmöglichkeiten, sowohl in der Grundlagenforschung als auch im anwendungsorientierten Forschungsbereich, verbunden sein. Erste Kooperationen mit biomedizinischen und pharmazeutisch-technischen Unternehmen bezüglich der möglichen Nutzung bioaktiver Naturstoffe wurden bereits im laufenden MFFP 2001-2005 begonnen. Die im zukünftigen Forschungsprogramm geplanten Arbeiten werden mit einer Hinwendung zu den jungen Forschungsgebieten der Chemischen Ökologie und der Ökotoxikologie verbunden sein und zu neuen, interdisziplinären Kooperationen führen. Das neue Instrument des Translational-Research-Programm des FWF soll vor allem an der Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und angewandter Forschung genutzt werden. Konkrete Anwendungsziele sollen z. B. in der Fischökologie und Aquakultur gesetzt werden, die zu Kooperationen mit erwerbsorientierten Finanzierungspartnern führen werden. Ähnliches gilt für den Bereich der Abwasserbehandlung, bei dem die bestehenden Kontakte zu Unternehmen ggf. intensiviert werden sollen.

Bezüglich theoretischer Aspekte zur Artbildung und zu den Lebensstrategien der Organismen soll eine Zusammenarbeit mit dem Institute for Applied Systems Analysis (IIASA) in Laxenburg begonnen werden. Hinsichtlich evolutionsökologischer Fragen, die das Verhalten von Organismen betreffen, und der Eignung und

gilt unverändert in der jeweils aktualisierten Form

neue Partnerschaften wurden 2005 bis 2007 abgeschlossen

dies ist im Rahmen des ESF-Projektes 'Frontiers of Speciation Research' geplant

Anwendung molekulargenetischer Methoden für ökologische Fragestellungen wird eine engere Kooperation mit dem Konrad Lorenz Institut für Vergleichende Verhaltensforschung und dem Gregor-Mendel-Institut für Molekulare Pflanzenbiologie der ÖAW in Form gemeinsamer Forschungsprojekte, Austausch von Examenskandidat(inn)en, Seminaren etc. angestrebt.

6. Abgabe gemeinsam betreuter Forschungsprojekte

Die von der Stadt Wien finanzierten Projekte im Donauraum werden mit der Pensionierung der beteiligten Wissenschaftler beendet werden.

7. Abschluss aktueller Forschungsprojekte

Die derzeitigen Projekte in den Fachbereichen Theoretische Algenphysiologie (Falkner), Algenökologie (Dokulil), Fließgewässerökologie (Humpesch) sowie Evolution und Ökologie der Grundwasser-Crustaceen (Danielopol) werden mit der Pensionierung der leitenden Wissenschaftler in den Jahren 2006-2008 abgeschlossen werden. Die meisten dieser Projekte waren, z. T. aus historischen Gründen, im Raum Wien angesiedelt. Diese Projekte sollen im Sinne einer regionalen Fokussierung der nationalen Zusammenarbeit nicht fortgesetzt werden; vielmehr soll dieses Tätigkeitsfeld den Fachkollegen der Wiener Universitäten (Universität für Bodenkultur, Universität Wien) überlassen werden. Ebenso sollen die Projekte über den Abbau von organischem Material in Bächen, die im Rahmen der RITRODAT-Studie in Lunz begonnen worden waren, mit der Einreichung einschlägiger Publikationen beendet werden.

8. Wiederaufnahme derzeit nicht aktueller Forschungsprojekte

Gegenwärtig nicht geplant.

dies ist inzwischen
geschehen

9. Vorzeitige Einstellung derzeitiger Forschungsprojekte
Keine.

10. Auswirkung des Prioritätenkataloges auf die
mittelfristige Personalplanung

Die in den ersten beiden Abschnitten genannten Änderungen bzw. Ergänzungen in der Hauptzielrichtung des Forschungsprogrammes können realisiert werden, wenn die in den nächsten drei Jahren ausscheidenden vier Wissenschaftlerstellen adäquat nachbesetzt werden können. Eine dieser vier Wissenschaftlerstellen sollte eventuell in zwei Laboranalytikerstellen umgewidmet werden, um für neu hinzukommende Forschungsfelder mit anspruchsvoller Analytik eine angemessene technische Assistenz zu gewährleisten.

11. Auswirkung des Prioritätenkataloges auf die
Infrastruktur

Die hier skizzierten Ziele setzen voraus, dass die Sanierung und Erweiterung des Institutsgebäudes in Mondsee in den nächsten zwei Jahren erfolgt. Der jetzige Zustand der im Dachgeschoss eingerichteten vier Arbeitsräume verletzt die gesetzlichen Bestimmungen der Arbeitsstättenverordnung (s. Bescheid des Arbeitsinspektorats Vöcklabruck vom 23.2.2005) und muss auf jeden Fall beseitigt werden.

Die unzureichende Isolierung des Daches führt auch dazu, dass die Decke mehrerer Räume während der Schneeschmelze wasserdurchlässig wird. Ohne eine direkte Anbindung des Hauptgebäudes an die Bibliothek und die Einrichtung weiterer Labor- und Büroräume fehlen die mittelfristigen Entfaltungsperspektiven für die jetzigen und neu einzustellenden, experimentell arbeitenden Kollegen. Die Neueinstellungen, die Ausweitung der molekularbiologischen Arbeiten und die geplante inhaltliche Öffnung zur terrestrischen Ökologie werden Geräte-

Abschluss der Benthos-
projekte mit dem
vorzeitigen Ausscheiden
von U. Humpesch

Das Land OÖ hat im
Sommer 2006 eine
zweckgebundene
Förderung von 450.000 €
zugesagt. Die Sanierung
bzw. der Ausbau des
Institutsgebäudes wird im
Frühjahr 2008 begonnen

Der unbefriedigende Status
quo ante gilt unverändert

investitionen in der Analytik notwendig machen (z. B. Sequenzer, Atomspektroskopie oder Ersatz des veralteten Rasterelektronenmikroskops [REM] durch ein REM mit EDX-Spektrometer zum Elementnachweis). Die benötigten Investitionsmittel werden in dem Fünfjahreszeitraum 2006-2010 in der Größenordnung von 500.000 € liegen.

12. Budgetplanung 2006-2010

Das Institut wird im MFFP 2006-2010 voraussichtlich nur den oben skizzierten Forschungsschwerpunkt bearbeiten. Die Budgetplanung hierfür wurde für die Kuratoriumssitzung vorbereitet und liegt in elektronischer Form auf dem Server des Rechnungswesens vor.

13. Mögliche Anreize für Sponsoren

Das Institut verfügt über das 'know how' und die Infrastruktur für die Hälterung von Fischen und anderen schwer kultivierbaren Süßwasserorganismen, die für verschiedene Zwecke, z. B. als Produzenten bioaktiver Naturstoffe, eingesetzt werden können (s. Abschn. 5). Das Institut kann beratend oder direkt tätig werden bei experimentellen Testreihen, die biomedizinische, pharmazeutische oder in der Wassertechnik i. w. S. tätige Unternehmen für die Entwicklung und Anwendung neuartiger Produkte durchführen müssen. Das internationale Ansehen des Instituts ist als Multiplikator ihrer (umweltschonenden) Produkte für derartige Unternehmen interessant. Die von uns für die *in situ* - Charakterisierung von Mikroorganismen entwickelten neuen molekularbiologischen Analysemethoden können als Frühwarnmethoden für unerwünschte, umwelttoxische Arten (z. B. bei den Cyanobakterien) sowie allgemein im Umweltmonitoring von Oberflächengewässern und Kläranlagen eingesetzt werden.

s. Kooperationsprojekte mit den Fa. Cyano Biotech und Cyano BioFuels (Kurmayer)

1.4 Updated version of the Mid-term Research Programme 2008-2012

The five years' Mid-term Research Programme, originally formulated in German in April 2005 and commented on the previous pages for its recent updates, is still valid with some modifications. The overarching research theme is to investigate the "*Ecophysiology and Evolutionary Ecology of aquatic organisms and communities*". As anticipated in spring, 2005, three senior scientists have retired since then. Accordingly, the research on adaptive properties of the phosphate uptake system of cyanobacteria and their information storage (G. Falkner, retired at the end of 2006), as well as a subdiscipline of river ecology (benthos research, U. Humpesch, exempt from his duties by the end of 2006), have been finished with the leave of the responsible scientists. These long-term projects were somewhat isolated, with little bearing on the new research focus, i.e. investigating the origin and maintenance of diversity of aquatic organisms and communities at the various levels, ranging from genes through organisms, populations and communities to ecosystems.

As a consequence of the recent retirement of D. Danielopol (at the end of 2007), the long-term research on comparative morphology and evolutionary ecology of groundwater crustacea and groundwater ecosystems had to be finished. One important aspect of Danielopol's research, the evolutionary ecology of ostracods, will be continued by his successor, Dunja Lamatsch, with a new emphasis on molecular and cytogenetic analyses to identify clonal variability, mode of reproduction, gender, and ploidy in non-marine ostracods. Dunja Lamatsch received her current position against strong international competition. The focus of her research will be on the evolution of asexual reproduction in poeciliid fishes. Her research will ideally complement the recently started investigation of the evolution of asexuality in rotifers (C.-P. Stelzer, since 2007) and strengthen the link between our research on protists, invertebrates and coregonid fishes. Since recombination in the course of sexual reproduction is believed to be of utmost importance for maintaining sexual diversity of eukaryotes, the study of evolutionary successful, asexual lineages that have developed independently from each other in various taxa fits excellently to our general research theme and current research focus.

The vacant research positions have been filled in pursuit of the new research direction, away from classic limnological research and towards an "Institute for Aquatic and Evolutionary Ecology". The renewals of two more research positions in 2009 offer the chance to further strengthen the theoretically committed aspects of our research. We will especially seek for candidates who integrate experimental and theoretical approaches on the biodiversity of aquatic ecosystems with respect to the ongoing climate change scenario. The threats for biodiversity in freshwater ecosystems that result from the anticipated temperature increase shall be investigated at the interface between theoretical and applied limnology. The search for adequate candidates may be severely hampered by the reconstruction of the institute building at Mondsee. It is at present impossible to forecast precisely the extent of impairment of our research by the construction work in the course of the rebuilding and expansion of the laboratory building at Mondsee; this is because a detailed scenario of the reconstruction is pending (state of mid-February, 2008). We currently favour to rent office and laboratory containers at an alternative site to ensure the progress of our research activities in the course of the construction work, which will begin in spring, 2008. Due to the uncertainties resulting from the unknown duration of the reconstruction and the specific expertise of the scientists succeeding U. Humpesch and M. Dokulil in 2009, a more detailed outlook on the Institute's research programme beyond 2010 appears impossible at present.

1.5 Scientific activity in 2007 and major research results (aus AkademIS, in Word-Format nachbearbeitbar)

The following section describes the progress made in the Institute's major research projects in 2007 and includes some projects that are in the stage of planning. Please note that the publications, lectures and poster presentations listed refer to the year 2007 only. Similarly, only those persons who actively participated in a research project in 2007 have been listed.

Research projects

1.5.1 Methods for the genetic engineering of cyanobacteria

Individual research project (finished)
Start date: 15.11.2006, End date: 30.04.2007

1.5.1.1 Summary:

Cyanobacteria produce a number of important compounds such as carotenoids, fatty acids, proteins and bioactive substances that are of pharmaceutical interest. In contrast to heterotrophic bacteria cyanobacteria in general cannot easily be genetically modified which is a major obstacle to further commercial exploitation. In this project a number of cyanobacterial strains from sections I, II, III, IV will be tested for their natural competence as well as their transformability using plasmids carrying antibiotic resistance. The protocols to be applied for will test natural competence in dependence on the type of the plasmid (methylation, denaturation) used as well as in dependence on the cell-treatment to increase their transformability. In addition protocols applying conjugation via *E. coli* and self-replicating plasmids will be tested. Among 40 candidate strains the results of this study should identify strains that are most promising to be accessible for genetic manipulation tasks in the future.

1.5.1.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Kurmayer, Rainer	Kontaktperson	01.11.2006 bis 30.04.2007

1.5.2 Microevolution of toxin synthesis in cyanobacteria - FWF18185

Individual research project (finished)

Start date: 01.07.2005, End date: 31.12.2007

1.5.2.1 Summary:

Cyanobacteria (blue green algae) do occur frequently in surface water and contain an enormous high diversity of bioactive compounds. Typically isolates of the same species differ in composition of small bioactive peptides but cannot be discriminated in the microscope. Nothing is known about the mechanisms and recombination processes affecting existing pathways of secondary metabolite synthesis. In a previous project P15709 we have identified a number of DNA rearrangements and mutations within gene regions (*mcy*) involved in the synthesis of the toxic peptide microcystin (MC) which are either linked to specific structural variants differing in bioactivity or complete inactivation of the total *mcy* gene cluster (55 000 base pairs in length). Structural variants specific to populations in a specific lake have been found. It is the aim of the study

- (i) to find out whether genetic divergence in microcystin synthesis is possible in spatially separated populations although the theoretical unlimited dispersal capability of microorganisms;
- (ii) to test the hypothesis that the abundance of mutations and rearrangements might be explained by transposable elements;
- (iii) to differentiate between mutations of genes caused by transposable elements and caused by the degradation of genes;
- (iv) to find out the variation in abundance of specific mutations and unspecific *mcy* inactivation in nature;
- (v) to understand the physiological consequences of DNA rearrangements and mutations via the detection of the MC synthetase.

For this purpose nine *mcy* genotypes containing either specific mutations or functional rearrangements of the *mcy* gene cluster will be quantified in populations of the cyanobacterium *Planktothrix* in ten lakes and four lake inflows by modern quantitative real-time PCR technique (the Taq nuclease assay) and the data evaluated using multivariate statistics. In addition flanking regions of DNA rearrangements and mutations detected in field samples and in isolates will be genetically analysed for monophyly vs. polyphyly and signs of degradation of the *mcy* genes. The expression of the MC synthetase in isolates will be monitored via immunodetection techniques. This two year project will be among the first within the discipline of aquatic ecology that will be able to link molecular insights with ecological research and deliver information on the mechanisms favouring the impressive diversity in synthesis of secondary metabolites.

The results show that all the non-toxic strains of the filamentous cyanobacterium *Planktothrix* occurring in many European lakes have lost more than ninety percent of a large gene cluster encoding microcystin synthesis. The flanking regions of the gene cluster, with remnants of transposable elements in-between provide clear evidence against the role of horizontal gene transfer for the acquisition of the gene cluster encoding toxin synthesis but point towards the involvement of insertion elements in its deletion (Fig. 1). Surprisingly this gene cluster deletion occurred rarely and resulted in a monophyletic lineage of non-toxic strains spreading all over Europe. The rare occurrence of gene cluster deletion paired with evolutionary diversification of lineages of strains that lost or still contain the microcystin synthetase gene cluster need to be invoked in order to explain the absence or dominance of toxic cyanobacteria in various habitats.

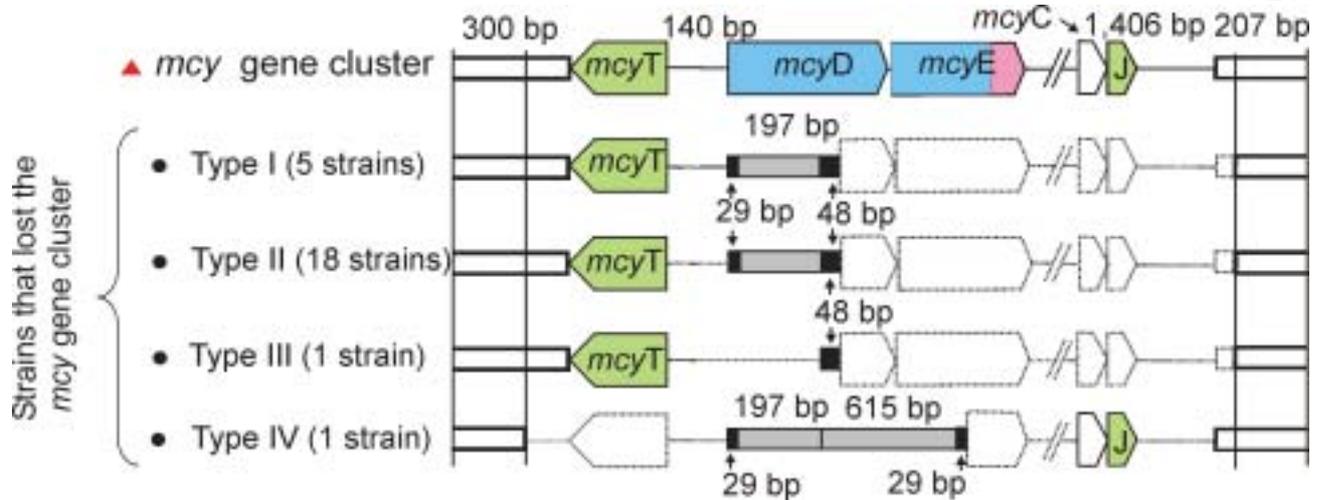


Fig. 1. Schematic view of the *mcy* remainders and flanking regions in strains that lost the *mcy* gene cluster. The four types (I-IV) of gene cluster deletion events are shown. Vertical straight lines enclose identical 5' and 3' ends. The grey gene regions represent remnants of insertion elements (197 bp) containing terminal inverted repeats (IR, 29 bp or 48 bp), (black boxes). The dotted areas indicate deletions. Red triangle, strains containing the *mcy* gene cluster; black dots, non-toxic strains lacking the *mcy* gene cluster.

1.5.2.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Christiansen, Guntram	Projektmitarbeit	01.10.2005 bis 30.09.2007
Kurmayer, Rainer	Projektleitung	01.07.2005 bis 31.12.2007
Molitor, Carole	Projektmitarbeit	15.09.2006 bis 31.10.2007
Ostermaier, Veronika	Projektmitarbeit	01.08.2006 bis 31.12.2007
Schmidt, Johanna	Projektmitarbeit	01.07.2005 bis 30.06.2008

1.5.2.3 Publications:

Ishida, Keishi; Christiansen, Guntram; Yoshida, Wesley Y.; Kurmayer, Rainer; Welker, Martin et al. [...] (2007) Biosynthetic pathway and structure analysis of aeruginoside 126A and B, cyanobacterial peptide glycosides bearing an unusual 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole moiety. *Chemistry and Biology*, Bd. 14, S. 565-576. [Christiansen, G. (HauptautorIn); Kurmayer, R. (KoautorIn)]

Naselli-Flores, Luigi; Barone, Rossella; Chorus, Ingrid; Kurmayer, Rainer; University of Palermo Department of Botanical Sciences, et al. [...] (2007) Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid Mediterranean climate: The magnification of a problem. *Environmental Toxicology*, Bd. 22, S. 399-404. [Kurmayer, R. (KoautorIn)]

Ostermaier, Veronika; Österreichische Akademie der Wissenschaften Institut für Limnologie, (2007) Saisonale Abundanzmuster von toxischen Genotypen in Populationen aquatischer Cyanobakterien. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilian Universität München, München. [Kurmayer, R. (HerausgeberIn)]

1.5.2.4 Lectures/Poster presentations:

Carole, Molitor (14.08.2007) Characterization of transposases affecting the synthesis of the toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria. Posterpräsentation: 30th Congress of the International Association of Theoretical

and Applied Limnology, Montreal/CANADA . [Kurmayer, Rainer]
Rainer, Kurmayer (21.03.2007) Algen als Toxinproduzenten in Gewässern. Vortrag: Allgemeine Vorträge und Versammlungen (Zoologisch-Botanische Gesellschaft in Österreich), Wien/AUSTRIA . [Kurmayer, Rainer]
Rainer, Kurmayer (04.05.2007) Mikroevolution der Toxinsynthese bei Cyanobakterien. Vortrag: Habilitationsvortrag (Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften), Wien/AUSTRIA. [Kurmayer, Rainer]
Kurmayer Rainer, (20.06.2007) Phylogenetic and geographic distribution of transposases inactivating the synthesis of the toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria. Vortrag: Mycotoxins and Phycotoxins, Waterville, Maine/UNITED STATES . [Kurmayer, Rainer]
Rainer, Kurmayer (09.07.2007) Cyanobacteria and toxin production in freshwater: research priorities from a limnological perspective. Vortrag: SEFS-5, Symposium for European Freshwater Sciences, Palermo/ITALY . [Kurmayer, Rainer]
Rainer, Kurmayer (07.08.2007) Distribution and abundance of insertion elements inactivating the synthesis of the toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria . Vortrag: ICTC 7th-International Conference on Toxic Cyanobacteria, Rio de Janeiro/BRAZIL . [Kurmayer, Rainer]
Guntram, Christiansen (07.08.2007) McyT, a typ II thioesterase exclusively found in the microcystin synthetase gene cluster. Vortrag: ICTC 7th-International Conference on Toxic Cyanobacteria, Rio de Janeiro/BRAZIL . [Christiansen, Guntram; Kurmayer, Rainer]
Rainer, Kurmayer (27.10.2007) Über den Einfluss von Transposablen Elementen auf die Variation in der Produktion im Sekundärstoffwechsel bei Cyanobakterien. Vortrag: SIL Austria Jahrestreffen (SIL Austria), Lunz am See/AUSTRIA . [Kurmayer, Rainer]

1.5.3 Use of cyanobacteria for the production of ethanol

Individual research project (in progress)

Start date: 01.09.2007, scheduled end date: 31.08.2008

Ethanol is currently one of the most promising alternative energy sources to gasoline and has up to date been produced via fermentation mainly from corn, sugar cane and other agricultural plants. While the photosynthetic assimilation products of cyanobacteria and other photosynthetic microorganisms can be processed into ethanol, the yield of ethanol compared to traditional plant feed stocks is higher because faster growth under optimal conditions can be achieved. In the present project a large number of cyanobacteria will be investigated for photosynthetic capacity and further physiological parameters as well as stress tolerances relevant for large scale processes. Cyanobacteria have been isolated from various habitats both from freshwater and marine systems. Since cyanobacteria show an impressive variation in physiological properties a collection of cyanobacteria from various habitats also provides an excellent platform for the experimental selection of suitable strains.

1.5.3.1 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Christiansen, Guntram	Projektleitung	01.09.2007 bis 31.03.2008
Kurmayer, Rainer	Projektmanagement	01.09.2007 bis 31.03.2008
Schmidt, Johanna	Projektmitarbeit	31.08.2007 bis 31.03.2008

1.5.4 Molecular and chemical characterisation of toxic cyanobacteria in Ugandan freshwater

Dissertationsprojekt (in progress)

Start date: 15.06.2006, scheduled end date: 14.06.2009

1.5.4.1 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Kurmayer, Rainer	Kontaktperson	15.06.2006 bis 14.06.2009
Okello, William	Allein Durchführende(r)	15.06.2006 bis 14.06.2009

1.5.4.2 Lectures/Poster presentations:

Okello, William (02.12.2007) Toxic cyanobacteria occurrence in Ugandan freshwater bodies. Vortrag: Chemrawn XII, The role of chemistry in sustainable agriculture and human well-being in Africa/SOUTH AFRICA. [Okello, William]
--

1.5.5 Genotype determined toxin content in cyanobacteria

allgemeines Forschungsprojekt (geplant)

geplanter Start date: 01.07.2008, scheduled end date: 30.06.2011

1.5.5.1 Summary:

The toxic heptapeptide microcystin (MC) has gained much attention as bloom forming cyanobacteria are known to contain high amounts of microcystin posing a considerable health risk to humans worldwide. While the influence of environmental factors on the net production of MC has been studied during the last years, the genotype determined content of MC is not understood. For example, under identical environmental conditions the MC content among strains can differ more than tenfold and this difference has been reproducibly shown over years.

In this project it is proposed to use the filamentous microcystin producing strain *Planktothrix agardhii* CYA126/8 as a model system to investigate factors regulating the genotype determined MC content in cyanobacteria. For this purpose we sequenced the genome of this strain as it is amenable to genetic manipulation. Analysis of the genome data revealed three additional gene clusters that are responsible for the biosynthesis of peptides related to MC (anabaenopeptin, cyanopeptolin and aeruginoside). It is aimed to elucidate (1) functional consequences of mutations on MC content that have been described to occur in the MC biosynthesis genes of different strains, (2) the influence of additional peptide synthetase gene clusters on MC biosynthesis, (3) the influence of availability of building block precursors for the biosynthesis of MC.

As mutations have been observed within the gene cluster encoding MC biosynthesis of different strains we will experimentally analyse their consequences. Single enzymes with high mutational rates will be heterologously expressed and biochemically characterized. The influence of genetically inactivated peptide synthetases related to MC synthesis will be analyzed in growth experiments under limiting and nonlimiting environmental conditions. Feeding precursors to the axenic model strain e.g. amino acids which are known to be incorporated into MC will elucidate whether precursors potentially limit the

MC content. The results are of crucial relevance to understand genotype dependent determination of MC production in water.

In order to analyze functional consequences of point mutations on microcystin content that have been described to occur in the *mcyT* gene part of the microcystin biosynthesis gene cluster, the *mcyT* gene has been experimentally inactivated by gene knock-out experiments. The results show that microcystin synthesis was significantly reduced although not completely abandoned in the mutant when compared with the wild type (Fig. 2).

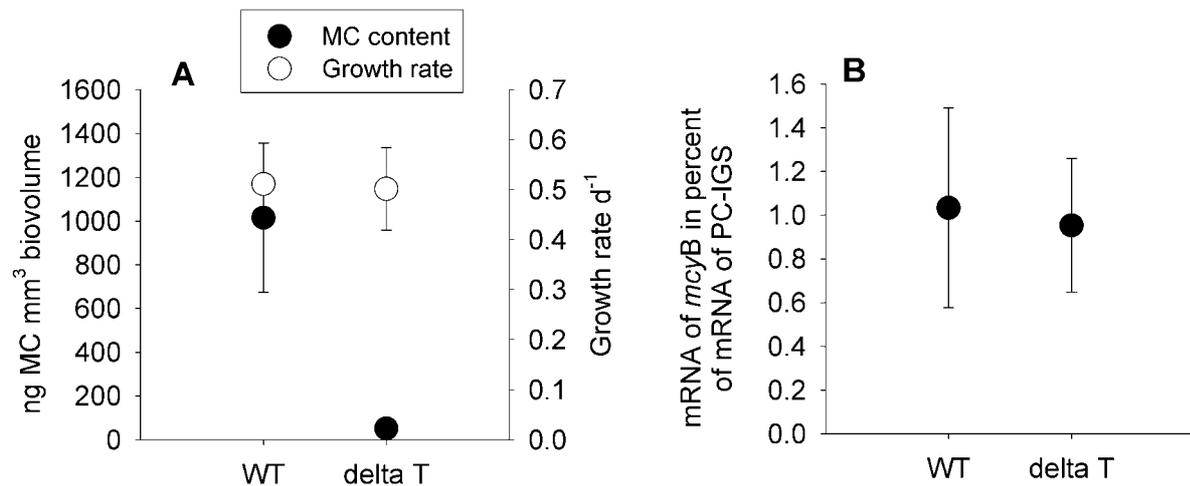


Fig. 2. Growth rate, microcystin content and *mcy* transcripts of *Planktothrix* wildtype (WT) strain that has been insertionally inactivated via insertional inactivation of a gene *mcyT* putatively involved in microcystin synthesis ($\Delta mcyT$). (A) Mean (± 1 SD) microcystin content (μm^3 of biovolume, black circles) and growth rates (μd^{-1} , white circles) of *Planktothrix* strain CYA126/8 (WT) and its mutant $\Delta mcyT$ grown under semi continuous culture conditions. (B) mRNA contents of *mcyB* in proportion to phycocyanin (PC-IGS) (in % equivalents of μm^3 of biovolume) for the same experiment.

1.5.5.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Kurmayer, Rainer	Projektleitung	29.03.2007 bis 31.10.2010

1.5.6 Changes in bacterioplankton structure and functioning in a reservoir related to single-cell activities of major phylogenetic groups of bacteria

Individual research project (in progress)

Start date: 01.01.2005, scheduled end date: 31.12.2007

1.5.6.1 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Hahn, Martin	Projektmitarbeit	01.01.2005 bis 31.12.2007

1.5.7 Ecological and phylogenetic comparison of bacterial populations inhabiting Antarctic and European lakes

Individual research project (in progress)

Start date: 01.05.2007, scheduled end date: 31.12.2008

1.5.7.1 Summary:

Bilaterales Forschungsprojekt in Zusammenarbeit mit Prof. Antonio Camacho (Spanien)

1.5.7.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Brandt, Ulrike	Projektmitarbeit	01.05.2007 bis 31.12.2008
Hahn, Martin	Projektleitung	01.05.2007 bis 31.12.2008
Scheuerl, Thomas	Projektmitarbeit	01.05.2007 bis 31.12.2008

1.5.8 Eco-physiological characteristics of two important groups of Betaproteobacteria abundant in freshwater bacterioplankton

Individual research project (in progress)

Start date: 01.03.2007, scheduled end date: 31.12.2008

1.5.8.1 Summary:

Bilaterales Forschungsprojekt in Zusammenarbeit mit Prof. Karel Simek (CZ)

1.5.8.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Brandt, Ulrike	Projektmitarbeit	01.03.2007 bis 31.12.2008
Hahn, Martin	Projektleitung	01.03.2007 bis 31.12.2008
Jezbera, Jan	Projektmitarbeit	01.01.2007 bis ?

1.5.9 Genetic and ecological diversity of a narrow phylogenetic group of abundant freshwater bacteria. (FWF19853)

Individual research project (in progress)

Start date: 01.03.2007, scheduled end date: 28.02.2009

1.5.9.1 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Brandt, Ulrike	Projektmitarbeit	01.03.2007 bis 28.02.2009
Hahn, Martin	Projektleitung	01.03.2007 bis 28.02.2009
Jezbera, Jan	Projektmitarbeit	01.08.2007 bis ?
Jezberova, Jitka	Projektmitarbeit	01.08.2007 bis ?
Scheuerl, Thomas	Projektmitarbeit	15.03.2007 bis 14.03.2008
Sophie, Schärfl	Projektmitarbeit	01.10.2007 bis ?

1.5.9.2 Lectures/Poster presentations:

Hahn, M.W. (24.09.2007) Planktonic bacteria in Chinese and European lakes: Are they different?. Vortrag: China-Germany Symposium on Microbes and the Environment, Beijing/CHINA. [Hahn, Martin]

1.5.10 Polynucleobacter Genome Project - PolyGenome

Individual research project (in progress)

Start date: 01.08.2005, scheduled end date: 31.12.2008

1.5.10.1 Summary:

The first successful cultivation in our laboratory of the cosmopolitan, quantitatively significant freshwater bacteria of the genus *Polynucleobacter* enabled detailed research into their physiology, evolution, and biogeography (Fig. 3).

1.5.10.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Hahn, Martin	Projektleitung	01.08.2005 bis 31.07.2007

1.5.10.3 Lectures/Poster presentations:

Hahn, M.W. (24.09.2007) Planktonic bacteria in Chinese and European lakes: Are they different?. Vortrag: China-Germany Symposium on Microbes and the Environment, Beijing/CHINA. [Hahn, Martin]

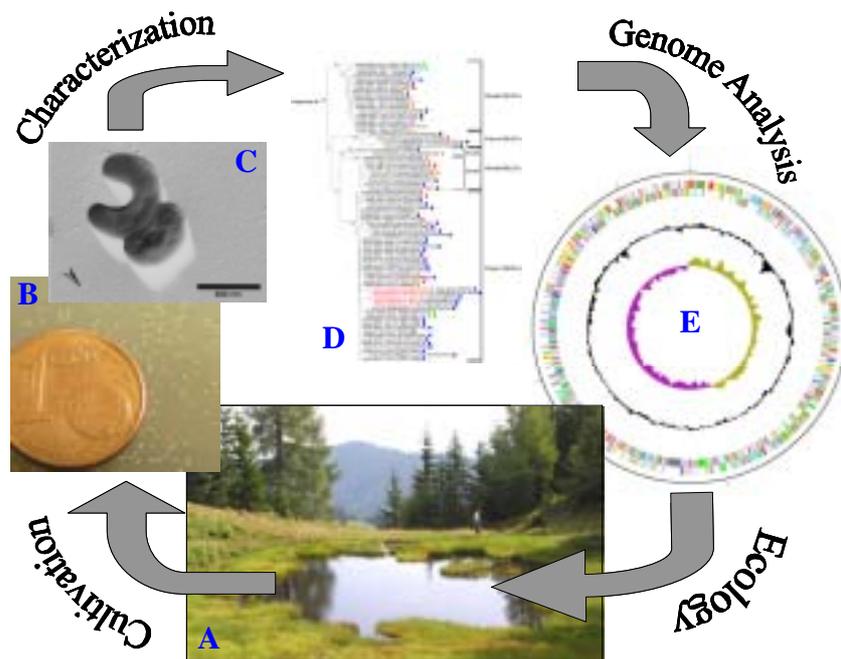


Fig. 3. . *Polynucleobacter* bacteria were isolated from a pond at Faistenau, Salzburg (A), continuously cultivated (B), and studied for their phenotypic (C) and phylogenetic characters (D). Various molecular methods were developed to further characterize these bacteria; genome sequencing that was recently completed (in cooperation with the Joint Genome Institute, USA) will facilitate a holistic understanding of their ecology.

1.5.11 Chrysophyte diversity and encystment pattern in alpine lakes: Merging molecular microbiology, recent and palaeoecology in C32#

Individual research project (in progress)

Start date: 15.12.2005, scheduled end date: 14.12.2008

1.5.11.1 Summary:

Global warming is one of the major challenges of the 21st century, having vital ecological, economic and political consequences. Chrysophyte stomatocyst composition is an indicator for habitat characteristics and thus can be used for assessing environmental change. Despite the recent advances, our understanding of ecological processes that drive chrysophyte diversity changes is still limited. Multidisciplinary approaches are a prerequisite to exhaust the full potential of this important indicator group. Both reconstruction of palaeoenvironmental conditions and measuring recent trends is of urgent interest to develop strategies for protecting the sensitive alpine regions. The objective of this project is to provide a basis to tap the full potential of chrysophytes as palaeoindicators by merging the strengths of ecology, palaeoecology and molecular microbiology: We propose to characterise encystment pattern in chrysophytes and thereby to link stomatocyst palaeoecology with ecology of vegetative cells. Samples from lakes

differing in elevation, trophy and lake chemistry will be taken during different seasons and screened for chrysophyte taxa (vegetative cells) which subsequently shall be characterised morphologically and by molecular methods. The intention of the first phase of the project is to collect molecular signatures of chrysophyte taxa for linking vegetative cells to cysts (cooperation with Dr. C. Kamenik). Community composition, dominance structure and seasonal variation is in the focus of the second phase of the project. These quantitative data will also be linked to chrysophyte stomatocyst assemblages as sampled by sediment traps. In parallel, autecological laboratory experiments will be conducted to estimate basic tolerance limits and optimum growth conditions of selected chrysophyte taxa. During the terminal project phase, data will be linked to a palaeoecological data set (sediment core from Lake Oberer Landschitzsee; cooperation with Prof. Dr. R. Schmidt). Thus, classical and new as well as modern and palaeoenvironmental approaches shall be merged to strengthen chrysophyte functional biodiversity as a powerful indicator for environmental (climate) change. Multidisciplinary and cross linking the strengths of different fields of research is a key issue of this proposal. The proposed project is thus embedded in the recent climate change research and specifically strongly linked to current Austrian and international research projects on chrysophyte diversity and climate change.

1.5.11.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Auinger, Barbara	Projektmitarbeit	15.03.2006 bis 14.03.2008
Boenigk, Jens	Projektleitung	15.12.2005 bis 14.12.2008
Wiedlroither, Anneliese	Projektmitarbeit	15.12.2005 bis 14.12.2008

1.5.11.3 Lectures/Poster presentations:

Boenigk, Jens (23.02.2007) Monadologie - a reassessment. Vortrag: 26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie im Jahr 2007/GERMANY. [Boenigk, Jens]

1.5.12 Habitat specificity of flagellates and ecophysiological significance of microdiversity

Individual research project (in progress)

Start date: 01.01.2006, scheduled end date: 31.12.2008

1.5.12.1 Summary:

Inter- and intraspecific diversity, biogeography and adaptations to specific environmental conditions were studied with the common, Spumella-like chrysophyte flagellates. Molecular genetic investigations revealed a large diversity within these morphological similar or even identical organisms. Ecophysiological adaptation is different among the various genetic clusters and may correspond to their molecular diversity (**Fig. 4**). Geographic dispersal patterns can, however, superimpose on ecophysiological adaptation, as in the case of chrysophyceans from temperate to tropical regions.

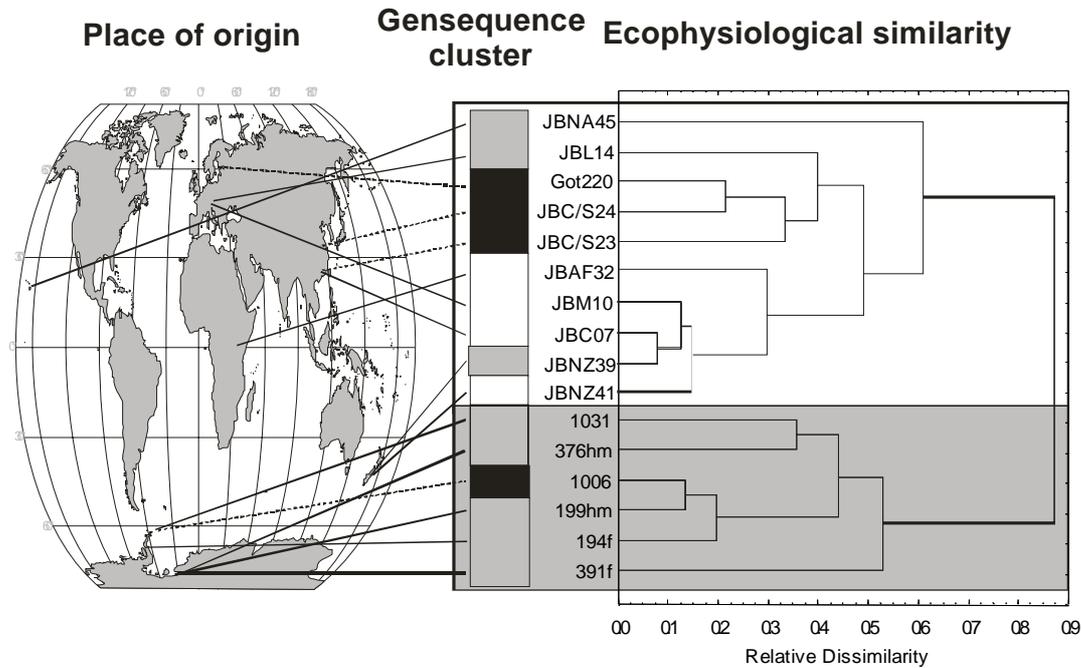


Fig. 4. Dispersal, genetic, and ecophysiological diversity of flagellates (Chrysophyceae). Ecophysiological diversity of the strains (assessed as tolerance to temperature, salinity, and pH) is shown as cluster analysis (right) and compared to their molecular identity (central part; grey, black and white denote one sequence cluster each) and origin (left). The cluster analysis revealed ecophysiological adaptation of the Antarctic strains (modified after Boenigk et al. 2006).

1.5.12.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Boenigk, Jens	Projektleitung	01.01.2006 bis 31.12.2008
Jost, Steffen	Projektmitarbeit	01.01.2007 bis 31.12.2007

1.5.12.3 Publications:

Stoeck T, Jost S, Boenigk J Multigene phylogenies of clonal Spumella-like strains, a cryptic heterotrophic nanoflagellate, isolated from different geographic regions. *Int J Sys Evol Microbiol.* [Boenigk, J. (KoautorIn)]

1.5.12.4 Lectures/Poster presentations:

, Boenigk (07.09.2007) Summary and future directions. Vortrag: Symposium of Aquatic Microbial Ecology/PORTUGAL. [Boenigk, Jens]

, Boenigk (12.09.2007) Distribution pattern in protists: facts and fiction . Vortrag: Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie/GERMANY. [Boenigk, Jens]

, Boenigk (24.09.2007) The ecophysiological (dis)advantage of being an animal: a case study on protozoa. Vortrag: Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft/GERMANY. [Boenigk, Jens]

, Boenigk (27.09.2007) Differential impact of groundwater and surface run-off on eukaryotic microbial diversity in a mountain stream. Vortrag: Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie/GERMANY. [Boenigk, Jens]

, Boenigk (12.11.2007) The ecophysiological (dis)advantage of being an animal: lessons learnt from protist ecolgy. Vortrag: Seminar University Innsbruck/AUSTRIA. [Boenigk, Jens]

1.5.13 Niche separation and coexistence of chrysophytes in an alpine gradient

Individual research project (in progress)

Start date: 15.03.2007, scheduled end date: 31.03.2010

1.5.13.1 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Boenigk, Jens	Projektleitung	01.04.2007 bis 31.03.2010

1.5.13.2 Lectures/Poster presentations:

, Boenigk (04.09.2007) Colourless algae: the ecophysiological (dis)advantage of being a plant. Vortrag: Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft/GERMANY. [Boenigk, Jens]

, Boenigk (07.12.2007) The past and present dilemma with protist species, diversity and ecophysiological differentiation. Vortrag: Seminar Universität Potsdam/GERMANY. [Boenigk, Jens]

1.5.14 Changing prospects in eukaryotic microbiology: implications of acclimatization, microevolution and population turnover of microeukaryotes for protist species, population dynamics and diversity estimates

Individual research project (geplant)

geplanter Start date: 01.01.2008, scheduled end date: 31.12.2013

1.5.14.1 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Boenigk, Jens	Projektleitung	02.01.2007 bis 31.12.2013

1.5.15 Ecological significance of phenotypic and genotypic variability in freshwater protists - a test case using the oligotrich ciliate *Meseres corlissi*

Forschungsprogramm, FWF P16796-B06 (finished)

Start date: 01.01.2004, End date: 30.06.2007, Final project report: 30.9.2007

1.5.15.1 Summary:

The goal of this international, cooperative research project was to study the extent and ecological significance of intraspecific genotypic and phenotypic variability of the freshwater ciliate *Meseres corlissi*. We used this organism as a model of a rare species to test the hypothesis that aquatic protists are globally distributed and that, therefore, genotypic differences and phenotypic adaptations to local environmental conditions should be negligible. If this hypothesis is correct, biodiversity of free-living protists must be relatively low. This research project combined, for the first time, molecular genetic, morphological and ecophysiological methods to investigate the extent of genetic and phenotypic variability among different isolates of *M. corlissi*; the isolates originated from different habitats on 4 continents (Europe, Asia, Australia, and Central America). Our results demonstrate that a low variability (0-4 %) of the genes studied corresponded to a moderate morphological (5-15 %) and to a high ecophysiological (10-100 %) variability. For example, the pH reaction norms of the Austrian isolates of *M. corlissi* were significantly different from those of the Australian and Chinese clones (Fig. 5); the extent of this intraspecific variability is comparable to differences observed earlier between different species of the same genus (Weisse & Stadler 2006: Limnol. Oceanogr. 51: 1708-1715).

One *Meseres* clone isolated from China differed significantly at all study levels from all other isolates, while other clones, not only between two different localities in Austria, but also between geographically distant localities such as Austria and Australia, were virtually identical. These findings suggest a potentially wide dispersal of some clones within this species, but also a locally limited dispersal and the establishment of habitat-specific, local adaptations of other clones. The latter emerged primarily at the ecophysiological study level. The temperature response of the various *Meseres* populations showed distinct, genetically fixed adaptations to the habitat of their origin. Our results imply that biodiversity and biogeography of free-living protist have to be considered more specifically than it was common practise until now.

We further investigated the hitherto unknown life strategy of *M. corlissi* within this project. We expect that our detailed morphological and ecological results on the formation of its resting stages (cysts) will serve as a model for similar future studies.

1.5.15.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Scheffel, Ulrike	Projektmitarbeit	01.01.2004 bis 30.06.2007
Stadler, Peter	Forschungsassistentz	01.01.2004 bis 30.06.2007
Weisse, Thomas	Projektleitung	15.12.2003 bis 30.09.2007

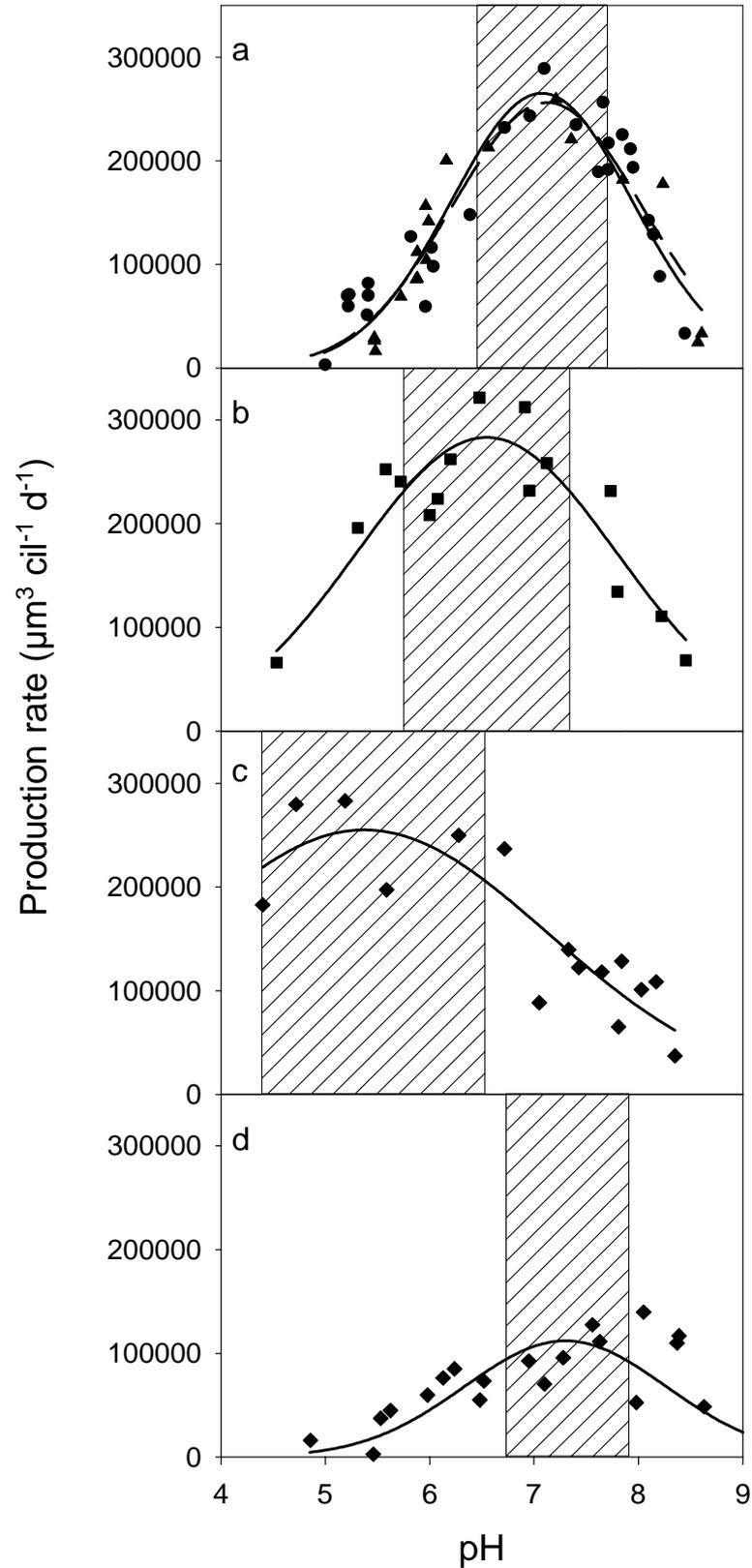


Fig. 5. *Meseres corlissi*. Cellular production (CP) rate of 5 clones vs. pH. (a) AU3 (D) and AU5 (M); (b) AU6 (■); (c) AUS (f); (d) CHI (○). Solid lines represent fit of a 3-parameter Gaussian peak equation; hatched areas indicate pH optimum at which production reached >80% of the maximum (Weisse et al. 2007).

1.5.15.3 Publications:

Weisse, Thomas; Scheffel, Ulrike; Stadler, Peter; Foissner, Wilhelm (2007) Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate <i>Meseres corlissi</i> . II. Response to pH. <i>Aquatic Microbial Ecology</i> , Bd. 47, S. 289–297. [Weisse, T. (HauptautorIn)]
Weisse, Thomas (2007) Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective. <i>Biodiversity and Conservation</i> , Bd. 10.1007/s10531-007-9249-4. [Weisse, T. (AlleinautorIn)]
Gächter, Elke; Weisse, Thomas Long-term acclimation of growth rates in the oligotrich freshwater ciliate <i>Meseres corlissi</i> . <i>Verh. Internat. Verein. Limnol.</i> , Bd. 30. [Gächter, E. (KoautorIn); Weisse, T. (HauptautorIn)]

1.5.15.4 Lectures/Poster presentations:

Gächter, Elke; Weisse, Thomas (22.02.2007) Functional reponse and selective feeding of the filter feeding ciliate <i>Meseres corlissi</i> . Posterpräsentation: 26. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Salzburg/AUSTRIA. [Weisse, Thomas]
Weisse, Thomas (13.08.2007) Long-term acclimation of growth rates in the oligotrich freshwater ciliate <i>Meseres corlissi</i> . Posterpräsentation: 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Montreal/CANADA. [Weisse, Thomas]
Weisse, Thomas; Gächter, Elke; Müller, Helga; Scheffel, Ulrike; Stadler, Peter et al. [...] (22.02.2007) <i>Meseres corlissi</i> : ökophysiologische Differenzierung innerhalb einer Art. Vortrag: 26. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Salzburg/AUSTRIA. [Gächter, Elke & Weisse, Thomas]
Weisse, Thomas (04.05.2007) Ecophysiology and biogeography of freshwater ciliates . Vortrag: Seminar series, Zürich/SWITZERLAND. [Weisse, Thomas]
Weisse, Thomas (16.08.2007) <i>Meseres corlissi</i> , a cosmopolitan ciliate with limited dispersal and biogeography. Vortrag: 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Montreal/CANADA. [Weisse, Thomas]
Weisse, Thomas (10.12.2007) Ökologie und Diversität von Süßwasser-Ciliaten. Vortrag: Colloquium a. d. Univ. Leipzig, Leipzig/GERMANY. [Weisse, Thomas]

1.5.16 Reduced plankton diversity in extremely acidic mining lakes

Individual research project t, KIÖS Projekt 2007-05 (finished)

Start date: 15.04.2007, End date: 15.11.2007, Final project report: 15.01.2008

1.5.16.1 Summary:

Das Hauptziel des Projektes war es, als Pilotstudie die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Antragstellung eines umfassenden, interdisziplinären Projektes beim FWF zu schaffen, das im Frühjahr 2007 unter Beteiligung zweier deutscher Arbeitsgruppen (von den Universitäten in Potsdam und Leipzig) eingereicht werden und eine Laufzeit von 3 Jahren aufweisen sollte. Das FWF-Projekt wurde am 26.2.2007 eingereicht und am 7.5.2007 nahezu ungekürzt bewilligt (P20118-B17, s. Projekt 1.15.17). Das Gesamtprojekt analysiert die bisher nur unzureichend erkannte(n) Ursache(n) der reduzierten Planktondiversität in sehr sauren Tagebaurestseen. Dabei wird vor allem die Hypothese geprüft, dass acidotolerante Arten sich in sauren Gewässern durchsetzen, weil ihre in neutralen Gewässern überlegenen Konkurrenten weniger resistent gegen Säurestress

sind. Hierbei werden repräsentative Planktonorganismen aus mehreren sehr sauren (pH <3) Tagebaurestseen aus Langau (Niederösterreich) und der Lausitz (D) vergleichend in Labor- und Freilandexperimenten untersucht. Der Tagebaurestsee von Langau ist der gegenwärtig sauerste See in Österreich. Das hier beschriebene Pilot-Projekt liefert einen ersten Beitrag zur Erfassung der Biodiversität in einem für Österreich einmaligen Extremhabitat.

Die Ergebnisse des Pilotprojektes bestätigen, dass die Flora und Fauna in sehr sauren (pH<3) Tagebaurestseen gegenüber hydromorphologisch ähnlichen, aber weniger sauren Tagebaurestseen sehr stark verarmt ist. Ob neben der mikrobiell katalysierten Oxidation von Eisen- und Schwefelverbindungen auch die bei höheren pH-Werten (>5) überwiegende chemische Fe(II)-Oxidation (Kirby et al. 1999) eine Rolle spielt, konnte im Rahmen dieses Projektes nicht untersucht werden. Diese Tiefenzone ist von zumindest einem bisher unidentifizierten autotrophen Protisten bewohnt, der an mikroaerophile Verhältnisse angepasst zu sein scheint. Die oberen, aeroben 5-6 m der Wassersäule in RSL werden von einer Flora und Fauna besiedelt, die quantitativ und qualitativ jener des ca. 325 km entfernten Tagebaurestsees ML 111 ähnelt, aber nach den bisherigen Ergebnissen nicht ident ist. Bis auf die Heliozoen (vermutlich *Actinophrys sol*) und den noch unidentifizierten mikroaerophilen Protisten konnten die dominanten eukaryontischen Organismen aus RSL im Rahmen dieser Pilotstudie isoliert und in kontinuierliche Laborkulturen überführt werden. Diese Organismen werden in den folgenden beiden Jahren, zusammen mit den jeweils entsprechenden Isolaten aus den sauren Seen der Lausitz und nahe verwandten, neutrophilen Arten in detaillierten Labor- und Freilandexperimenten vergleichend untersucht werden. Dabei wird die Arbeitshypothese geprüft, dass acidotolerante Arten sich in sauren Gewässern durchsetzen, weil ihre in neutralen Gewässern überlegenen Konkurrenten weniger resistent gegen Säurestress sind. Wenn diese Hypothese zutrifft, würden die extrem sauren Gewässer primär von euryöken Organismen mit einer weiten pH-Reaktionsnorm (Generalisten) besiedelt werden. Alternativ könnten die sauren Gewässer primär von stenöken Organismen mit einer hohen Säuretoleranz (Spezialisten) besiedelt werden. Dazu werden wir untersuchen, ob die Säurestresstoleranz unserer Untersuchungsorganismen mit ihrer Temperaturtoleranz gekoppelt ist und über die Synthese und Aktivierung von Hitzeschockproteinen vermittelt wird. Erste Ergebnisse der Freilandarbeiten dieses Projektes wurden im Herbst 2007 auf einer nationalen Tagung vorgestellt (Moser & Weisse 2007). Ein ausführlicherer Beitrag wird im Juni 2008 im Rahmen der ASLO-Tagung in St. John's (Kanada) gehalten, bei der der Projektleiter zusammen mit einer amerikanischen Kollegin (D. Stoecker) und einem dänischen Kollegen (P.-J. Hansen) die 'Special Session' "Influence of pH on Ecological and Biogeochemical Processes" leiten wird. Die Erkenntnisse der Pilotstudie werden in mehrere Publikationen in internationalen Fachzeitschriften einfließen, wenn die vorläufigen Ergebnisse durch weitere Untersuchungen im Rahmen des FWF-Projektes bestätigt und ergänzt werden können.

1.5.16.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Stadler, Peter	Projektmitarbeit	15.04.2007 bis 14.10.2007
Moser, Michael	Projektmitarbeit	15.04.2007 bis 14.10.2007
Weisse, Thomas	Projektleitung	15.04.2007 bis 14.10.2007

1.5.16.3 Publications:

Weisse, Thomas (15.01.2008) Reduzierte Planktondiversität in extrem sauren Tagebaurestseen. KIÖS: [Weisse, T. (AlleinautorIn)]
--

1.5.16.4 Lectures/Poster presentations:

Weisse, Thomas (26.10.2007) Der 'rote See' von Langau (NÖ) - Untersuchungen am sauersten See Österreichs . Posterpräsentation: SIL Austria Jahrestreffen 2007, Lunz/See/AUSTRIA. [Weisse, Thomas]

1.5.17 Patterns and processes of adaptation and tolerance to low pH of freshwater plankton

Individual research project, FWF P20118-B17 (in progress)

Start date: 01.07.2007, scheduled end date: 30.06.2010

1.5.17.1 Summary:

The pH is a major environmental factor of freshwater aquatic ecosystems, ranging from <2 to 12. Biodiversity is greatly reduced in highly acidic environments (pH <3) such as acid mining lakes (AML). Although the reduction of species numbers with decreasing pH has been described in several protist and metazoan phyla, the patterns and processes of adaptation and tolerance to low pH are little understood for planktonic organisms. Presumably there are more acid tolerant species, which take refuge in low pH environments, than acidophil species which are specifically adapted to the high hydrogen ion concentration. We will design in vitro and in situ experiments within this project to test if acidotolerant species benefit from competitive release under conditions of acid stress. For the first time, we will study the interactive effect of temperature and pH stress at different food levels for planktonic ciliates, rotifers and crustacea. Since it has been assumed that tolerance towards temperature and pH stress may have a common denominator in the form of heat shock proteins, we will develop molecular markers for the detection of small heat shock proteins (HSPs) at the genomic DNA and mRNA level in our target species. Further, we will develop a flow cytometric protocol to measure the cytosolic pH and determine the external pH at which efficient internal pH regulation collapses in the study species.

We aim to differentiate between genetically fixed, general physiological adaptation to acidic conditions (at the species level) and site-specific traits in similar habitats resulting from historic events, i.e. small-scale genetic shifts below the species level (microevolution). In the second part of the project we will, therefore, investigate the biomass spectrum and, using molecular methods, characterize the major players of three AML and one neutral reference lake. The four study lakes differ with respect to their pH, age and/or geographic location. Such lakes provide a rare case of suitable ecosystem models to test for the significance of strong habitat selection. We will design field and laboratory experiments challenging the assumption that the distribution of aquatic microorganisms (in AML) does not require any historical explanation, i.e. that the habitat acts strictly as a filter sensu Gleason's 'individualistic concept' of population ecology. If we find genetic and physiological differences at the sub-species level that cannot be explained by changing environments we will reject the hypothesis that the dispersal of free-living microorganisms is unlimited and that their distribution can be understood solely in terms of habitat properties. The conclusions that will emerge from this part of the project have far-reaching implications for general ecology and the ongoing debate on the biodiversity of free-living microbes.

1.5.17.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Scheffel, Ulrike	Projektmitarbeit	01.09.2007 bis 31.08.2010
Moser, Michael	Projektmitarbeit	01.07.2007 bis 30.06.2009
Scheffel, Ulrike	Projektmitarbeit	01.09.2007 bis 31.08.2010
Stadler, Peter	Forschungsassistentz	01.07.2007 bis 30.06.2010
Weisse, Thomas	Projektleitung	01.01.2007 bis 31.03.2011

1.5.17.3 Lectures/Poster presentations:

Moser, Michael; Weisse, Thomas (27.10.2007) Der 'rote See' von Langau (NÖ) - Untersuchungen am sauersten See Österreichs . Posterpräsentation: SIL-Austria Jahrestagung (WasserKluster Lunz), Lunz am See/AUSTRIA. [Weisse, Thomas]

1.5.18 Morphology and ecology of endemic ciliates from bromeliads

Individual research project, FWF P20360-B17, Foissner/Weisse, accepted)
geplanter Start date: 01.09.2008, scheduled end date: 31.08.2011

1.5.18.1 Summary:

Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study

At the turn of the millennium, Foissner et al. (2003) discovered a likely specific (endemic) ciliate fauna in tank bromeliads. Ciliates are single-celled organisms (protists) of microscopic size (~15–1000 µm), for instance, the widely known slipper animal (*Paramecium*). Bromeliads are a group of rosette plants of the Liliidae (lilies) restricted, with few exceptions, to Central and South America. The most famous bromeliad is the pineapple. The “tanks” (= small bodies of water) are formed by the coalescing leaf axils which collect the rain water and plant litter. Since Picado (1913), it is known that bromelian tanks are inhabited by many specific organisms, now ranging from protists to frogs.

Our research started without any grant support (Foissner et al. 2003). Now, we have a lot of interesting material (~ 40 new species, including several new genera and families) and ideas, whose realization and publication needs personnel and financial support. The project is planed with a “formal” ecological partner (supported by grant money and personnel, Prof. T. Weisse) and two “informal” partners, viz., Dr. K. Wolf from Jamaica University and a not yet specified partner for molecular taxonomy.

Main objectives and perspectives include:

- To publish the taxonomic data accumulated and those obtained during a planed stay at Jamaica University. Likely, these are about 60 new ciliate species whose distribution will be investigated at various spatial scales. This part of the project should firmly establish the specificity of the bromelian tank ciliate community and thus the occurrence of micro-organisms with restricted geographic distribution.
- To contribute to biodiversity of protists from a region which is almost a tabula rasa in this respect.
- Ecological research will include the functional ecology of some of the more common endemic tank ciliates and experiments for exploring the unusually high frequency of species which can switch between bacteriophagous microstomes and predaceous macrostomes.

- To educate a young scientist in classical and molecular alpha-taxonomy (= description of species), a specific discipline threatened to become extinct in Europe and the USA, at least as concerns heterotrophic, free-living protists.

1.5.18.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Weisse, Thomas	Projektleitung	15.051.2007 bis 31.03.2011

1.5.19 Joint Danube Survey 2

Individual research project (ongoing)

Start date: 12.08.2007, , scheduled end date: 31.01.2008

1.5.19.1 Summary:

The Institute participated in the international Joint Danube Survey 2 organized by the International Commission for the Protection of the Danube. More than 100 samples were taken to measure major parameters characterizing the algal river plankton (Fig. 6). Highest algal concentrations were measured in the middle section of the river from Budapest to south of Novi Sad.

1.5.19.2 Wissenschaftliche MitarbeiterInnen:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Dokulil, Martin	Projektmitarbeit	01.03.2007 bis 31.12.2008

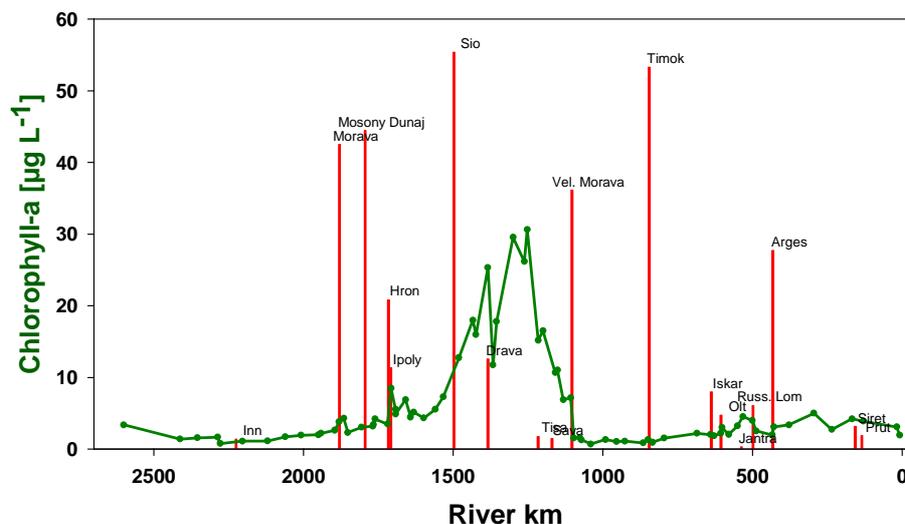


Fig. 6.. Longitudinal transect of chlorophyll a concentration (a proxy for algal biomass) along the River Danube from river km 2800 (in south Germany) to its delta in the Black Sea (km 0). Red columns indicate chlorophyll concentrations at the mouth of tributaries.

1.5.20 Evolution of asexuality in experimental rotifer populations

Individual research project (geplant)

Start date: 01.07.2007, scheduled end date: 30.06.2010

1.5.20.1 Summary:

Most multicellular organisms reproduce sexually, despite high costs associated with this reproductive mode (i.e., costs of males, costs of meiosis, costs associated with finding mates or mating itself). In the last three decades this "paradox of sex" has received considerable attention of both theoreticians and empiricists. Nonetheless, a single and universal explanation for the ubiquity of sex has remained elusive. In particular, explanations on the "paradox of sex" are challenged by the existence of organisms that frequently give rise to obligate asexual lineages. Such organisms should constantly face the danger of being displaced by their asexual variants. Hence, what holds these newly arising asexuals at bay?

In this project, the monogonont rotifer *Brachionus calyciflorus* shall be used as a model system to address this question. The *Brachionus* system is distinct from most previously used animal models, because it allows an experimental approach: Rotifers have generation times of a few days only, they reproduce fast, and transitions to obligate asexuality can occur on time scales of weeks. In addition, rotifers are small and populations of thousands can be easily kept in laboratory, which allows studying evolutionary changes on the population level. The proposed work addresses three main questions: (i) What is the general mechanism of origin of obligate asexuality in *Brachionus*? (ii) How fit are asexuals compared to their sexual relatives - under which conditions will they spread/decline? (iii) What is the significance of obligate asexuality in field populations of *Brachionus*? A variety of methods will be used to answer these questions: lab and field experiments, molecular techniques (DNA barcoding, microsatellites), karyological methods, and automated lab cultures (chemostats). The results are expected to yield new insights into the "paradox of sex", particularly in terms of the factors influencing the success/failure of new asexual lineages. In addition, the expected results will likely contribute to a better understanding of the origin of asexuality in bdelloid rotifers, a sister group of monogonont rotifers that has evolved in the absence of sex for millions of years.

1.5.20.2 Results from pilot studies:

Since January 2007 we have been using a chemostat system to select for obligate asexuality of *B. calyciflorus*. We obtained several transitions to obligate parthenogenesis in two different strains of *Brachionus calyciflorus* and made initial tests on the mechanism and adaptive significance of obligate asexuality. These two strains were originally obtained from John J. Gilbert (Dartmouth College USA) in December 2006, and are named the Georgia and Florida strain, respectively. Each strain was founded by one individual female. Also, both strains were initially cyclically parthenogenetic, i.e. they induced mixis at high population densities (C.P. Stelzer, personal observation). Shortly after these strains were established in our lab, we collected sexually produced resting eggs from both strains and stored them in the dark at 4°C (to prevent hatching). In the following months, several lines were established from these eggs.

In the Georgia strain, we observed two independent transitions to asexuality (Fig. 2). The first happened in the founder line (G1) and was noticed in March 2007 when it was cultured in a chemostat for the first time (see Fig. 2). During the first week of chemostat culture, we observed mictic females in the G1 line, however they completely disappeared

in the subsequent weeks. The G1 line remained completely asexual since then, despite multiple changes in the cultivation regime (batch culture, chemostat at different dilution rates). The second transition to asexuality happened in the G2 line, which was hatched from a resting egg produced by the G1 line in April 2007. Initially G2 was sexual and induced mixis at high population densities. However when it was reintroduced to chemostat culture after a period of batch culturing it lost sexual reproduction (week 26/2007 in Fig. 7).

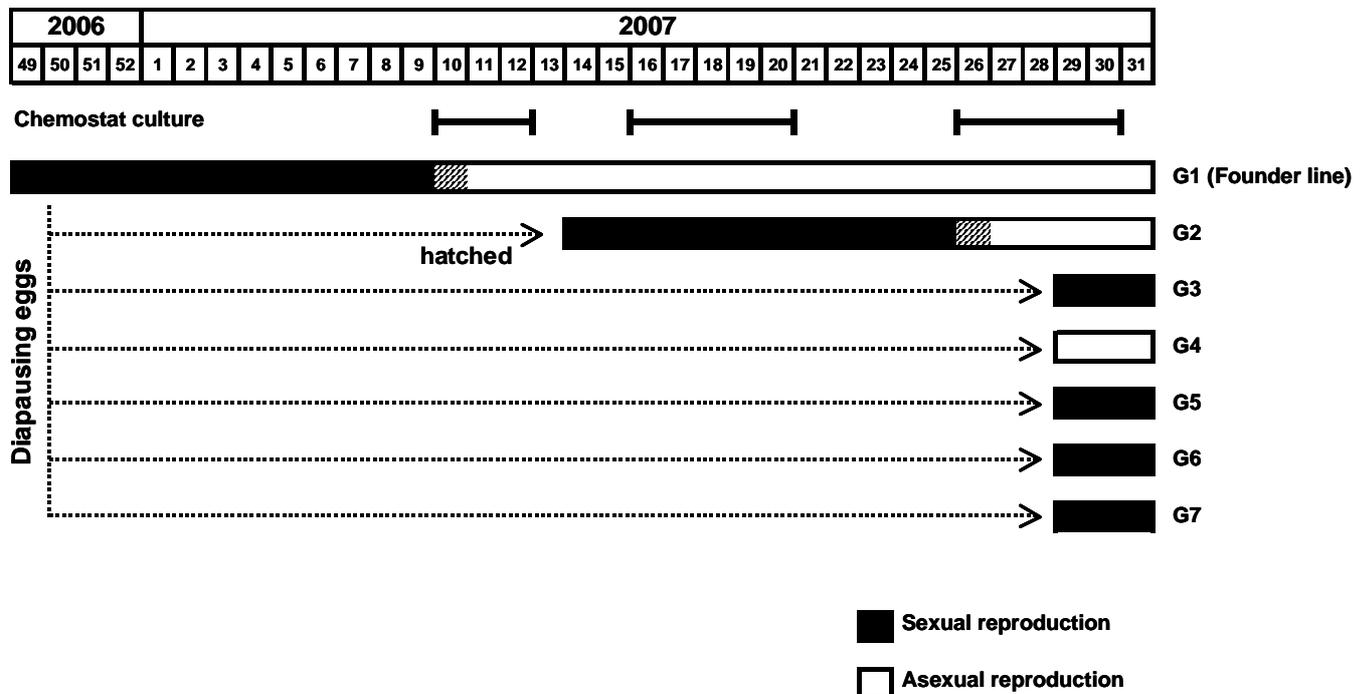


Fig. 7. Sexual (black) and asexual (white) lines derived from the "Georgia strain". Upper part of figure: Time axis with year and week numbers. Dotted arrows indicate lines that were established from diapausing eggs of the G1 line. Note the loss of sexual reproduction in the G1 line (week 10) and in the G2 line (week 26). Also note that the G4 line emerged asexually from a resting egg.

An interesting case is the G4 line, which hatched as an obligate asexual from a resting egg in week 29/2007 (Fig. 7). We have observed several of these "asexual hatchlings", both in the Georgia and Florida strain (data not shown). This suggests that the transition to obligate asex involves sexual recombination or other processes associated with resting egg formation. The loss of sex in the G1 and G2 line may also have been caused by emergence of obligate asexual hatchlings: resting eggs may have hatched in intermittent periods while the G1 and G2 line were kept in batch culture (transfer intervals of such cultures ~ 2 weeks). Under this scenario, the losses of sex in weeks 10 and 26/2007 were simply due to selection for these asexual hatchlings.

Which mechanisms might be responsible for the loss of mixis induction in asexual lines? In March 2007, we conducted an experiment to test two hypotheses about the proximate cause of obligate parthenogenesis in *Brachionus calyciflorus*: (1), that obligate parthenogens have lost the responsiveness to the sexual signal and (2), that obligate parthenogens have lost the ability to produce the sexual signal. I used pairwise cross-induction assays among three obligate parthenogenetic strains and two cyclically parthenogenetic (sexual) strains to test these hypotheses. For these experiments we used the Florida and Georgia strain (asexual lines only) and three distinct strains of *Brachionus calyciflorus*, called TX, NY, and EG respectively (Tab. 1). We found that obligate

parthenogens can induce sexual reproduction in sexual strains, but not vice versa (Tab. 1). This demonstrated that obligate parthenogens do still produce the chemical signal that induces sex, but have lost responsiveness to that signal. These results of this experiment have been recently published in the Journal of Evolutionary Biology.

Tab. 1. Mixis induction (% sexual offspring) among three asexual strains (GA, FL, NY) and two sexual strains (TX, EG) in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. NEG: untreated culture medium.

Induced clone	Conditioned medium					
	GA	FL	TX	EG	NY	NEG
GA	0	0	0	0	0	0
FL	0	0	0	0	0	0
TX	21	5	12	30	27	3
EG	55	40	40	43	37	4
NY	0	0	0	0	0	0

1.5.20.3 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Schmidt, Johanna	Forschungsassistentz	01.01.2007 bis 30.06.2010
Stelzer, Claus-Peter	Projektleitung	01.01.2007 bis 30.06.2010

1.5.20.4 Publications:

Stelzer, Claus-Peter (2007) Obligate asex in a rotifer and the role of sexual signals. Journal of Evolutionary Biology. [Stelzer, C. (AlleinautorIn)]

1.5.20.5 Lectures/Poster presentations:

Stelzer, Claus-Peter (24.08.2007) Fitness consequences of the transition to obligate asexuality in a cyclical parthenogen. Posterpräsentation: 11th Congress of The European Society for Evolutionary Biology, Uppsala/SWEDEN . [Stelzer, Claus-Peter]

Stelzer, Claus-Peter (22.09.2007) Fitness consequences of obligate asexuality in a cyclical parthenogen. Vortrag: 100. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Cologne/GERMANY . [Stelzer, Claus-Peter]

Stelzer, Claus-Peter (16.08.2007) Mechanisms of obligate asexuality in *Brachionus calyciflorus* (Monogononta, Rotifera). Vortrag: 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Montreal/CANADA . [Stelzer, Claus-Peter]

1.5.21 Comparative morphology and taxonomical relationships between living subterranean and fossil "Paratethyan" Ostracoda (Crustacea) from Central and Eastern Europe.

Individual research project (in progress)

Start date: 10.01.2005, scheduled end date: 31.12.2007

1.5.21.1 Summary:

The interest for comparative studies which allow to understand the ecology of Ancient lakes is actually high. Lake Pannon in Central Europe was in existence for about eight Mya during Upper Tertiary. Crustacean ostracods represents an optimal group to investigate evolutionary-ecological topics within a palaeolimnological context. We will use experience gained on the Recent subterranean ostracods for better understand how we can use fossil ostracods of the Pannonian facies in the western part of the Lake Pannon in order to reconstruct in a precise way the dynamics of the (palaeo)environment where they occur. Specifically, we will chose sampling sites for the Recent groundwater ostracods from the flood-plain of the Danube which display some similarities with the Panonian facies in some of our sampling areas. In pilot studies using geometric-morphometric analysis we noted that the carapace of several living subterranean ostracod species are ecologically and evolutionarily plastic, i.e. they display differences within populations located in contrasted environments and/or in geographically separated sites. The experience gained will be further used for fossil ostracods where the palaeoenvironment can not be easily reconstructed using common geologic and palaeoecologic information. Parallel to the morphologic diversity (disparity) we will describe also the taxonomic diversity of whole ostracod assemblages from various sampling sites. It is expected that combination of both approaches will offer a rich information on the palaeoenvironment and its changes during various time periods.

It is also foreseen to test the evolutionary ecological hypothesis that some of the ostracod groups were able to migrate from the western part of the Lake Pannon towards the eastern and southern parts of this basin and further on outside of this basin. This will allow to gain a new insights in the historical (palaeo)biogeography of the Danube Basin. Knowledge derived from living groundwater ostracods and groundwater ecology for palaeoecology and systematics of fossil Paratethyan ostracods represents a premiere within the micropalaeontology. Extended usage of geometric morphometrics for palaeoenvironmental reconstructions opens a new era in the research of the Pararatethys ostracods. It allows also to better define (i.e. in an objective and quantitative way) ostracod taxa which one can further integrate in other research projects.

1.5.21.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Danielopol, Dan Luca	Projektleitung	10.01.2005 bis 31.12.2007
Minati, Klaus	Projektmitarbeit	01.03.2005 bis 31.12.2007
Pichler, Maria	Forschungsassistenz	10.01.2005 bis 31.12.2007

1.5.21.3 Publications:

Gido, Zolt; Artheau, Malvina; Colin, Jean-Paul; Marmonier, Pierre; Austrian Academy of Sciences Institute for Limnology, et al. [...] (2007) Description of the stygobiotic crustacean *Dolekiella europaea* ge.nov. sp.nov. (Ostracoda, Limnocytheridae) from Southern France. *Vie Milieu*, Bd. 57, S. 109-116. [Danielopol, D. (HauptautorIn)]

Iepure, Sanda; Namiotko, Tadek; Danielopol, Dan Luca; Romanian Academy of Sciences Inst Speleol E Racovita,; University of Gdansk Inst Biol, et al. [...] (2007) Evolutionary and taxonomic aspects within the species group *Pseudocandona eremita* (Vejdovský) (Ostracoda, Candonidae). *Hydrobiologia*, Bd. 585, S. 159-180. [Danielopol, D. (KoautorIn)]

Danielopol, Dan Luca; Schiemer, Fritz; Austrian Academy of Sciences Institute of Limnology,; University of Vienna Dept Freshwater Ecol, (2007) Notes and news - In memoriam Heinz Löffler (1927-2006). *Crustaceana*, Bd. 80, S. 1013-1018. [Danielopol, D. (HauptautorIn)]

Danielopol, Dan Luca; Gross, Martin; Piller, Werner Eduard; Austrian Academy of Sciences Institute for Limnology,; Landesmuseum Joanneum Graz, et al. [...] (2007) Taxonomic diversity of Middle miocene ostracod assemblages – a useful tool for palaeoenvironmental characterisation of the Hainburg area (Vienna Basin). *Joannea Geologie und Paläontologie*, Bd. 9, S. 25-30. [Danielopol, D. (HauptautorIn)]

Pipik, Radovan; Minati, Klaus; Buttinger, Robert; Danielopol, Dan Luca; Bystrica, Slovakian Academy of Sciences Banska et al. [...] (2007) Morphological Disparity within Sarmatian and Pannonian Populations of Cyprideis from the Vienna Basin. *Joannea Geologie und Paläontologie*, Bd. 9, S. 87-88. [Danielopol, D. (KoautorIn); Minati, K. (KoautorIn)]

Schiemer, Fritz; Danielopol, Dan Luca; University of Vienna Faculty of Life Sciences Department of Freshwater Ecology,; Austrian Academy of Sciences Institute for Limnology, (2007) Heinz Löffler (1927-2006). *Hydrobiologia*, S. DOI 10.1007/s10750-007-9093-2. [Danielopol, D. (KoautorIn)]

1.5.22 Ostracod morphology and systematics on Mondsee (Austria) and Hamza Jezero (Poland) within the international project DecLakes, (European Scientific Foundation-Eurocore-Euroclimate Program). - DecLakes

Individual research project (in progress)

Start date: 01.02.2005, scheduled end date: 31.12.2007

1.5.22.1 Summary:

Succession of ostracod assemblages was analysed in a 14.8 m-long sediment core recovered from the deep zone of a pre-alpine lake Mondsee in Upper Austria. A total of 14 taxa were identified, of which all but one occur in the modern lake and are indicative of cool to temperate lacustrine environments. Overall, the preservation of the valves was good, which coupled with the presence of both adults and juveniles strongly suggests that the studied assemblages were autochthonous. Four major intervals of ostracod stratigraphy were recognised based on species composition, abundances and the modern autecological data. First interval (1480-1240 cm) is marked by very low abundances of

cold stenothermal species distinctive of early successional stages in post-glacial European lakes. These include: *Leucocythere mirabilis* followed by *Cytherissa lacustris* and a species resembling *Fabaeformiscandona rectangulata*, which at present is restricted to the Nearctic permafrost zone and so far was not reported from European Quaternary. Towards the end of this interval, other common inhabitants of the profundal zones of modern lakes appear in relatively equal proportions: *Fabaeformiscandona lozeki*, *Candona neglecta* and *C. candida*. Second interval (1240-980 cm), much richer in the ostracod remains, is characterised by increasing proportional representation of *C. neglecta* and *F. lozeki*, the loss of *F. cf. rectangulata*, gradual disappearance of *L. mirabilis* and appearance and increasing abundance of *Cypria ophtalmica*. This suggests progressive climatic amelioration and more stable aquatic environment, as indicated by the increased number of valves of the dominant species. In the third interval (980-840 cm) relative abundances of *C. neglecta* and *C. ophtalmica* increase, while *F. lozeki* and *C. lacustris* become almost extinct. However, this zone is most notable for a transient peak in *Fabaeformiscandona protzi*, a cold stenothermal species. The last interval (840-0 cm) is clearly dominated by *C. neglecta* associated with *C. ophtalmica*, having in the entire sequence of this zone nearly constant relative percentages and high counts, which reflects long, stable and equable conditions. Only in the uppermost sediment layers the total abundances and species diversity decline due to anthropogenic eutrophication. The preliminary data on the ostracod succession and the abundance of preserved valves presented here show the potential benefits of more detailed examination of ostracod valves in oxygen isotope studies aiming at more refined reconstruction of climatic variations.

1.5.22.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Danielopol, Dan Luca	Projektleitung	01.02.2005 bis 31.12.2007
Roidmayr, Gertraud	Forschungsassistentz	01.02.2005 bis 31.12.2007

1.5.22.3 Publications:

Gido, Zolt; Artheau, Malvina; Colin, Jean-Paul; Marmonier, Pierre; Austrian Academy of Sciences Institute for Limnology, et al. [...] (2007) Description of the stygobiotic crustacean <i>Dolekiella europaea</i> ge.nov. sp.nov. (Ostracoda, Limnocytheridae) from Southern France. <i>Vie Milieu</i> , Bd. 57, S. 109-116. [Danielopol, D. (HauptautorIn)]
Iepure, Sanda; Namiotko, Tadek; Danielopol, Dan Luca; Romanian Academy of Sciences Inst Speleol E Racovita,; University of Gdansk Inst Biol, et al. [...] (2007) Evolutionary and taxonomic aspects within the species group <i>Pseudocandona eremita</i> (Vejdovský) (Ostracoda, Candonidae). <i>Hydrobiologia</i> , Bd. 585, S. 159-180. [Danielopol, D. (KoautorIn)]
Pipik, Radovan; Minati, Klaus; Buttinger, Robert; Danielopol, Dan Luca; Bystrica, Slovakian Academy of Sciences Banska et al. [...] (2007) Morphological Disparity within Sarmatian and Pannonian Populations of Cyprideis from the Vienna Basin. <i>Joannea Geologie und Paläontologie</i> , Bd. 9, S. 87-88. [Danielopol, D. (KoautorIn); Minati, K. (KoautorIn)]
Danielopol, Dan Luca; Griebl, Christian; Gunatilaka, Amara; Hahn, Hans Jürgen; Gibert, Janine et al. [...] (2007) Incorporation of groundwater ecology in environmental policy. In: Quevauviller, Phillip (Hrsg.), <i>Groundwater Science and Policy</i> ; Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, S. 671-689. [Danielopol, D. (HauptautorIn)]

1.5.22.4 Lectures/Poster presentations:

Danielopol, Dan Luca; Knoblechner, Josef; Baltanás, Angel (15.06.2007) Between real and virtual ostracod valves, the contribution of the computer package Morphomatica 1.6 . Vortrag: Workshop "From Modern to Ancient Lakes" Limnological Institute, Austrian Academy of Sciences, Mondsee 14 – 15 June 2007./AUSTRIA. [Danielopol, Dan Luca]

1.5.23 Conservation of natural biological resources in Austria: Identification of indigenous whitefish species and extent of potential hybridization with a Baltic species

Individual research project (FWF – L229-B12, in progress)

Start date: 01.01.2006 scheduled end date: 31.12.2008

1.5.23.1 Summary:

The project will assess the extent and effects of introgression of an introduced whitefish species (*Coregonus maraena*, Bloch (1779), originating from the Baltic region) into two native whitefish species (*Coregonus renke* and *Coregonus atterensis*). We will determine if pure native populations of whitefish still exist in two Austrian lakes (Mondsee and Hallstättersee) representing valuable biological resources whose preservation and future exploitation would be beneficial to society. The analysis will be based on the study of mitochondrial DNA, as well as on methods using the microsatellite and the AFLP (amplified fragment length polymorphism) techniques. The interrelationship between genetic, morphological and ecological characteristics will be studied with special emphasis on the role of two contrasting mechanisms of spawning segregation (in time and space) for counteracting possible hybridization. The study will be complemented using experimental methods (crosses) to assess hybrid compatibility, additive genetic variance of selected traits, and to establish an F₂ generation for future mapping efforts of traits of interest (e.g. in aquaculture).

1.5.23.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Maier, Karl	Forschungsassistent	01.01.2006 bis 31.12.2008
Pamminger-Lahnsteiner, Barbara	Projektmitarbeit	01.01.2006 bis 31.12.2008
Wanzenböck, Josef	Projektleitung	01.01.2006 bis 31.12.2008

1.5.23.3 Lectures/Poster presentations:

Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (14.08.2007) Assessment of morphological characters, hybrid compatibility and viability of *Coregonus renke* Kottelat (1997) and *Coregonus maraena* Bloch (1779). Vortrag: SIL 2007 - 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Montreal/CANADA . [Pamminger-Lahnsteiner, Barbara]

1.5.24 The role of predation in population dynamics of 0+ whitefish (Coregonus sp.)

Dissertation (ongoing)

Start date: 01.12.2005, scheduled end date: 30.11.2007

1.5.24.1 Wissenschaftliche MitarbeiterInnen:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Finster, Martin	Projektmitarbeit	01.12.2005 bis 30.11.2007
Wanzenböck, Josef	Projektleitung	01.12.2005 bis 30.11.2007

1.5.24.2 Vorträge/Posterpräsentationen:

Finster, Martin; Wanzenböck, Josef (13.09.2007) Performance of two active sampling gears to follow density dynamics of 0+ European whitefish (*Coregonus* sp. L., 1758). Vortrag: FSMALR 2007 - Fish Stock Assessment Methods for Lakes and Reservoirs, Ceske Budejovice/CZECH REPUBLIC . [Finster, Martin; Wanzenböck, Josef]

Wanzenböck, Josef; Finster, Martin (15.09.2007) Assessment of juvenile whitefish densities (*Coregonus lavaretus* L.) in a deep prealpine lake using trawling and hydroacoustics. Vortrag: FSMALR 2007 - Fish Stock Assessment Methods for Lakes and Reservoirs, Ceske Budejovice/CZECH REPUBLIC . [Finster, Martin; Wanzenböck, Josef]

1.5.25 Seasonal climate impact on land-use development in the Austrian Alps during the last 4,000 years - A multi-proxy approach study

Individual research project (in progress)

Start date: 20.06.2006, scheduled end date: 30.06.2007

1.5.25.1 Summary:

CLIM-LAND is a multidisciplinary approach study. The overall goal of the study is to reconstruct seasonal climate variables in relation to Alpine land-use in the Austrian Alps during the last 4,000 years. For the quantitative inference of seasonal climatic variables we use diatom, chrysophyte-cyst and chironomid-based transfer functions, which were established from a lake calibration data set of the Austrian Central Alps. These transfer functions will be applied to the fossils of a sediment core from an Alpine lake (Oberer Landschitzsee), which is located slightly above the present tree-line at the southern slopes of the Niedere Tauern (Lungau). The seasonal climate pattern will be compared with plankton dynamics based on morphological and molecular surveys, catchment processes inferred from geochemical and mineralogical analyses, and with land-use impact indicated by pollen. Additionally, molecular biology should enable us to identify chrysophyte resting stages to species levels, thus getting way to recent species ecology and their use as bio-indicators.

1.5.25.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Schmidt, Roland	Projektleitung	20.06.2006 bis 30.06.2007

1.5.25.3 Publications:

Schmidt, Roland; Roth, Monika; Tessadri, Richard; Weckström, Kaarina; Institute for Limnology Austrian Academy of Sciences, et al. [...] (2007) Disentangling late-Holocene climate and land use impacts on an Austrian alpine lake using seasonal temperature anomalies, ice-cover, sedimentology, and pollen tracers. *Journal of Paleolimnology*. [Schmidt, R. (HauptautorIn)]

Schmidt, Roland; Kamenik, Christian, Roth, Monika; Institute for Limnology Austrian Academy of Sciences, (2007) Siliceous algae-based seasonal temperature inference and indicator pollen tracking ca. 4,000 years of climate/land use dependency in the southern Austrian Alps. *Journal of Paleolimnology* [Schmidt, R. (HauptautorIn)]

Kamenik, Christian, Szeroczynska, Krystina, Schmidt, Roland (2007) Relationships among recent Alpine Cladocera remains and their environment: implications for climate-change studies. *Hydrobiologia*

1.5.25.4 Lectures/Poster presentations:

Schmidt, Roland (16.04.2007) North Atlantic versus Mediterranean climate forcing in the southern Austrian Alps during the last 4,000 years. Posterpräsentation: European Geosciences Union General Assembly (EGU), Vienna/AUSTRIA. [Schmidt, Roland]

Schmidt, Roland (13.07.2007) Holocene climate-driven environmental changes in an Austrian Alpine lake inferred from sedimentological and calibrated biological proxies. Vortrag: 4th International Limnogeology Congress (ILIC 2007, Barcelona), Barcelona/SPAIN. [Schmidt, Roland]

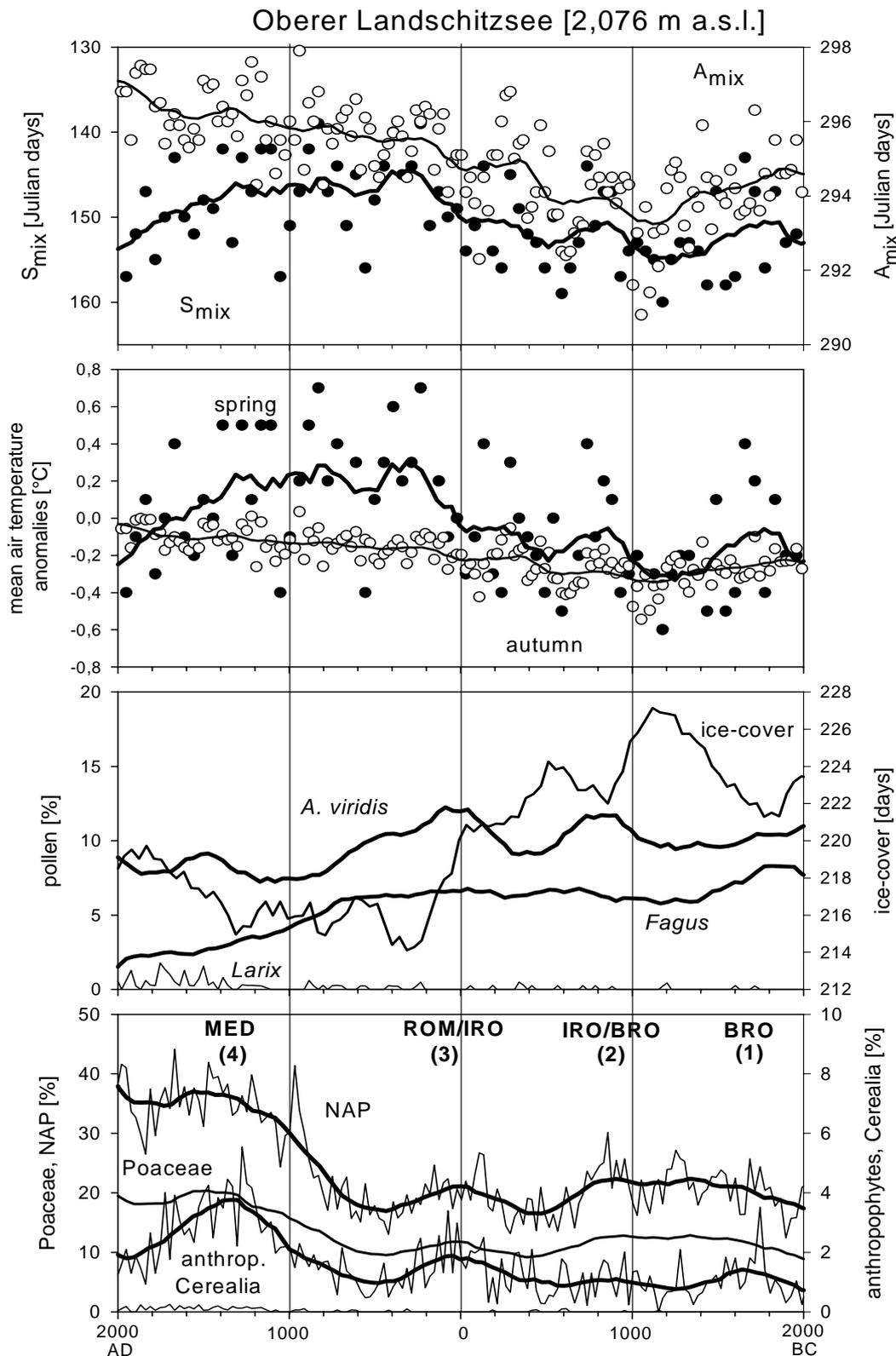


Fig. 8. Significant correlation between chrysophyte cyst inferred spring mixing and diatom inferred autumn lake mixing dates during the two millennia before Christ (BC), which started to decouple during Medieval times; mean spring air temperature anomalies converted from mixing dates during Roman and Medieval times were close to present; the four land-use phases (BRO=Bronze, IRO=Iron Age, ROM=Roman; MED=Medieval) are separated by cold periods with enhanced ice-cover; additionally some pollen tracers (green alder for snow-pack, beech for humid conditions, anthropophytes, grass, and cereals for anthropogenic impact) are indicated.

1.5.26 Late-Pleniglacial climatic and environmental evolution in the southern prealpine lowland: a multi-proxy and quantitative lake sediment core study (Längsee, Austria)(FWF-P18595-B17)

Individual research project (FWF – P18595-B17, in progress)

Start date: 01.01.2006 scheduled end date: 31.12.2008

A multi-proxy palaeolimnological approach will be applied to a Late-Pleniglacial sediment core section of Längsee. The lake is located in the southern pre-Alpine lowland of Austria close to the endmoraines of the Last Glacial Maximum (LGM). Längsee offers the unique opportunity of climate reconstruction for a time-window with lacking quantitative climate inference in the Alps. For this reason we combine novel diatom- and chrysophyte cyst-based transfer functions for quantitative seasonal climate inference from Alpine lake calibration data sets with ostracod stable oxygen isotope measurement that is another strong climate proxy. In the case that solar forcing mechanisms trigger major climate oscillations, they should be contemporaneous at different sites. Hence, we compare the biogenic stable oxygen isotope curves from the study site with the Greenland ice-core oxygen isotope records. If tephras are present, we will also use them for synchronisation of climate on a larger scale. Additionally we use pollen, geochemical, and mineralogical analyses in order to study the impact of climate on ecosystems under the aspects of rapid climate changes and extremes, and seasonal climate patterns.

1.5.26.1 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Huber, Kerstin	Projektmitarbeit	01.05.2006 bis 31.12.2008
Schmidt, Jutta	Forschungsassistentz	01.02.2006 bis 31.01.2008
Schmidt, Roland	Projektleitung	01.01.2006 bis 31.12.2008

1.5.26.2 Lectures/Poster presentations:

Huber, Kerstin; Klee, Rolf; Schmidt, Roland (14.06.2007) Climatic and environmental reconstructions of the past 20,000 years with the example of two Austrian lakes. Vortrag: Palaeoecology Workshop: From modern to ancient lakes, Mondsee/AUSTRIA. [Schmidt, Roland]
Huber, Kerstin; Klee, Rolf; Schmidt, Roland (24.03.2007) Distribution and morphological variability of Cyclotella-taxa in the late glacial Längsee (Austria). Vortrag: 1st Central European Diatom Meeting (1st CE-Diatom), Berlin/GERMANY. [Huber, Kerstin; Schmidt, Roland]

1.5.27 International Post-Graduate Training Programmes in Limnology - IPGL

Individual research project (in progress)

Start date: 01.01.2005, scheduled end date: 31.12.2007

1.5.27.1 Summary:

IPGL is a hub for international post-graduated training, research and networking in the area of limnology and freshwater ecosystem management. IPGL organizes several training programmes and acts as interface platform linking research institutions world-wide. IPGL programmes aim to support research capacity enhancement processes for achieving the Millennium Development Goals. More than 400 young scientists have attended training courses organized by IPGL. IPGL courses are offering practical training on field-work, laboratory methods and data analyses – all the way from sampling-design to data interpretation. Practical research training can be done in small groups only, thus the number of course participants is limited to 20 persons maximum.

The quality of IPGL courses is based on the excellent collaboration of many renowned research institutions in Austria and several institutions in the world. As a result of this cooperation, IPGL courses are held at several locations and centres of excellence in Austria, such as: Mondsee (Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology), Scharfling (Institute for Freshwater Ecology and Fisheries Biology) and Vienna (University Vienna, Vienna University of Technology, BOKU University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna). IPGL modules are also held in Trebon, Czech Republic, hosted by the Czech Academy of Sciences (Institute of Botany and Institute of Landscape Ecology) and at Egerton University and Sagana Fish Farm in Kenya.

The international MSc programme in Limnology and Wetland Ecosystems is a truly joint programme with UNESCO-IHE Institute for Water Education located in Delft, Netherlands (link to: <http://www.uneso-ihe.org>).

1.5.27.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Wanzenböck, Sabine	Projektmanagement	01.01.2005 bis 31.12.2007
Winkler, Gerold	Projektleitung	01.01.2005 bis 31.12.2007

1.5.27.3 Publications:

Lakew Haile, Aschalew (2007) Applicability of Bioassessment methods using benthic macroinvertebrates to evaluate the ecological status of highland streams and rivers in Ethiopia. Diplomarbeit, UNESCO-IHE, Institute for Water Education, Delft. [Winkler, G. (RedakteurIn)]
Kaddumukasa, Martha (2007) Revealing Potential Trophic Links Between Polynucleobacter Bacteria and Mosquito Larvae Inhabiting Freshwater Systems in Uganda., UNESCO-IHE, Institute for Water Education, Delft. [Winkler, G. (RedakteurIn)]
Goshu, Goraw (2007) Evaluation of Microbial Faecal Indicators and Quantifying the respective Level of Pollution in Ground and Surface Water of Bahirdar and Peri-Urban Areas, Ethiopia., UNESCO-IHE, Institute for Water Education, Delft. [Winkler, G. (RedakteurIn)]
Mathooko, J.M.; Kitaka, N.; Omondi, S.O.; Winkler, G. (15.02.2007) Bridging Research, Technology and Development: Sustainable Water Resource Management in Eastern Africa.; Mombasa-Ukunda, S. 1-11 . [Winkler, G. (KoautorIn)]

1.5.27.4 Lectures/Poster presentations:

Winkler, Gerold (19.11.2007) Ökologie der Entwicklungsländer, Ökologie & Management von Binnengewässern in Entwicklungsländern: Herausforderung für Wissenschaft & Gesellschaft. Vortrag: Vorlesungen Universität Wien, Wien/AUSTRIA. [Winkler, Gerold]
Winkler, Gerold (24.04.2007) Roundtable "Austria Movin" - Plattform für österreichische Akteure im Bereich "Natural Resource Management" und Zusammenarbeit mit Entwicklungsländern. Vortrag: Workshop (Universität für Bodenkultur), Wien/AUSTRIA. [Winkler, Gerold]
Winkler, Gerold (28.11.2007) Planungsworkshop BOMOSA Aktivitäten für 2008, "Environmental Impact Studies". Vortrag: Environmental Impact Studies, Mondsee/AUSTRIA. [Winkler, Gerold]

1.5.28 Effects of cage fish farming systems on phytoplankton and water quality in small ponds of East Africa

Dissertationsprojekt (in progress)

Start date: 01.05.2007, scheduled end date: 01.10.2010

1.5.28.1 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Kurmayer, Rainer	Projektmitarbeit	01.10.2007 bis 30.09.2010
Winkler, Gerold	Projektleitung	01.10.2007 bis 30.09.2010
Straubinger, Nadja	Dissertantin	01.05.2007 bis 30.09.2009

1.5.29 Mombasa Workshop – Bridging Research, Technology & Development

Coordination of a research network (ongoing)

Start date: 01.08.2006, scheduled end date: 31.12.2007

1.5.29.1 Wissenschaftliche MitarbeiterInnen:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Wanzenböck, Sabine	Kontaktperson	01.08.2006 bis 21.12.2009
Winkler, Gerold	Projektleitung	01.08.2006 bis 31.12.2007

1.5.29.2 Publikationen:

Mathooko, J.M.; Kitaka, N.; Omondi, S.O.; Winkler, G. (15.02.2007) Bridging Research, Technology and Development: Sustainable Water Resource Management in Eastern Africa.; Mombasa-Ukunda, S. 1-11 . [Winkler, G. (KoautorIn)]

Forschungsprojekte mit Fördercharakter

1.5.30 Integrating BOMOSA cage fish farming system in reservoirs, ponds and temporary water bodies in Eastern Africa

EU-Projekt, FP-6, INCO-Dev 032103 (in progress)

Start date: 01.10.2006, scheduled end date: 30.09.2009

1.5.30.1 Summary:

BOMOSA schemes are pioneering small-scale fish farming in Kenya, Ethiopia and Uganda by establishing rural aquaculture networks, coordinated in a "hub and plot" system. A BOMOSA scheme comprises of a central fish farm (hub), providing fish fingerlings and expertise to rural fish farming sites (plots). A BOMOSA plot consists of suitable water body, fish cages, pier construction, locally available fish feeds, feed dispensers and motivated fish farmers. The net-like BOMOSA cages can be folded, easily transported and handled by two persons without mechanical aid. BOMOSA schemes can be implemented along a wide range of water bodies such as reservoirs, ponds, ditches, irrigation channels and naturally occurring temporary water bodies formed during the rainy season. BOMOSA is investigating new standards in low protein fish feeds from locally available agricultural by-products for the economical integration of aquaculture with agriculture. Farmers are trained to rear the fish in cages in their "plots", harvesting them for fresh consumption as high protein dietary supplement and/or selling fish for generating additional income for subsistence farmers. Innovative research performed by an international consortium is optimizing fish production, minimizing environmental impacts, assessing the regional potential of the BOMOSA approach and maximizing socio-economic outputs for rural communities in Eastern Africa

BOMOSA advantages

- **Simplicity:** Because of the localized operations and consumption, problems of transport and refrigeration are minimized. Application of cheap, simple and easy to handle technologies.
- **Flexibility:** A wide range of formerly under-utilized water bodies can be used for aquaculture. Fish can be harvested on-demand and for both local consumption and additional income generation.
- **Sustainability through utilization of local resources:** local human resources, local water bodies, local agricultural by-products as a feed resource, environmental impacts monitored by water users.
- **Phasing-out high protein feeds:** BOMOSA is investigating new standards in low protein feeds from locally available agricultural by-products and thus is adopting up a mainstream idea of moving away from "exotic" and expensive high protein feeds.
- **Socio-economic impact:** BOMOSA operations are set-up and run by the rural communities in which they are established. This "local ownership" leads to "local responsibility" and "local benefits".
- **Rural networking in aquaculture:** Small-scale aquaculture networks (coordinated in a hub and plot system) such as BOMOSA have the potential to fill the mid-range area between large-scale fish farms and subsistence inland aquaculture.

More information available at: www.bomosa.org

1.5.30.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Kurmayer, Rainer	Projektmitarbeit	01.10.2006 bis 30.09.2009
Straubinger, Nadja	Projektmitarbeit	01.05.2007 bis ?
Winkler, Gerold	Projektleitung	01.10.2006 bis 30.09.2009

1.5.31 BRIDGING RESEARCH, TECHNOLOGY AND DEVELOPMENT: SUSTAINABLE WATER RESOURCE MANAGEMENT IN EASTERN AFRICA

IPGL project, ADA & AWF sponsored, Project duration: 01.07.2006-30.06.2008

1.5.31.1 Summary:

The overall goal of the workshop and post-workshop events is to improve the impact of research and technology towards efficient support of public development efforts in Eastern Africa, within the thematic area of aquatic ecosystem resource management. The project aims to achieve the overall goals by initiating and supporting a communication and cooperation process of various stakeholder groups. Interlinkages between knowledge producers, knowledge users and policy makers are fostering participatory innovation-oriented networking. This approach provides the conceptual basis for defining future research priorities/policies, improving both the livelihood of people and targeting sustainable environmental management strategies in order to provide resources and options for future generations. The workshop report emphasizes future research priorities and knowledge dissemination approaches refined for application and improvement of the livelihood of the people in the region.

1.5.31.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Wanzenböck, Sabine	Kontaktperson	01.07.2006 bis 31.12.2007
Winkler, Gerold	Projektleitung	01.07.2006 bis 30.06.2008

1.5.32 Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application - IRESA

Forschungsprojekt mit Fördercharakter (in progress)

Start date: 01.06.2005, scheduled end date: 31.03.2008

1.5.32.1 Summary:

The island of Sri Lanka (6-10° N, 80-82°E) has been described as an ecologically very diverse region in the Indo-Pacific. It is drained by 103 river systems and a multitude of man-made lakes, both ancient and recent. Although ecological research on reservoirs started early, rivers and streams were almost ignored in ecological studies. There has been nearly no adequate attention to functional relationship of the aquatic fauna and to the dynamics of their environment. Up to now, basic research in running water ecology and especially its application at scientific, social and administrative level is only fragmentarily developed. Especially during the last decades, man has been interfering intensively through overexploitation, introduction of exotic species and habitat alterations. Nevertheless, running water systems still display high endemism and biodiversity of the aquatic fauna in many areas. Like for other developing countries, Sri Lanka needs strategies to develop awareness about natural resources together with a wise management between human use and conservation issues in running waters.

The main objectives of IRESA are fourfold, it is to develop a) the installation of river ecology at scientific level, b) a nucleus for follow-up research and education in river ecology, c) a network between scientists and end-users involved in freshwater affairs, and d) awareness of endangerment and conservation of natural resources in freshwater policies. IRESA is planned as a cooperation between the University of Innsbruck (Austria), the University of Kelaniya (Sri Lanka), and the Institute for Limnology of the Austrian Academy of Sciences (Mondsee). This research partnership shall lead to long-term, sustainable cooperation between the institutions in Austria and Sri Lanka and will add important issues to already existing activities, like the ASEA-UNINET between Austrian and S.E. Asian universities (where currently Sri Lanka is not included). Specifically, IRESA will facilitate scientific exchange between universities in river ecology, encourage student exchange between Sri Lanka and Austria, initiate seminars and workshops at scientific and public levels.

The major milestones of IRESA are

- a) PILOT RIVER ECOLOGY STUDY - Investigation of tropical river ecosystems with a special focus on explaining trophic interactions in relation to catchment properties (land use, catchment and riparian vegetation, riverine landscape), environmental dynamics and human impacts.
- b) RIVER ECOLOGY and NETWORKING – Establishing river ecology at the University of Kelaniya; development of a platform for science and education
- c) EDUCATION OF THE PUBLIC – Workshops for presentation of results with the information and implementation at the community level
IRESA will provide important results to help to understand the functioning of running water ecosystems, enabling the human population to develop their natural resources for maintaining a sustainable economy, through development of ecotourism (involving fish-watching) and sustainable exploitation of ornamental fish for export market.

IRESA is designed to strengthen education, local training programs and research capacities in river ecology. Scientific and logistic support will be provided for setting up a river laboratory at the University of Kelaniya which will be the essential infrastructure for

further education and research in river ecology. The proposed cooperation links research institutions and the initiated network to existing development cooperation in Africa and S.E. Asia.

1.5.32.2 Research personnel:

Name	Funktion	Funktion: Zeitraum
Leichtfried, Maria	Projektmitarbeit	01.06.2005 bis 31.03.2008

1.5.32.3 Lectures/Poster presentations:

LEICHTFRIED, Maria (14.05.2007) Capacity Building through Projects and Education. Vortrag: KEF R4D Roundtable, Innsbruck/AUSTRIA.
FÜREDER, Leopold1; WELIANGE, Wasantha Sena2; LEICHTFRIED, Maria3; AMARASINGHE, Upali S.4 (12.07.2007) The IRESA Project: Catchment properties, habitat conditions and functional organization of key species in tropical rivers. Vortrag: SEFS-5 Symposium for European Freshwater Sciences, Palermo/ITALY. [Leichtfried, Maria]
LEICHTFRIED, Maria1; FÜREDER, Leopold2; WELIANGE, Wasantha Sena3; AMARASINGHE, Upali S.4; (12.07.2007) The IRESA Project: Bed – sediments what role they play in tropical low order stream ecosystems in dry and wet zones?. Vortrag: SEFS-5 Symposium for European Freshwater Sciences, Palermo/ITALY. [Leichtfried, Maria]
WELIANGE, Wasantha Sena1; PRASANTHA, P.P.Ajith2; AMARASINGHE, Upali S.3; LEICHTFRIED, Maria4; FÜREDER, Leopold5 (12.07.2007) The IRESA Project: Can colonization success of Chitala ornata, an accidentally introduced exotic fish species, be predicted from the body-shape indices of stream fish assemblages in Sri Lanka?. Vortrag: SEFS-5 Symposium for European Freshwater Sciences, Palermo/ITALY. [Leichtfried, Maria]
LEICHTFRIED, Maria1; FÜREDER, Leopold2; WELIANGE, Wasantha Sena3; AMARASINGHE, Upali S.4 (17.08.2007) The IRESA Project in Sri Lanka: Streambed Sediments – what Role they Play in Low Order Stream Ecosystems of Tropical and Temperate Zones?. Vortrag: 30th SIL Congress of the Int. Ass. Of Limnology, Montreal /CANADA. [Leichtfried, Maria]

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

Humanpotenzial (Kapazitäten, Qualifikationen, Altersstruktur, Projektleitungsfunktionen und Weiterbildung)

1. Mitarbeiter(innen)			
	gesamt	m	w
Anzahl der Mitarbeiter(innen)	46	27	19
Anzahl der Mitarbeiter(innen) im Durchschnitt	40.96	24.04	16.92
Vollzeitäquivalente	36.96	21.69	15.27
davon			
· fremdfinanziert	10.26	5.13	5.13
· eigenfinanziert	26.7	16.91	9.79
· befristet	9.5	4.75	4.75
· unbefristet	17.2	12.42	4.78
· wissenschaftlich	19.05	13.72	5.33
· administrativ, technisch	16.91	7.61	9.3
· sonstige	1	0	1

1. Liste	
A) Leiter	
Weisse, Thomas (m) (VZÄ: 100%)	
DirektorIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert	
B) aktive angestellte Mitarbeiter(innen)	
Auinger, Barbara (w) (VZÄ: 75%)	
MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 75% ; fremdfinanziert; befristet	
Boenigk, Jens (m) (VZÄ: 100%)	
MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert	
Brandt, Ulrike (w) (VZÄ: 100%)	
MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert; befristet	
Christiansen, Guntram (m) (VZÄ: 100%)	
MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; fremdfinanziert; befristet	
Danielopol, Adriana-Paula (w) (VZÄ: 85%)	
MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 85% ; eigenfinanziert; befristet	
Danielopol, Dan Luca (m) (VZÄ: 100%)	
MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert; befristet	
Dokulil, Martin (m) (VZÄ: 100%)	
MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert	
Eisl, Liselotte (w) (VZÄ: 100%)	

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

1. Liste

B) aktive angestellte Mitarbeiter(innen)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Finster, Martin (m) (VZÄ: 41%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-30.09.2007 (273 Tage) mit 55% ; eigenfinanziert; befristet

Gradl, Ingrid (w) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Hahn, Martin (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Höllerer, Hannes (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Huber, Kerstin (w) (VZÄ: 75%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 75% ; fremdfinanziert; befristet

Humpesch, Uwe (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Jezbera, Jan (m) (VZÄ: 42%)

MitarbeiterIn: 01.08.2007-31.12.2007 (153 Tage) mit 100% ; fremdfinanziert; befristet

Jezberova, Jitka (w) (VZÄ: 42%)

MitarbeiterIn: 01.08.2007-31.12.2007 (153 Tage) mit 100% ; fremdfinanziert; befristet

Jost, Steffen (m) (VZÄ: 73%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 73% ; fremdfinanziert; befristet

Knoblechner, Josef (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; fremdfinanziert; befristet

Knoll, Johann (m) (VZÄ: 50%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 50% ; eigenfinanziert

Kurmayer, Rainer (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Leichtfried, Maria (w) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Maier, Karl (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert; befristet

Mayr, Stefan (m) (VZÄ: 18%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-15.05.2007 (135 Tage) mit 50% ; eigenfinanziert; befristet

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

1. Liste

B) aktive angestellte Mitarbeiter(innen)

Mayrhofer, Kurt (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Minati, Klaus (m) (VZÄ: 75%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 75% ; fremdfinanziert; befristet

Moser, Michael (m) (VZÄ: 31%)

MitarbeiterIn: 01.08.2007-31.12.2007 (153 Tage) mit 75% ; fremdfinanziert; befristet

Namiotko, Tadeusz (m) (VZÄ: 25%)

MitarbeiterIn: 01.07.2007-30.09.2007 (92 Tage) mit 100% ; fremdfinanziert; befristet

Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (w) (VZÄ: 70%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 70% ; fremdfinanziert; befristet

Pfandl, Karin (w) (VZÄ: 6%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.01.2007 (31 Tage) mit 70% ; eigenfinanziert; befristet

Pichler, Maria (w) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert; befristet

Ployer, Harald (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Roidmayr, Gertraud (w) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; fremdfinanziert; befristet

Scheffel, Ulrike (w) (VZÄ: 51%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-30.04.2007 (120 Tage) mit 75% ; fremdfinanziert; befristet

MitarbeiterIn: 01.06.2007-17.09.2007 (109 Tage) mit 15% ; fremdfinanziert; befristet

MitarbeiterIn: 18.09.2007-31.12.2007 (105 Tage) mit 75% ; fremdfinanziert; befristet

Schmidt, Johanna (w) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert; befristet

Schmidt, Jutta (w) (VZÄ: 50%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 50% ; fremdfinanziert; befristet

Schmidt, Roland (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Stadler, Peter (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Steinkogler, Hildegard (w) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Stelzer, Claus-Peter (m) (VZÄ: 100%)

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

1. Liste

B) aktive angestellte Mitarbeiter(innen)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert; befristet

Straubinger, Nadja (w) (VZÄ: 50%)

MitarbeiterIn: 01.05.2007-09.05.2007 (9 Tage) mit 80% ; fremdfinanziert; befristet

MitarbeiterIn: 10.05.2007-31.12.2007 (236 Tage) mit 75% ; fremdfinanziert; befristet

Wanzenböck, Josef (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; eigenfinanziert

Wanzenböck, Sabine (w) (VZÄ: 70%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 70% ; fremdfinanziert

Werndl, Michael (m) (VZÄ: 67%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.08.2007 (243 Tage) mit 85% ; fremdfinanziert; befristet

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.08.2007 (243 Tage) mit 15% ; fremdfinanziert; befristet

Wiedroither, Anneliese (w) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 25% ; eigenfinanziert; befristet

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 75% ; fremdfinanziert; befristet

Winkler, Gerold (m) (VZÄ: 100%)

MitarbeiterIn: 01.01.2007-31.12.2007 (365 Tage) mit 100% ; fremdfinanziert

C) weitere Mitarbeiter(innen)

Buttinger, Robert (m)

StudentIn/PraktikantIn: 01.01.2007-31.12.2007

Degefu Abera, Fasil (m)

DiplomandIn: 30.09.2007-31.12.2007

Goshu Yemer, Goraw (m)

DiplomandIn: 01.01.2007-20.04.2007

Kaddumukasa, Martha (w)

DiplomandIn: 01.01.2007-20.04.2007

Lakew Haile, Aschalew (m)

DiplomandIn: 01.01.2007-31.12.2007

Lopes Dos Santos Monteiro, Raquel Alfama (w)

DiplomandIn: 30.09.2007-31.12.2007

Molitor, Carole (w)

DissertantIn: 01.01.2007-30.09.2007

Mukama, Shelard Ch. (m)

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

1. Liste

C) weitere Mitarbeiter(innen)

DiplomandIn: 30.09.2007-31.12.2007

Mwiche, Monica M. (w)

DiplomandIn: 30.09.2007-31.12.2007

Nalwanga, Rosemary (w)

DiplomandIn: 30.09.2007-31.12.2007

Okello, William (m)

DissertantIn: 01.01.2007-31.12.2007

Ostermaier, Veronika (w)

DiplomandIn: 01.01.2007-31.12.2007

Schärfl, Sophie (w)

DiplomandIn: 15.10.2007-31.12.2007

Scheuerl, Thomas (m)

DiplomandIn: 15.03.2007-31.12.2007

Schober, Eva Maria (w)

DissertantIn: 01.01.2007-31.12.2007

Schöttl, Patrick (m)

StudentIn/PraktikantIn: 01.10.2007-31.12.2007

2. Nachwuchswissenschaftler(innen) und Qualifizierungen I: Nachwuchswissenschaftler(innen)

	gesamt	m	w
Anzahl der Nachwuchswissenschaftler(innen)	18	8	10
· Diplomand(inn)en	4	3	1
· Dissertant(inn)en, Junior Scientists	12	4	8
· Postdocs	2	1	1
· Junior Group Leader o.ä.	0		
Finanzierung			
· fremdfinanziert	15	6	9
· eigenfinanziert	3	2	1

2. Liste

Finster, Martin (m); Junior Scientist (); eigenfinanziert

Huber, Kerstin (w); Junior Scientist (); fremdfinanziert

Jezbera, Jan (m); Post Doc (); fremdfinanziert

Jezberova, Jitka (w); Post Doc (); fremdfinanziert

Jost, Steffen (m); Junior Scientist (); fremdfinanziert

Mayr, Stefan (m); Diplomand (); eigenfinanziert

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

2. Liste

Auinger, Barbara (w); Junior Scientist (); fremdfinanziert
 Molitor, Carole (w); Dissertant (); fremdfinanziert
 Moser, Michael (m); Junior Scientist (); fremdfinanziert
 Okello, William (m); Dissertant (); fremdfinanziert
 Ostermaier, Veronika (w); Dissertant (); fremdfinanziert
 Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (w); Dissertant (); fremdfinanziert
 Pfandl, Karin (w); Junior Scientist (); eigenfinanziert
 Schärfl, Sophie (w); Diplomand (); fremdfinanziert
 Scheuerl, Thomas (m); Diplomand (); fremdfinanziert
 Schober, Eva Maria (w); Dissertant (); fremdfinanziert
 Schöttl, Patrick (m); Diplomand (); fremdfinanziert
 Straubinger, Nadja (w); Dissertant (); fremdfinanziert

3. Nachwuchswissenschaftler(innen) und Qualifizierungen II: promovierte wissenschaftliche Mitarbeiter(innen) unter 33

	gesamt	m	w
Promovierte wissenschaftliche Mitarbeiter(innen) unter 33 Jahren	2	1	1

3. Liste

Jezbera, Jan (m, NW)
 Jezberova, Jitka (w, NW)

4. Nachwuchswissenschaftler(innen) und Qualifizierungen III: Diplomabschlüsse, Promotionen und Habilitationen

	gesamt	m	w
Ausbildungs-/Qualifizierungsabschlüsse in Verbindung mit einem Forschungsprojekt:	3	2	1
- Habilitation	1	1	
- Diplomarbeit	2	1	1

4. Liste

Kurmayer, Rainer (m), 04.05.2007, Habilitation: "Kurmayer Rainer"
 Mayr, Stefan (m, NW), 15.02.2007, Diplomarbeit: "Mayr - Perlfisch"
 Ostermaier, Veronika (w, NW), 15.06.2007, Diplomarbeit: "Saisonale Abundanzmuster von toxischen Cyanobakterien"

5. Wissenschaftliche Mitarbeiter(innen) in Projektleitungsfunktion

	gesamt	m	w
Anzahl der wissenschaften Mitarbeiter(innen) mit Leitungsfunktionen in Forschungsprojekten (zum Stichtag Ultimo)	10	10	
- eigenfinanziert	8	8	
- fremdfinanziert	2	2	
davon unbefristete Anstellungsverhältnisse	6	6	

5. Liste

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

5. Liste

Boenigk, Jens (m; eigenfinanziert; unbefristet)

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Chrysophyte diversity and encystment pattern in alpine lakes: Merging molecular microbiology, recent and palaeoecology in C32#; Projektleitung; 15.12.2005 - 14.12.2008
(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Habitat specificity of flagellates and ecophysiological significance of microdiversity; Projektleitung; 01.01.2006 - 31.12.2008
(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Niche separation and coexistence of chrysophytes in an alpine gradient; Projektleitung; 01.04.2007 - 31.03.2010
(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Seasonal climate impact on land-use development in the Austrian Alps during the last 4,000 years - A multi-proxy approach study; Projektleitung; 01.06.2006 -

Christiansen, Guntram (m; fremdfinanziert; befristet)

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Use of cyanobacteria for the production of ethanol; Projektleitung; 01.09.2007 - 31.03.2008

Danielopol, Dan Luca (m; eigenfinanziert; befristet)

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Comparative morphology and taxonomical relationships between living subterranean and fossil "Paratethyan" Ostracoda (Crustacea) from Central and Eastern Europe.; Projektleitung; 10.01.2005 - 31.12.2007
(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Ostracod morphology and systematics on Mondsee (Austria) and Hamza Jezero (Poland) within the international project Declakes, (European Scientific Foundation-Eurocore-Euroclimate Program).; Projektleitung; 01.02.2005 - 31.12.2007

Hahn, Martin (m; eigenfinanziert; unbefristet)

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Ecological and phylogenetic comparison of bacterial populations inhabiting Antarctic and European lakes; Projektleitung; 01.05.2007 - 31.12.2008
(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Eco-physiological characteristics of two important groups of Betaproteobacteria abundant in freshwater bacterioplankton; Projektleitung; 01.03.2007 - 31.12.2008
(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Genetic and ecological diversity of a narrow phylogenetic group of abundant freshwater bacteria. (FWF19853); Projektleitung; 01.03.2007 - 28.02.2009

Kurmayer, Rainer (m; eigenfinanziert; unbefristet)

(Dissertationsprojekt): Dissertation: Effects of cage fish farming systems on phytoplankton and water quality in small ponds of East Africa; Projektleitung; 01.05.2007 - 30.09.2009
(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Microevolution of toxin synthesis in cyanobacteria - FWF18185; Projektleitung; 01.07.2005 - 31.12.2007
(Dissertationsprojekt): Molecular and chemical characterisation of toxic cyanobacteria in Ugandan freshwater; Projektleitung; 15.06.2006 - 14.06.2009
(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Use of cyanobacteria for the production of ethanol; Projektmanagement; 01.09.2007 - 31.03.2008

Schmidt, Roland (m; eigenfinanziert; unbefristet)

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Late-Pleniglacial climatic and environmental evolution in the southern prealpine lowland: a multi-proxy and quantitative lake sediment core study (Längsee, Austria)(FWF-P18595-B17); Projektleitung; 01.01.2006 - 31.12.2008

Stelzer, Claus-Peter (m; eigenfinanziert; befristet)

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Obligate asex in rotifers: Pilot studies; Projektleitung; 01.01.2007 -

Wanzenböck, Josef (m; eigenfinanziert; unbefristet)

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Conservation of natural biological resources in Austria: Identification of indigenous whitefish species and extent of potential hybridization with a Baltic species; Projektleitung; 01.01.2006 - 31.12.2008

Weisse, Thomas (m; eigenfinanziert; unbefristet)

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Patterns and processes of adaptation and tolerance to low pH of freshwater plankton; Projektleitung; 01.01.2007 - 31.03.2011
(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Allgemeine Limnologische Grundlagenforschung; Projektleitung; 01.04.1998 - 31.03.2010

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

5. Liste

Weisse, Thomas (m; eigenfinanziert; unbefristet)

Winkler, Gerold (m; fremdfinanziert; unbefristet)

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): Integrating BOMOSA cage fish farming system in reservoirs, ponds and temporary water bodies in Eastern Africa ; Projektleitung; 01.10.2006 - 30.09.2009

(Sonstiges Einzelforschungsprojekt): International Post-Graduate Training Programmes in Limnology; Projektleitung; 01.01.2005 - 31.12.2007
(Koordination eines Forschungsnetzwerks): Mombasa Workshop – Bridging Research, Technology & Development; Projektleitung; 01.08.2006 - 31.12.2007

6. Weiterbildungsmaßnahmen für Mitarbeiter(innen) I: Anzahl der Teilnehmenden

	gesamt	m	w
Anzahl der Mitarbeiter(innen) mit Teilnahme an Weiterbildungsmaßnahmen	1	1	

7. Weiterbildungsmaßnahmen für Mitarbeiter(innen) II: Anzahl der Maßnahmen

	gesamt	m	w
Anzahl der Besuche von Weiterbildungsmaßnahmen	1	1	

7. Liste

Maier, Karl (m)

Arbeitsfreude, Flow und Leistung. Basis für Zufriedenheit und Erfolg

Ziel: Soft Skills, Zeitraum: 22.10.2007 - 23.10.2007, frauenspezifisch: nein

Strukturpotenzial

8. Nutzfläche der Forschungseinrichtung

	gesamt
Gesamtfläche in m ²	1746.35
davon Nutzungsart:	
- Verkehrserschließung	349.45
- Büros und Sitzungsräume	246.61
- Werkstätten und Labors	572.53
- Technikräume	226.71
- Lager und Archive	69.66
- Unterrichtsräume und Bibliotheken	77.93
- Veranstaltungsräume	0
- Sonstige Raumnutzungen (z.B. Wohn- und Aufenthaltsräume, medizinisch ausgestattete Räume etc.)	203.46

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

Beziehungspotenzial (Vernetzung, Mobilität und Attraktivität)

9. Aufenthalte im In- und Ausland			
	gesamt	m	w
Anzahl der Aufenthalte im In- u. Ausland der wissenschaftlichen Mitarbeiter(innen)	61	41	20
davon im Rahmen des Wissenschaftler austauschprogramms der ÖAW	1	1	
davon Nachwuchswissenschaftler(innen)	9	2	7
Zweck			
· Weiterbildung	1		1
· wiss. Beratungstätigkeit	2	2	
· wiss. Vortragstätigkeit	13	11	2
· sonstiger Aufenthalt mit wissenschaftlichem Bezug	38	25	13
· Forschungstätigkeit im Rahmen eines ÖAW-Forschungsprojekts	7	3	4
Aufenthaltsort			
· außerhalb EU	19	13	6
· innerhalb EU (ohne Österreich)	24	20	4
· im Inland	18	8	10
Finanzierung			
· intern	17	13	4
· extern	36	25	11
· misch	8	3	5

9. Liste

außerhalb EU

Forschungstätigkeit im Rahmen eines ÖAW-Forschungsprojekts

Christiansen, Guntram (m)

Forschungstätigkeit Dep. of Chemistry, University of Honolulu at Manoa (01.05.2007 - 24.06.2007)

Besuchte Institution: ; Land: UNITED STATES; Finanzierung: extern

Straubinger, Nadja (w, NW)

Probenahme und Site Inspektion BOMOSA Projekt (07.05.2007 - 01.06.2007)

Besuchte Institution: ; Land: KENYA; Finanzierung: extern

Leichtfried, Maria (w)

(03.09.2007 - 17.09.2007)

Besuchte Institution: University of Kelaniya, Dept. of Zoology, Kelaniya; Land: SRI LANKA; Finanzierung: extern

Kurmayer, Rainer (m)

Besuch von William Okello in Jinja (Uganda) und der Projektstelle zum BOMOSA Projekt in Sagana (Kenya) (08.05.2007 - 17.05.2007)

Besuchte Institution: ; Land: UGANDA; Finanzierung: extern

sonstiger Aufenthalt mit wissenschaftlichem Bezug

Molitor, Carole (w, NW)

Konferenzteilnahme (Poster), SIL Tagung Montreal (06.08.2007 - 31.08.2007)

Besuchte Institution: ; Land: CANADA; Finanzierung: intern

Stelzer, Claus-Peter (m)

(12.08.2007 - 18.08.2007)

Besuchte Institution: ; Land: CANADA; Finanzierung: intern

Winkler, Gerold (m)

(22.09.2007 - 14.10.2007)

Besuchte Institution: Egerton University, Njoro; Land: KENYA; Finanzierung: extern

Winkler, Gerold (m)

(02.07.2007 - 06.07.2007)

Besuchte Institution: ; Land: UGANDA; Finanzierung: extern

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

9. Liste

außerhalb EU

sonstiger Aufenthalt mit wissenschaftlichem Bezug

Winkler, Gerold (m)

(08.10.2007 - 12.10.2007)

Besuchte Institution: ; Land: KENYA; Finanzierung: extern

Winkler, Gerold (m)

(14.07.2007 - 15.07.2007)

Besuchte Institution: ; Land: UGANDA; Finanzierung: extern

Winkler, Gerold (m)

(02.07.2007 - 13.07.2007)

Besuchte Institution: ; Land: UGANDA; Finanzierung: extern

Leichtfried, Maria (w)

(11.08.2007 - 20.08.2007)

Besuchte Institution: University of Montreal, Int. SIL Congress, Montreal; Land: CANADA; Finanzierung: intern

wiss. Vortragstätigkeit

Christiansen, Guntram (m)

Konferenz (Vortrag), ICTC Rio de Janeiro und Probenahme (27.07.2007 - 12.08.2007)

Besuchte Institution: ; Land: BRAZIL; Finanzierung: extern

Kurmayer, Rainer (m)

Konferenz (Vortrag) in Rio de Janeiro (ICTC) und Probenahme (27.07.2007 - 12.01.2008)

Besuchte Institution: ; Land: BRAZIL; Finanzierung: intern

Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (w, NW)

(12.08.2007 - 18.08.2007)

Besuchte Institution: Montreal; Land: CANADA; Finanzierung: intern

Weisse, Thomas (m)

(04.05.2007 - 04.05.2007)

Besuchte Institution: University of Zurich, Institute of Plant Biology, Zurich; Land: SWITZERLAND; Finanzierung: extern

Winkler, Gerold (m)

(24.09.2007 - 05.10.2007)

Besuchte Institution: Egerton University, Njoro; Land: KENYA; Finanzierung: extern

Kurmayer, Rainer (m)

Gordon Research Conference, Mycotoxins and Phycotoxins (18.06.2007 - 24.06.2007)

Besuchte Institution: ; Land: UNITED STATES; Finanzierung: extern

Leichtfried, Maria (w)

(22.08.2007 - 02.09.2007)

Besuchte Institution: Visaiya State University (VSU), Baybay, Leyte; Land: PHILIPPINES; Finanzierung: misch

im Inland

Forschungstätigkeit im Rahmen eines ÖAW-Forschungsprojekts

Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (w, NW)

(29.10.2007 - 31.10.2007)

Besuchte Institution: Institute for Zoology, University of Graz, Graz; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (w, NW)

(16.07.2007 - 19.07.2007)

Besuchte Institution: Institute for Zoology, University of Graz, Graz; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Weiterbildung

Leichtfried, Maria (w)

(30.10.2007 - 31.10.2007)

Besuchte Institution: Universität Innsbruck, Institut für Ökologie, Innsbruck; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

9. Liste

im Inland

Weiterbildung

sonstiger Aufenthalt mit wissenschaftlichem Bezug

Leichtfried, Maria (w)

(27.09.2007 - 30.09.2007)

Besuchte Institution: Universität Innsbruck, Institute für Ökologie, Innsbruck; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Leichtfried, Maria (w)

(13.05.2007 - 15.05.2007)

Besuchte Institution: Universität Innsbruck, Institut für Ökologie; Land: AUSTRIA; Finanzierung: misch

Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (w, NW)

(23.03.2007 - 23.03.2007)

Besuchte Institution: Institute for Zoology, University of Graz, Graz; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Schmidt, Roland (m)

(23.03.2007 - 25.03.2007)

Besuchte Institution: ; Land: AUSTRIA; Finanzierung: intern

Schmidt, Roland (m)

(18.10.2007 - 19.10.2007)

Besuchte Institution: ; Land: AUSTRIA; Finanzierung: intern

Wanzenböck, Josef (m)

(23.03.2007 - 23.03.2007)

Besuchte Institution: Institute for Zoology, University of Graz, Graz; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Wanzenböck, Josef (m)

(29.10.2007 - 29.10.2007)

Besuchte Institution: Institute for Zoology, University of Graz, Graz; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Leichtfried, Maria (w)

(26.10.2007 - 28.10.2007)

Besuchte Institution: WasserCluster, Lunz am See; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Leichtfried, Maria (w)

(03.12.2007 - 04.12.2007)

Besuchte Institution: Universität Wien, Biozentrum, Dept. für Ökologie; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Leichtfried, Maria (w)

(23.04.2007 - 24.04.2007)

Besuchte Institution: Institut für Ökologie, Universität Innsbruck, A-6020 Innsbruck; Land: AUSTRIA; Finanzierung: misch

Leichtfried, Maria (w)

(15.03.2007 - 16.03.2007)

Besuchte Institution: Institut für Ökologie, Universität Innsbruck; Land: AUSTRIA; Finanzierung: misch

wiss. Beratungstätigkeit

Weisse, Thomas (m)

1. Treffen des Wissenschaftlichen Beirats des WassCluster Lunz (15.01.2007 - 15.01.2007)

Besuchte Institution: WasserCluster Lunz, Lunz/See; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Weisse, Thomas (m)

2. Treffen des Wissenschaftlichen Beirats (03.12.2007 - 03.12.2007)

Besuchte Institution: WasserCluster Lunz, Lunz/See; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

wiss. Vortragstätigkeit

Boenigk, Jens (m)

Vorlesung - Diversität und Ökologie der Protisten (12.11.2007 - 16.11.2007)

Besuchte Institution: ; Land: AUSTRIA; Finanzierung: extern

Kurmayer, Rainer (m)

SIL Jahrestreffen 2007 (27.10.2007 - 29.10.2007)

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

9. Liste

im Inland

wiss. Vortragstätigkeit

Besuchte Institution: Univ. Wien, Lunz am See; Land: AUSTRIA; Finanzierung: intern

innerhalb EU (ohne Österreich)

Forschungstätigkeit im Rahmen eines ÖAW-Forschungsprojekts

Dokulil, Martin (m)

(28.05.2007 - 06.06.2007)

Besuchte Institution: Institut für Landschaftsökologie, Tschechische Akademie der Wissenschaften, Trebon; Land: CZECH REPUBLIC;
Finanzierung: intern; Wissenschafteraustausch

sonstiger Aufenthalt mit wissenschaftlichem Bezug

Boenigk, Jens (m)

(05.09.2007 - 08.09.2007)

Besuchte Institution: ; Land: PORTUGAL; Finanzierung: extern

Boenigk, Jens (m)

Projektmeeting Potsdam (02.12.2007 - 07.12.2007)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: extern

Boenigk, Jens (m)

(21.09.2007 - 24.09.2007)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: extern

Boenigk, Jens (m)

(02.09.2007 - 05.09.2007)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: misch

Boenigk, Jens (m)

(10.09.2007 - 14.09.2007)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: extern

Boenigk, Jens (m)

DGL (24.09.2007 - 28.09.2008)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: extern

Boenigk, Jens (m)

(21.02.2007 - 24.02.2007)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: misch

Huber, Kerstin (w, NW)

(23.03.2007 - 25.03.2007)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: intern

Leichtfried, Maria (w)

(06.07.2007 - 15.07.2007)

Besuchte Institution: University of Palermo, Botanical Garden, SEFS5, Palermo; Land: ITALY; Finanzierung: extern

Moser, Michael (m, NW)

(04.06.2007 - 06.06.2007)

Besuchte Institution: University of Potsdam, Institute of Biochemistry and Biology, Dept. Ecology & Ecosystem Modeling, Potsdam ; Land: GERMANY; Finanzierung: misch

Schmidt, Roland (m)

4th International Limnogeology Congress ILIC2007, Barcelona (11.07.2007 - 14.07.2007)

Besuchte Institution: ; Land: SPAIN; Finanzierung: intern

Schmidt, Roland (m)

(23.03.2007 - 25.03.2007)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: intern

Stelzer, Claus-Peter (m)

(20.08.2007 - 25.08.2007)

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

9. Liste

innerhalb EU (ohne Österreich)

sonstiger Aufenthalt mit wissenschaftlichem Bezug

Besuchte Institution: ; Land: SWEDEN; Finanzierung: intern

Stelzer, Claus-Peter (m)

(21.09.2007 - 24.09.2007)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: intern

Weisse, Thomas (m)

Projektbesprechung zum KIÖS Projekt: 2007-05 (04.06.2007 - 06.06.2007)

Besuchte Institution: ; Land: GERMANY; Finanzierung: intern

Winkler, Gerold (m)

Zukünftige Ausrichtung von IPGL und geplante IPGL Umstrukturierungsmaßnahmen 2008-2010 (29.10.2007 - 01.11.2007)

Besuchte Institution: UNESCO-IHE, Institute for Water Education, Delft; Land: NETHERLANDS; Finanzierung: extern

Winkler, Gerold (m)

(18.04.2007 - 21.04.2007)

Besuchte Institution: UNESCO-IHE, Institute for Water Education, Delft; Land: NETHERLANDS; Finanzierung: extern

Leichtfried, Maria (w)

(16.11.2007 - 18.11.2007)

Besuchte Institution: Palacky University, Dept. for Zoology, Olomouc; Land: CZECH REPUBLIC; Finanzierung: extern

Leichtfried, Maria (w)

(05.02.2007 - 06.02.2007)

Besuchte Institution: Masaryk University, Institute for Zoology and Ecology, Brno; Land: CZECH REPUBLIC; Finanzierung: misch

wiss. Vortragstätigkeit

Finster, Martin (m, NW)

(11.09.2007 - 15.09.2007)

Besuchte Institution: ; Land: CZECH REPUBLIC; Finanzierung: intern

Kurmayer, Rainer (m)

Konferenz (Eingeladener Vortrag) in Palermo (SEFS-5) und Probenahme (07.07.2007 - 18.07.2007)

Besuchte Institution: ; Land: ITALY; Finanzierung: extern

Wanzenböck, Josef (m)

(11.09.2007 - 15.09.2007)

Besuchte Institution: ; Land: CZECH REPUBLIC; Finanzierung: intern

Weisse, Thomas (m)

(10.12.2007 - 11.12.2007)

Besuchte Institution: Universität Leipzig, Institut für Biologie II, Molekulare Evolution und Systematik der Tiere, Leipzig; Land: GERMANY; Finanzierung: extern

10. Tagungsteilnahmen von wissenschaftlichen Mitarbeiter(inne)n

	gesamt	m	w
Anzahl der Teilnahmen an wissenschaftlichen Tagungen	67	53	14
davon Teilnahmen von Nachwuchswissenschaftler(innen)	10	6	4
davon auf internationalen	24	21	3
Tagungsort			
· Kein Land eingetragen	2	2	
· im Inland	22	16	6
· innerhalb EU (ohne Österreich)	25	23	2
· außerhalb EU	18	12	6

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

10. Liste

Kongress/Symposium/Konferenz/Tagung

100. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (21.09.2007 - 24.09.2007)

Boenigk, Jens (m), ReferentIn

Stelzer, Claus-Peter (m), ReferentIn

11th Congress of The European Society for Evolutionary Biology (22.08.2007 - 25.08.2007)

Stelzer, Claus-Peter (m), ReferentIn

12th International Seminar and Workshop on Tropical Ecology (19.08.2007 - 01.09.2007)

Leichtfried, Maria (w), ReferentIn

12th World Lake Conference (28.10.2007 - 02.11.2007)

Dokulil, Martin (m), ReferentIn

1st Central European Diatom Meeting (23.03.2007 - 25.03.2007)

Dokulil, Martin (m), TeilnehmerIn

Huber, Kerstin (w, NW), TeilnehmerIn

Schmidt, Roland (m), ReferentIn

26. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie (21.02.2007 - 24.02.2007)

Boenigk, Jens (m), ReferentIn

Jost, Steffen (m, NW), PosterpräsentatorIn

Auinger, Barbara (w, NW), PosterpräsentatorIn

Moser, Michael (m, NW), TeilnehmerIn

Scheffel, Ulrike (w), TeilnehmerIn

Weisse, Thomas (m), ReferentIn

30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology (12.08.2007 - 18.08.2007)

Leichtfried, Maria (w), ReferentIn

Minati, Klaus (m), ReferentIn

Molitor, Carole (w, NW), PosterpräsentatorIn

Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (w, NW), ReferentIn

Stelzer, Claus-Peter (m), ReferentIn

Weisse, Thomas (m), ReferentIn

3rd Global Change Research Networking Meeting for European Mountains (18.10.2007 - 19.10.2007)

Schmidt, Roland (m), TeilnehmerIn

4th International Limnogeology Congress ILIC2007 (11.07.2007 - 14.07.2007)

Schmidt, Roland (m), ReferentIn

Aquafluo (25.05.2007 - 29.05.2007)

Dokulil, Martin (m), TeilnehmerIn

Botanikertagung (03.09.2007 - 03.09.2007)

Boenigk, Jens (m), ReferentIn

CEI XII European Congress of Ichthyology (09.09.2007 - 13.09.2007)

Mayr, Stefan (m, NW), ReferentIn

Chemrawn XII, The role of chemistry in sustainable agriculture and human well-being in Africa (02.12.2007 -

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

10. Liste

Kongress/Symposium/Konferenz/Tagung

05.12.2007)

Kurmayer, Rainer (m), ReferentIn

Okello, William (m, NW), ReferentIn

China-Germany Symposium on Microbes and the Environment (23.09.2007 - 28.09.2007)

Hahn, Martin (m), ReferentIn

European Geosciences Union General Assembly 2007 (15.04.2007 - 20.04.2007)

Schmidt, Roland (m), ReferentIn

FSMALR 2007 - Fish Stock Assessment Methods for Lakes and Reservoirs (11.09.2007 - 15.09.2007)

Finster, Martin (m, NW), ReferentIn

Wanzenböck, Josef (m), ReferentIn

Gordon Research Conference, Mycotoxine und Phycotoxine (18.06.2007 - 24.06.2007)

Kurmayer, Rainer (m), ReferentIn

ICTC 7th-International Conference on Toxic Cyanobacteria (05.08.2007 - 10.08.2007)

Christiansen, Guntram (m), ReferentIn

Kurmayer, Rainer (m), ReferentIn

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (24.08.2007 - 28.09.2007)

Boenigk, Jens (m), ReferentIn

Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie (10.09.2007 - 14.09.2007)

Boenigk, Jens (m), ReferentIn

Weisse, Thomas (m), TeilnehmerIn

LTER-Austria Treffen (12.11.2007 - 13.11.2007)

Leichtfried, Maria (w), ReferentIn

Limnologie in Fluss; Heinz Löffler Stimulans (18.05.2007 - 18.05.2007)

Danielopol, Dan Luca (m), ReferentIn

SEFS-5, Symposium for European Freshwater Sciences (08.07.2007 - 13.07.2007)

Dokulil, Martin (m), ReferentIn

Leichtfried, Maria (w), ReferentIn

Kurmayer, Rainer (m), ReferentIn

SIL-Austria Jahrestagung (26.10.2007 - 28.10.2007)

Kurmayer, Rainer (m), ReferentIn

Moser, Michael (m, NW), PosterpräsentatorIn

Scheffel, Ulrike (w), TeilnehmerIn

Weisse, Thomas (m), PodiumsdiskutantIn

Winkler, Gerold (m), TeilnehmerIn

The 10th Symposium on Aquatic Microbial Ecology (02.09.2007 - 07.09.2007)

Boenigk, Jens (m), ReferentIn

University of Kelaniya, Seminars & Workshops (02.09.2007 - 16.09.2007)

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

10. Liste

Kongress/Symposium/Konferenz/Tagung

University of Kelaniya, Seminars & Workshops (02.09.2007 - 16.09.2007)

Leichtfried, Maria (w), ReferentIn

V European Congress of Protistology and XI European Conference on Ciliate Biology (23.07.2007 - 27.07.2007)

Scheffel, Ulrike (w), TeilnehmerIn

Weisse, Thomas (m), ReferentIn

Vienna Ecology Centre: Perspectives in Limnology (04.12.2007 - 04.12.2007)

Leichtfried, Maria (w), ReferentIn

Weisse, Thomas (m), PodiumsdiskutantIn

Podiumsdiskussion

KEF Roundtable: Tropical river ecology – potential scientific and applied issues towards aquatic biodiversity and conservation in Sri Lanka. (14.05.2007 - 14.05.2007)

Leichtfried, Maria (w), ReferentIn

Workshop/Seminar

ALTER-Net workshop (15.02.2007 - 16.02.2007)

Hahn, Martin (m), ReferentIn

Alpine Lakes Network 2nd Biennial Conference (26.09.2007 - 29.09.2007)

Weisse, Thomas (m), TeilnehmerIn

Colloquium der Univ. Leipzig (10.12.2007 - 10.12.2007)

Weisse, Thomas (m), ReferentIn

DecLakes ESF Project, Annual meeting (06.05.2007 - 09.05.2007)

Danielopol, Dan Luca (m), ReferentIn

European Ostracodologists' Meeting VI (EOM VI) 19th International Senckenberg Conference (04.09.2007 - 07.09.2007)

Buttinger, Robert (m), ReferentIn

Danielopol, Dan Luca (m), ReferentIn

Minati, Klaus (m), ReferentIn

Neogene of Central and South Eastern Europe (17.05.2007 - 21.05.2007)

Buttinger, Robert (m), ReferentIn

Danielopol, Dan Luca (m), ReferentIn

Minati, Klaus (m), ReferentIn

Seminar University Innsbruck (12.11.2007 - 12.11.2007)

Boenigk, Jens (m), ReferentIn

Seminar Universität Potsdam (07.12.2007 - 07.12.2007)

Boenigk, Jens (m), ReferentIn

Seminar series of the Univ. of Zurich (05.04.2007 - 05.04.2007)

Weisse, Thomas (m), ReferentIn

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

10. Liste

Workshop/Seminar

Seminar series of the Univ. of Zurich (05.04.2007 - 05.04.2007)

11. Wissenschaftliche Gäste aus dem Ausland

	gesamt	m	w
Anzahl der wissenschaftlich tätigen Gäste aus dem Ausland	33	24	9
davon im Rahmen des Wissenschaftler austauschprogramms der ÖAW	6	4	2
Aufenthaltszweck			
· Forschungstätigkeit im Rahmen eines ÖAW-Forschungsprojektes (Projekttreffen)	15	12	3
· Sonstiger Aufenthalt mit wissenschaftlichem Bezug	10	4	6
· Wissenschaftliche Beratungstätigkeit	1	1	
· wissenschaftliche Vortragstätigkeit	7	7	
Herkunftsort			
· innerhalb EU (ohne Österreich)	18	16	2
· außerhalb EU	15	8	7
Finanzierung			
· intern	12	10	2
· extern	17	11	6
· misch	4	3	1
Dauer			
· <= 1 Tag	1	1	
· > 1 <= 5 Tage	8	8	
· > 5 Tage	24	15	9

11. Liste

Christian Kamenik, m, Herkunft: University of Bern, SWITZERLAND

Aufenthaltsdauer: 26.04.2007 - 27.04.2007, Finanzierung: Eigenmittel der Forschungseinrichtung, Zweck: wissenschaftliche Vortragstätigkeit

David J. S. Montagnes, m, Herkunft: School of Biological Sciences, University of Liverpool, UNITED KINGDOM

Aufenthaltsdauer: 09.05.2007 - 12.05.2007, Finanzierung: Mischfinanzierung, Zweck: wissenschaftliche Vortragstätigkeit

Vojtech Kasalicky, m, Herkunft: Biology Centre AS CR, v.v.i. Hydrobiological Institute, Ceske Budejovice, CZECH REPUBLIC

Aufenthaltsdauer: 15.10.2007 - 26.10.2007, Finanzierung: Sonstige externe Geldgeber oder Privatfinanzierung, Zweck: Forschungstätigkeit

Arjan De Visser, m, Herkunft: Laboratory of Genetics, Wageningen University, Wageningen, NETHERLANDS

Aufenthaltsdauer: 11.01.2007 - 12.01.2007, Finanzierung: Eigenmittel der Forschungseinrichtung, Zweck: wissenschaftliche Vortragstätigkeit

Naomi Downes-Tettmar, w, Herkunft: School of Biological Sciences, University of Liverpool, UNITED KINGDOM

Aufenthaltsdauer: 26.08.2007 - 23.09.2007, Finanzierung: Mischfinanzierung, Zweck: Forschungstätigkeit

Walpola Hiranthi, w, Herkunft: University of Kelaniya, Dept. for Zoology, Kelaniya, SRI LANKA

Aufenthaltsdauer: 01.03.2007 - 30.06.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung

Anna F. Pasternak, w, Herkunft: Shirshov Institute of Oceanology, Moscow, RUSSIAN FEDERATION

Aufenthaltsdauer: 07.06.2007 - 27.06.2007, Finanzierung: ÖAW im Rahmen Wissenschaftler austauschprogramm, Zweck: Forschungstätigkeit

Shelard Chilemeji Mukama, m, Herkunft: University of Dar es Salaam, Dar es Salaam, TANZANIA, UNITED REPUBLIC OF

Aufenthaltsdauer: 03.04.2007 - 22.07.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung

Prof. Dr. Karel Simek, m, Herkunft: Biology Centre AS CR, v.v.i. Hydrobiological Institute, Ceske Budejovice, CZECH REPUBLIC

Aufenthaltsdauer: 15.10.2007 - 26.10.2007, Finanzierung: Sonstige externe Geldgeber oder Privatfinanzierung, Zweck: Forschungstätigkeit

Michael Schweikert, m, Herkunft: Abt. Zoologie, Biologisches Institut, Universität Stuttgart, GERMANY

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

11. Liste

- Aufenthaltsdauer: 25.01.2007 - 25.01.2007, Finanzierung: Eigenmittel der Forschungseinrichtung, Zweck: wissenschaftliche Vortragstätigkeit
Gogadi Tungu Mgwatu, m, Herkunft: Lake Victoria Environmental Management , Mwanza, TANZANIA, UNITED REPUBLIC OF
Aufenthaltsdauer: 03.04.2007 - 22.07.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung
- Fasil Degefu Abera, m, Herkunft: National Fisheries and other Aquatic Life Research Center, Sebeta, ETHIOPIA
Aufenthaltsdauer: 03.04.2007 - 22.07.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung
- Thomas Hemscheidt, m, Herkunft: University of Hawaii at Manoa, Honolulu, UNITED STATES
Aufenthaltsdauer: 03.10.2007 - 05.10.2007, Finanzierung: Mischfinanzierung, Zweck: wissenschaftliche Vortragstätigkeit
- Rosemary Nalwanga, w, Herkunft: Fisheries Resources Research Institute, Jinja, UGANDA
Aufenthaltsdauer: 03.04.2007 - 22.07.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung
- David J. S. Montagnes, m, Herkunft: School of Biological Sciences, University of Liverpool, UNITED KINGDOM
Aufenthaltsdauer: 26.08.2007 - 31.08.2007, Finanzierung: Mischfinanzierung, Zweck: Forschungstätigkeit
- Victor A. Mikheev, m, Herkunft: Severtsov Institute for Ecology and Evolution, Moscow, RUSSIAN FEDERATION
Aufenthaltsdauer: 07.06.2007 - 27.06.2007, Finanzierung: ÖAW im Rahmen Wissenschaftleraustauschprogramm, Zweck: Forschungstätigkeit
- Lupini Giuliano, m, Herkunft: Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Roma, ITALY
Aufenthaltsdauer: 25.09.2006 - 04.03.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Forschungstätigkeit
- Vojtech Kasalicky, m, Herkunft: Biology Centre AS CR, v.v.i. Hydrobiological Institute, Ceske Budejovice, CZECH REPUBLIC
Aufenthaltsdauer: 28.11.2007 - 10.12.2007, Finanzierung: Sonstige externe Geldgeber oder Privatfinanzierung, Zweck: Forschungstätigkeit
- Radovan Pipik, m, Herkunft: Slovak Academy of Sciences, Geological Institute, Banska Bystrica, SLOVAKIA (Slovak Republic)
Aufenthaltsdauer: 07.05.2007 - 21.05.2007, Finanzierung: ÖAW im Rahmen Wissenschaftleraustauschprogramm, Zweck: Forschungstätigkeit
- Minasyan Arevik, w, Herkunft: National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, ARMENIA
Aufenthaltsdauer: 06.11.2006 - 07.04.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung
- Monica Mitti Mwiche, w, Herkunft: AHC-Mining Municipal Services, Kitwe, ZAMBIA
Aufenthaltsdauer: 03.04.2007 - 22.07.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung
- Guntram Weithoff, m, Herkunft: Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam, GERMANY
Aufenthaltsdauer: 29.03.2007 - 31.03.2007, Finanzierung: Eigenmittel der Forschungseinrichtung, Zweck: Forschungstätigkeit
- Antonio Camacho, m, Herkunft: Department of Microbiology and Ecology and Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, SPAIN
Aufenthaltsdauer: 06.08.2007 - 24.08.2007, Finanzierung: Sonstige externe Geldgeber oder Privatfinanzierung, Zweck: Forschungstätigkeit
- Vojtech Kasalicky, m, Herkunft: Biology Centre AS CR, v.v.i. Hydrobiological Institute, Ceske Budejovice, CZECH REPUBLIC
Aufenthaltsdauer: 28.11.2007 - 10.12.2007, Finanzierung: Sonstige externe Geldgeber oder Privatfinanzierung, Zweck: Forschungstätigkeit
- Raquel Lopes Dos Santos Monteiro, w, Herkunft: ISECAR-Superior Institute of Engineering & Technology of Aquatic Resources, Mindelo , CAPE VERDE
Aufenthaltsdauer: 03.04.2007 - 22.07.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung
- Nick Okello Omondi, m, Herkunft: Ministry of Livestock and Fisheries, Sagana Fish Culture Farm, Sagana, KENYA
Aufenthaltsdauer: 03.04.2007 - 22.07.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung
- Susan Namaalwa, w, Herkunft: Rakai District Administration, Kyotera, UGANDA
Aufenthaltsdauer: 03.04.2007 - 22.07.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: Weiterbildung
- Achim Brauer, m, Herkunft: Geoforschungszentrum Potsdam, GERMANY
Aufenthaltsdauer: 17.03.2007 - 19.03.2007, Finanzierung: sonst. Stipendium, Zweck: wissenschaftliche Beratungstätigkeit
- Claudia Vannini, w, Herkunft: Department of Ethology Ecology Evolution, University of Pisa, Pisa, ITALY
Aufenthaltsdauer: 27.05.2007 - 10.06.2007, Finanzierung: ÖAW im Rahmen Wissenschaftleraustauschprogramm, Zweck: Forschungstätigkeit
- Giulio Petroni, m, Herkunft: Department of Ethology Ecology Evolution, University of Pisa, Pisa, ITALY
Aufenthaltsdauer: 27.05.2007 - 10.06.2007, Finanzierung: ÖAW im Rahmen Wissenschaftleraustauschprogramm, Zweck: Forschungstätigkeit
- Colomban de Vargas, m, Herkunft: Station Biologique de Roscoff, FRANCE
Aufenthaltsdauer: 18.01.2007 - 19.01.2007, Finanzierung: Eigenmittel der Forschungseinrichtung, Zweck: wissenschaftliche Vortragstätigkeit
- Jukka Jokela, m, Herkunft: EAWAG, Zürich, SWITZERLAND

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

11. Liste

Aufenthaltsdauer: 13.11.2007 - 14.11.2007, Finanzierung: Eigenmittel der Forschungseinrichtung, Zweck: wissenschaftliche Vortragstätigkeit

Ondrej Prasil, m, Herkunft: Lab. Photosynthesis, Inst. Microbiology, MBU AVCR, Trebon, CZECH REPUBLIC

Aufenthaltsdauer: 15.07.2007 - 22.07.2007, Finanzierung: ÖAW im Rahmen Wissenschaftlerauschprogramm, Zweck: Forschungstätigkeit

12. Externe Funktionen im Rahmen wissenschaftlicher Qualitätssicherung I: Funktionen bei Zeitschriften/Buchreihen

	gesamt	m	w
Anzahl der Funktionen , die wissenschaftliche Mitarbeiter(innen) für wissenschaftliche Zeitschriften und Buchreihen ausüben	62	61	1
davon in indizierten Publikationsorganen	57	56	1
davon als			
· Gutachter (Referee, Reviewer)	50	49	1
· Editorial Board Member, Associate Editor	11	11	
· Herausgeber(in), Editor-in-chief	1	1	

12. Liste

Dokulil, Martin (m)

Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "Algological Studies", angeführt in Index: nein
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2006 -), Bezeichnung: "FRESHWATER BIOLOGY", angeführt in Index: ja
 Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.2005 -), Bezeichnung: "Algological Studies", angeführt in Index: nein
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2005 -), Bezeichnung: "JOURNAL OF PHYCOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.1998 -), Bezeichnung: "HYDROBIOLOGIA", angeführt in Index: ja
 Herausgeber(in), Editor-in-chief (01.01.1990 -), Bezeichnung: "Archiv für Hydrobiologie - Large Rivers", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2006 -), Bezeichnung: "LIMNOLOGY", angeführt in Index: ja
 Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.1998 -), Bezeichnung: "LIMNOLOGICA", angeführt in Index: ja

Hahn, Martin (m)

Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2002 -), Bezeichnung: "MICROBIAL ECOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2003 -), Bezeichnung: "FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2006 -), Bezeichnung: "NATURE BIOTECHNOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2001 -), Bezeichnung: "WATER AIR AND SOIL POLLUTION", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2005 -), Bezeichnung: "HYDROBIOLOGIA", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2003 -), Bezeichnung: "Archiv für Hydrobiologie - Advances in Limnology", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2004 -), Bezeichnung: "COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2003 -), Bezeichnung: "AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY", angeführt in Index: ja
 Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.2001 -), Bezeichnung: "APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2004 -), Bezeichnung: "JOURNAL OF EUKARYOTIC MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2005 -), Bezeichnung: "CURRENT MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.1999 -), Bezeichnung: "APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2006 -), Bezeichnung: "JOURNAL OF BIOSCIENCES", angeführt in Index: ja
 Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2002 -), Bezeichnung: "ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja

Humpesch, Uwe (m)

Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.1990 -), Bezeichnung: "Archiv für Hydrobiologie - Large Rivers", angeführt in Index: ja

Kurmayer, Rainer (m)

Gutachter (Referee, Reviewer) (15.08.2007 - 15.11.2007), Bezeichnung: "JOURNAL OF BACTERIOLOGY", angeführt in Index: ja

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

12. Liste

Kurmayer, Rainer (m)

- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.04.2007 - 15.08.2007), Bezeichnung: "APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.02.2007 - 30.11.2007), Bezeichnung: "HYDROBIOLOGIA", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.08.2007 - 30.09.2007), Bezeichnung: "LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.11.2007 - 15.12.2007), Bezeichnung: "TOXICON", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.10.2007 - 15.11.2007), Bezeichnung: "HARMFUL ALGAE", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 30.11.2007), Bezeichnung: "ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.05.2007 - 30.06.2007), Bezeichnung: "JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.07.2007 - 15.08.2007), Bezeichnung: "ARCHIVES OF MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.03.2007 - 30.04.2007), Bezeichnung: "WATER RESEARCH", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.06.2007 - 30.06.2007), Bezeichnung: "MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH", angeführt in Index: ja

Leichtfried, Maria (w)

- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "INTERNATIONAL REVIEW OF HYDROBIOLOGY", angeführt in Index: ja

Schmidt, Roland (m)

- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "Journal of Limnology", angeführt in Index: nein
- Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.2007 - 01.04.2010), Bezeichnung: "JOURNAL OF PALEOLIMNOLOGY", angeführt in Index: ja
- Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.2006 -), Bezeichnung: "JOURNAL OF PALEOLIMNOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY", angeführt in Index: ja

Stelzer, Claus-Peter (m)

- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "HYDROBIOLOGIA", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "Review of Book Chapter", angeführt in Index: nein
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.10.2007 - 01.12.2007), Bezeichnung: "AQUATIC ECOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.01.2007 - 31.12.2007), Bezeichnung: "LIMNOLOGICA", angeführt in Index: ja

Wanzenböck, Josef (m)

- Gutachter (Referee, Reviewer) (01.03.2007 - 27.04.2007), Bezeichnung: "JOURNAL OF FISH BIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.02.2007 - 13.04.2007), Bezeichnung: "INTERNATIONAL REVIEW OF HYDROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.06.2007 - 15.07.2007), Bezeichnung: "INTERNATIONAL REVIEW OF HYDROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (10.07.2007 - 30.08.2007), Bezeichnung: "FUNDAMENTAL AND APPLIED LIMNOLOGY", angeführt in Index: ja

Weisse, Thomas (m)

- Gutachter (Referee, Reviewer) (05.02.2006 -), Bezeichnung: "MOLECULAR ECOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.03.2000 -), Bezeichnung: "JOURNAL OF EUKARYOTIC MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.01.2002 -), Bezeichnung: "FRESHWATER BIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.2004 -), Bezeichnung: "LIMNOLOGICA", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (04.04.2007 -), Bezeichnung: "FUNDAMENTAL AND APPLIED LIMNOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.03.2004 -), Bezeichnung: "ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.03.1992 -), Bezeichnung: "LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY", angeführt in Index: ja
- Editorial Board Member, Associate Editor (15.02.2006 -), Bezeichnung: "JOURNAL OF EUKARYOTIC MICROBIOLOGY", angeführt in Index: ja
- Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.2001 -), Bezeichnung: "Protozoological Monographs", angeführt in Index: nein
- Gutachter (Referee, Reviewer) (10.03.2006 -), Bezeichnung: "MICROBIOLOGICAL RESEARCH", angeführt in Index: ja
- Editorial Board Member, Associate Editor (01.01.1998 -), Bezeichnung: "JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH", angeführt in Index: ja
- Gutachter (Referee, Reviewer) (15.03.1996 -), Bezeichnung: "AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY", angeführt in Index: ja

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

13. Externe Funktionen im Rahmen wissenschaftlicher Qualitätssicherung II: Gutachter(innen) oder Evaluator(inn)en für externe Forschungseinrichtungen oder -programme

	gesamt	m	w
Anzahl der Funktionen wissenschaftlicher Mitarbeiter(innen) als Gutachter(innen) oder Evaluator(inn)en für externe Forschungseinrichtungen oder -programme	5	5	
davon externe Einheiten			
· im Inland	1	1	
· innerhalb EU (ohne Österreich)	3	3	
· außerhalb EU	1	1	

13. Liste

Weisse, Thomas (m)

National Science Foundation (NSF), Arlington, UNITED STATES, Funktionsdauer: 01.04.1998 -

WasserKluster Lunz GmbH, Lunz am See (NÖ), AUSTRIA, Funktionsdauer: 05.03.2007 -

Natural Environment Research Council, Swindon, Wiltshire, UNITED KINGDOM, Funktionsdauer: 15.05.1998 -

Estonian Science Foundation, Tallinn, ESTONIA, Funktionsdauer: 19.10.2007 -

The impact of climate variability on aquatic ecosystems (AQUASHIFT), Bonn, GERMANY, Funktionsdauer: 01.06.2004 -

Leistungen der Forschungsträgereinrichtung (Forschungsportfolio, Projektstrukturen und -kooperationen, Drittmittelerwerb, Resultate, Dissemination wissenschaftlicher Erkenntnis)

14. Forschungsportfolio

	gesamt
Anzahl der laufenden Forschungsprojekte	34
· drittfinanziert	28
· eigenfinanziert	6
interdisziplinär	29,41 %
· Langfristprojekt	14,71 %
· Mittelfristprojekt	70,59 %
· Kurzfristprojekt	14,71 %
Projekte mit externen Partnern	13
· davon EU-Projekte	2
· Grundlagenforschung	85,29 %
· Angewandte Forschung	14,71 %
· Förderung der Erzeugung, Speicherung und Verteilung von Energie	2,94 %
· Förderung der allgemeinen Erweiterung des Wissens	8,82 %
· Förderung von Handel, Gewerbe und Industrie	2,94 %
· Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes	79,41 %
· Förderung des Umweltschutzes	2,94 %
· N/A	2,94 %

14. Liste

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

14. Liste

Dissertationsprojekt

The role of predation in population dynamics of 0+ whitefish (*Coregonus* sp.)

Laufzeit (Istdaten): 01.12.2005 - , Plandaten (Solldaten): 01.12.2005 - 30.11.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: eigenfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Chrysophyte diversity and encystment pattern

Laufzeit (Istdaten): 01.02.2006 - , Plandaten (Solldaten): 01.02.2006 - 31.01.2009, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der allgemeinen Erweiterung des Wissens, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Dissertation: Effects of cage fish farming systems on phytoplankton and water quality in small ponds of East Africa

Laufzeit (Istdaten): 01.05.2007 - , Plandaten (Solldaten): 01.05.2007 - 30.09.2009, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 2, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Kooperations-Partner: Norwegian Institute for Water Research (NIVA)

Kooperations-Partner: Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften, Department für Meeresbiologie

Habitat specificity of flagellates

Laufzeit (Istdaten): 01.01.2007 - , Plandaten (Solldaten): 01.01.2007 - 31.12.2009, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der allgemeinen Erweiterung des Wissens, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Molecular and chemical characterisation of toxic cyanobacteria in Ugandan freshwater

Laufzeit (Istdaten): 15.06.2006 - , Plandaten (Solldaten): 01.03.2006 - 14.06.2009, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Langfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 1, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Kooperations-Partner: National Fisheries Resources Research Institute (NAFIRRI); Partnerschaft

Population genetics of Austrian whitefish

Laufzeit (Istdaten): 01.01.2006 - , Plandaten (Solldaten): 01.01.2006 - 31.12.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Habilitationsprojekt

Genetic diversity of toxin production in cyanobacteria

Laufzeit (Istdaten): 15.02.2005 - 04.05.2007 , Plandaten (Solldaten): 15.02.2005 - 30.04.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Koordination eines Forschungsnetzwerks

Mombasa Workshop – Bridging Research, Technology & Development

Laufzeit (Istdaten): 01.08.2006 - , Plandaten (Solldaten): 01.08.2006 - 31.12.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Angewandte Forschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Sonstiges Einzelforschungsprojekt

Patterns and processes of adaptation and tolerance to low pH of freshwater plankton

Laufzeit (Istdaten): 01.07.2007 - , Plandaten (Solldaten): 01.07.2007 - 30.06.2010, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 3, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Kooperations-Partner: Fachbereich Organismische Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Salzburg;

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

14. Liste

Sonstiges Einzelforschungsprojekt

Partnerschaft
Geldgeber: Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF); Projektmanagement
Kooperations-Partner: Universität Leipzig; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Universität Potsdam; Partnerschaft

Allgemeine Limnologische Grundlagenforschung

Laufzeit (Istdaten): 01.04.1998 - , Plandaten (Solldaten): 01.04.1998 - 31.03.2010, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: eigenfinanziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Langfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 1, Anzahl der EU-Förderpartner: 0
Kooperations-Partner: School of Biological Sciences; Partnerschaft

Changes in bacterioplankton structure and functioning in a reservoir related to single-cell activities of major phylogenetic groups of bacteria

Laufzeit (Istdaten): 01.01.2005 - , Plandaten (Solldaten): 01.01.2005 - 31.12.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0
Geldgeber: Academy of Sciences CR, Hydrobiological Institute; Projektleitung

Chrysophyte diversity and encystment pattern in alpine lakes: Merging molecular microbiology, recent and palaeoecology in C32#

Laufzeit (Istdaten): 15.12.2005 - , Plandaten (Solldaten): 15.12.2005 - 14.12.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0
: Universität Bern; Partnerschaft

Comparative morphology and taxonomical relationships between living subterranean and fossil "Paratethyan" Ostracoda (Crustacea) from Central and Eastern Europe.

Laufzeit (Istdaten): 10.01.2005 - , Plandaten (Solldaten): 10.01.2005 - 31.12.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Conservation of natural biological resources in Austria: Identification of indigenous whitefish species and extent of potential hybridization with a Baltic species

Laufzeit (Istdaten): 01.01.2006 - , Plandaten (Solldaten): 01.01.2006 - 31.12.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 1, Anzahl der EU-Förderpartner: 0
Kooperations-Partner: Universität Graz; Partnerschaft

Ecological and phylogenetic comparison of bacterial populations inhabiting Antarctic and European lakes

Laufzeit (Istdaten): 01.05.2007 - , Plandaten (Solldaten): 01.01.2007 - 31.12.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 1, Anzahl der EU-Förderpartner: 0
Kooperations-Partner: Department of Microbiology and Ecology and Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia; Partnerschaft

Ecological significance of phenotypic and genotypic variability in freshwater protists - a test case using the oligotrich ciliate Meseres corlissi

Laufzeit (Istdaten): 01.01.2004 - 30.06.2007 , Plandaten (Solldaten): 15.12.2003 - 31.12.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Langfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 1, Anzahl der EU-Förderpartner: 0
Kooperations-Partner: Department Organismic Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Salzburg;
Sub-Auftragnehmerschaft
Geldgeber: Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF); Projektmanagement

Eco-physiological characteristics of two important groups of Betaproteobacteria abundant in freshwater bacterioplankton

Laufzeit (Istdaten): 01.03.2007 - , Plandaten (Solldaten): 01.03.2007 - 31.12.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 1, Anzahl der EU-Förderpartner: 0
Kooperations-Partner: Academy of Sciences CR, Hydrobiological Institute; Partnerschaft

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

14. Liste

Sonstiges Einzelforschungsprojekt

Ecophysiological impact of pH for aquatic protists

Laufzeit (Istdaten): 15.09.2005 - , Plandaten (Solldaten): 01.10.2005 - 30.09.2006, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: eigenfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Kurzfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Genetic and ecological diversity of a narrow phylogenetic group of abundant freshwater bacteria. (FWF19853)

Laufzeit (Istdaten): 01.03.2007 - , Plandaten (Solldaten): 01.03.2007 - 28.02.2009, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 2, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Kooperations-Partner: Academy of Sciences CR, Hydrobiological Institute; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Università di Pisa; Partnerschaft

Habitat specificity of flagellates and ecophysiological significance of microdiversity

Laufzeit (Istdaten): 01.01.2006 - , Plandaten (Solldaten): 01.01.2006 - 31.12.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 4, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Kooperations-Partner: Nanjing Institute of Geography and Limnology; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Sanofi Aventis; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Umweltforschungszentrum Leipzig Halle; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Universität Stuttgart ; Partnerschaft

Integrating BOMOSA cage fish farming system in reservoirs, ponds and temporary water bodies in Eastern Africa

Laufzeit (Istdaten): 01.10.2006 - , Plandaten (Solldaten): 01.10.2006 - 30.09.2009, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Angewandte Forschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 1

Use of cyanobacteria for the production of ethanol

Laufzeit (Istdaten): 01.09.2007 - 31.08.2008 , Plandaten (Solldaten): 01.09.2007 - 31.08.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erzeugung, Speicherung und Verteilung von Energie, Forschungsart: Angewandte Forschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Kurzfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Geldgeber: Cyano BioFuels GmbH; Partnerschaft

Polynucleobacter Genome Project

Laufzeit (Istdaten): 01.08.2005 - , Plandaten (Solldaten): 01.08.2005 - 31.12.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Langfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Geldgeber: Joint Genome Institute (JGI); Partnerschaft

Reduced plankton diversity in extremely acidic mining lakes

Laufzeit (Istdaten): 15.04.2007 - 15.01.2008 , Plandaten (Solldaten): 15.04.2007 - 14.10.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: eigenfinanziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Kurzfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Seasonal climate impact on land-use development in the Austrian Alps during the last 4,000 years - A multi-proxy approach study

Laufzeit (Istdaten): 20.06.2006 - , Plandaten (Solldaten): 20.06.2006 - 30.06.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: eigenfinanziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Toxic and other bioactive PEPTides in CYanobacteria

Laufzeit (Istdaten): 01.12.2002 - , Plandaten (Solldaten): 01.12.2002 - 31.05.2006, Sozio-ökonomische Zielsetzung: N/A, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfianziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Langfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 1

International Post-Graduate Training Programmes in Limnology

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

14. Liste

Sonstiges Einzelforschungsprojekt

Laufzeit (Istdaten): 01.01.2005 - , Plandaten (Solldaten): 01.01.2005 - 31.12.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Angewandte Forschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 3, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Kooperations-Partner: Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Botany; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Egerton University; Partnerschaft
Kooperations-Partner: UNESCO-IHE, Institute for Water Education; Partnerschaft

Late-Pleniglacial climatic and environmental evolution in the southern prealpine lowland: a multi-proxy and quantitative lake sediment core study (Längsee, Austria)(FWF-P18595-B17)

Laufzeit (Istdaten): 01.01.2006 - , Plandaten (Solldaten): 01.01.2006 - 31.12.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Methods for the genetic engineering of cyanobacteria

Laufzeit (Istdaten): 15.11.2006 - 30.04.2007 , Plandaten (Solldaten): 01.11.2006 - 30.04.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung von Handel, Gewerbe und Industrie, Forschungsart: Angewandte Forschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Kurzfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Geldgeber: Cyano Biotech GmbH; Partnerschaft

Microevolution of toxin synthesis in cyanobacteria - FWF18185

Laufzeit (Istdaten): 01.07.2005 - 31.12.2007 , Plandaten (Solldaten): 01.07.2005 - 31.08.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 2, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Kooperations-Partner: Humboldt Universität Berlin, Institut für Biologie (Genetik); Partnerschaft
Kooperations-Partner: University of Hawaii; Partnerschaft

Niche separation and coexistence of chrysophytes in an alpine gradient

Laufzeit (Istdaten): 15.03.2007 - , Plandaten (Solldaten): 01.04.2007 - 31.03.2010, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 6, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Kooperations-Partner: Bigelow Laboratory for Ocean Science; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Institut für Ökologie, Universität Innsbruck; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Lunds universitet; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Universität Potsdam; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Universität Zürich; Partnerschaft
Kooperations-Partner: Veterinärmedizinische Universität Wien; Partnerschaft

Obligate asex in rotifers: Pilot studies

Laufzeit (Istdaten): 01.01.2007 - , Plandaten (Solldaten): 01.01.2007 - 31.01.2009, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der allgemeinen Erweiterung des Wissens, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: eigenfinanziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

Ostracod morphology and systematics on Mondsee (Austria) and Hamza Jezero (Poland) within the international project DecLakes, (European Scientific Foundation-Eurocore-Euroclimate Program).

Laufzeit (Istdaten): 01.02.2005 - , Plandaten (Solldaten): 01.02.2005 - 31.12.2007, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung der Erforschung der Erde, der Meere, der Atmosphäre und des Weltraumes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: ja , Fristigkeit: Mittelfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

allgemeines Forschungsprojekt

Joint Danube Survey 2

Laufzeit (Istdaten): 12.08.2007 - , Plandaten (Solldaten): 12.08.2007 - 31.01.2008, Sozio-ökonomische Zielsetzung: Förderung des Umweltschutzes, Forschungsart: Grundlagenforschung, Finanzierung: drittfinanziert, Interdisziplinarität: nein , Fristigkeit: Kurzfristprojekt, Anzahl der Kooperationspartner: 0, Anzahl der EU-Förderpartner: 0

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

15. Externe Partner von Forschungsprojekten	
	gesamt
Anzahl der externen Partner	25
Kooperationspartner	
· Privatwirtschaft	1
· Universität	10
· Sonstige externe Einheiten	2
· Außeruniversitäre F-Einrichtung	5
· Universitäre Lehr- und Forschungseinheit	7
Herkunftsinstitutionen der Partner	
· im Inland	5
· innerhalb EU (ohne Österreich)	13
· außerhalb EU	7

15. Liste
<p>Academy of Sciences CR, Hydrobiological Institute, Ceske Budejovice, CZECH REPUBLIC, Typ: Außeruniversitäre FuE-Einrichtung</p> <p>Eco-physiological characteristics of two important groups of Betaproteobacteria abundant in freshwater bacterioplankton (Sonstiges Einzelforschungsprojekt) Genetic and ecological diversity of a narrow phylogenetic group of abundant freshwater bacteria. (FWF19853) (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)</p>
<p>Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Botany, Trebon, CZECH REPUBLIC, Typ: Außeruniversitäre FuE-Einrichtung</p> <p>International Post-Graduate Training Programmes in Limnology (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)</p>
<p>Bigelow Laboratory for Ocean Science, Bigelow, UNITED STATES, Typ: Sonstige externe Einheiten</p> <p>Niche separation and coexistence of chrysophytes in an alpine gradient (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)</p>
<p>Department of Microbiology and Ecology and Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, Valencia, SPAIN, Typ: Universitäre Lehr- und Forschungseinheit</p> <p>Ecological and phylogenetic comparison of bacterial populations inhabiting Antarctic and European lakes (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)</p>
<p>Egerton University, Njoro, KENYA, Typ: Universitäre Lehr- und Forschungseinheit</p> <p>International Post-Graduate Training Programmes in Limnology (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)</p>
<p>Fachbereich Organismische Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Salzburg, Salzburg, AUSTRIA, Typ: Universität</p> <p>Patterns and processes of adaptation and tolerance to low pH of freshwater plankton (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)</p>
<p>Humboldt Universität Berlin, Institut für Biologie (Genetik), Berlin, GERMANY, Typ: Universität</p> <p>Microevolution of toxin synthesis in cyanobacteria - FWF18185 (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)</p>
<p>Institut für Ökologie, Universität Innsbruck, Innsbruck, AUSTRIA, Typ: Universitäre Lehr- und</p>

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

15. Liste

Forschungseinheit

Niche separation and coexistence of chrysophytes in an alpine gradient (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

Lunds universitet, Lund, SWEDEN, Typ: Universität

Niche separation and coexistence of chrysophytes in an alpine gradient (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

Nanjing Institute of Geography and Limnology, Nanjing, CHINA, Typ: Sonstige externe Einheiten

Habitat specificity of flagellates and ecophysiological significance of microdiversity (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

National Fisheries Resources Research Institute (NAFIRRI), Jinja, UGANDA, Typ: Außeruniversitäre FuE-Einrichtung

Molecular and chemical characterisation of toxic cyanobacteria in Ugandan freshwater (Dissertationsprojekt)

Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Oslo, NORWAY, Typ: Außeruniversitäre FuE-Einrichtung

Dissertation: Effects of cage fish farming systems on phytoplankton and water quality in small ponds of East Africa (Dissertationsprojekt)

Sanofi Aventis, Frankfurt, GERMANY, Typ: Privatwirtschaft

Habitat specificity of flagellates and ecophysiological significance of microdiversity (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

School of Biological Sciences, Liverpool, UNITED KINGDOM, Typ: Universitäre Lehr- und Forschungseinheit

Allgemeine Limnologische Grundlagenforschung (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

UNESCO-IHE, Institute for Water Education, Delft, NETHERLANDS, Typ: Universitäre Lehr- und Forschungseinheit

International Post-Graduate Training Programmes in Limnology (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

Umweltforschungszentrum Leipzig Halle, Leipzig, GERMANY, Typ: Außeruniversitäre FuE-Einrichtung

Habitat specificity of flagellates and ecophysiological significance of microdiversity (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

University of Hawaii, Honolulu HI, UNITED STATES, Typ: Universitäre Lehr- und Forschungseinheit

Microevolution of toxin synthesis in cyanobacteria - FWF18185 (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

Università di Pisa, Pisa, ITALY, Typ: Universitäre Lehr- und Forschungseinheit

Genetic and ecological diversity of a narrow phylogenetic group of abundant freshwater bacteria. (FWF19853) (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

Universität Graz, Graz, AUSTRIA, Typ: Universität

Conservation of natural biological resources in Austria: Identification of indigenous whitefish species and extent of potential hybridization with a Baltic species (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

15. Liste

Universität Leipzig, Leipzig, GERMANY, Typ: Universität

Patterns and processes of adaptation and tolerance to low pH of freshwater plankton (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

Universität Potsdam, Potsdam, GERMANY, Typ: Universität

Patterns and processes of adaptation and tolerance to low pH of freshwater plankton (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)
Niche separation and coexistence of chrysophytes in an alpine gradient (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

Universität Stuttgart, Stuttgart, GERMANY, Typ: Universität

Habitat specificity of flagellates and ecophysiological significance of microdiversity (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften, Department für Meeresbiologie, Wien, AUSTRIA, Typ: Universität

Dissertation: Effects of cage fish farming systems on phytoplankton and water quality in small ponds of East Africa (Dissertationsprojekt)

Universität Zürich, Zürich, SWITZERLAND, Typ: Universität

Niche separation and coexistence of chrysophytes in an alpine gradient (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien, AUSTRIA, Typ: Universität

Niche separation and coexistence of chrysophytes in an alpine gradient (Sonstiges Einzelforschungsprojekt)

16. Drittmittelzuflüsse und –geber

	gesamt
Drittmittelzuflüsse an FE	948300
davon eingeworben bei:	
• FWF	375077
• Bund (ohne FWF und FFG)	299244
• OeNB	0
• FFG	0
• Bundesländer:	
• Burgenland	0
• Kärnten	0
• Niederösterreich	0
• Oberösterreich	0
• Salzburg	0
• Steiermark	0
• Tirol	0
• Vorarlberg	0
• Wien	0
• Gemeinden:	
• Enns	0
• Krems	0
• EU	154604

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

16. Drittmittelzuflüsse und –geber		gesamt
- Stiftungen		0
- davon im Inland		0
- davon im Ausland		0
- Organisationen		35000
- davon im Inland		35000
- davon im Ausland		0
- Unternehmen		84375
- davon im Inland		0
- davon im Ausland		84375
- Spenden		0

17. Wissenschaftliche Publikationen		gesamt
A) Bücher / Monographien oder Editionen		1
A) Peer-reviewte Beiträge in Fachzeitschriften oder Sammelwerken		24
- davon in indizierten Fachzeitschriften		20
B) Herausgeberschaften		1
B) längere Beiträge ohne Peer-Review in Fachzeitschriften oder Sammelwerken		3
C) Sonstige wissenschaftliche Publikationen		3
Veröffentlichungen von Nachwuchswissenschaftler(inne)n		
- Diplomarbeiten		2
- Dissertationen		0
- Habilitationen		1
Lexikonartikel		0

17. Liste
A) Peer-reviewte Beiträge in Fachzeitschriften oder Sammelwerken
Danielopol, Dan Luca; Griebler, Christian; Gunatilaka, Amara; Hahn, Hans Jürgen; Gibert, Janine et al. [...] (2007) Incorporation of groundwater ecology in environmental policy. In: Quevauviller, Phillip (Hrsg.), Groundwater Science and Policy; Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, S. 671-689. [Danielopol, Dan Luca: HauptautorIn], peer-rev. lang
Dokulil, M.T., Donabaum, K. & Teubner, K. (2007) Modifications in phytoplankton size structure by environmental constraints induced by regime shifts in an urban lake. Hydrobiologia, Bd. 578, S. 59-63. [Dokulil, Martin: HauptautorIn], peer-rev. indiziert lang
Fleituch, Tadeusz1; Leichtfried, Maria2; Polish Academy of Sciences_Institute of Nature Conservation_Cracow1.; Austrian Academy of Sciences_Institute for Limnology2, (2007) Electron transport system (ETS) activity in alder leaf litter in two contrasting headwater streams. International Review of Hydrobiology, Bd. 92, S. 378-391. [Leichtfried, Maria: KoautorIn], peer-rev. indiziert lang
Gächter, Elke; Weisse, Thomas Long-term acclimation of growth rates in the oligotrich freshwater ciliate Meseres corlissi. Verh. Internat. Verein. Limnol., Bd. 30. [Gächter, Elke: KoautorIn; Weisse, Thomas: HauptautorIn], peer-rev. lang
Gassner, Hubert; Mondsee, Institute of Freshwater Ecology Fisheries Management and Lake Research Scharfling 18 5310; Wanzenböck, Josef; Mondsee, Institute for Limnology strasse 9 5310 (01.10.2007) Application of population size structure indices to Austrian whitefish (Coregonus sp.) stocks. (Biology and Management of Coregonid Fishes 2005), S. 377-384. [Wanzenböck, Josef: KoautorIn], peer-rev. indiziert
Iepure, Sanda; Namiotko, Tadek; Danielopol, Dan Luca; Romanian Academy of Sciences Inst Speleol E Racovita.; University of Gdansk Inst Biol, et al. [...] (2007) Evolutionary and taxonomic aspects within the species group Pseudocandona eremita (Vejdovský) (Ostracoda, Candonidae). Hydrobiologia, Bd. 585, S. 159-180. [Danielopol, Dan Luca: KoautorIn], peer-rev. indiziert lang

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

17. Liste

A) Peer-reviewte Beiträge in Fachzeitschriften oder Sammelwerken

- Ishida, Keishi; Christiansen, Guntram; Yoshida, Wesley Y.; Kurmayer, Rainer; Welker, Martin et al. [...] (2007) Biosynthetic pathway and structure analysis of aeruginoside 126A and B, cyanobacterial peptide glycosides bearing an unusual 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole moiety. *Chemistry and Biology*, Bd. 14, S. 565-576. [Christiansen, Guntram: HauptautorIn; Kurmayer, Rainer: KoautorIn], peer-rev. indiziert lang
- Kaiblinger, C., Greisberger, J., Teubner, K. & Dokulil, M.T. (2007) Photosynthetic efficiency as a function of thermal stratification and phytoplankton size structure in an oligotrophic alpine lake. *Hydrobiologia*, Bd. 578, S. 29-36 <<http://www.springerlink.com/content/100271/>>. [Dokulil, Martin: KoautorIn], peer-rev. indiziert lang
- Kamenik, Christian; Szeroczyńska, Krystyna; Schmidt, Roland (2007) Relationships among recent Alpine Cladocera remains and their environment: implications for climate-change studies. *Hydrobiologia*, Bd. 594 (2007), S. 33-46 <DOI 10.1007/s10750-007-9083-4>. [Schmidt, Roland: KoautorIn], peer-rev. indiziert lang
- Leichtfried, Maria; Austrian Academy of Sciences_Institute for Limnology, (2007) The Energy Basis of the Consumer Community in Streams Yesterday, Today and Tomorrow....(Keynote address). *International Review of Hydrobiology*, Bd. 92, S. 363-377. [Leichtfried, Maria: AlleinautorIn], peer-rev. indiziert lang
- M'Erimba, Charles Mwithali¹; Leichtfried, Maria²; Mathooko, Jude Mutuku³; Egerton University_Department of Zoology Njoro Kenya¹; Austrian Academy of Sciences_Institute for Limnology Mondsee², et al. [...] (2007) Particulate Organic Matter (POM) in the Humid and Wet Zones of the Ellegirini River, Kenya. *International Review of Hydrobiology*, Bd. 92, S. 392-401. [Leichtfried, Maria: KoautorIn], peer-rev. indiziert lang
- Naselli-Flores, Luigi; Barone, Rossella; Chorus, Ingrid; Kurmayer, Rainer; University of Palermo Department of Botanical Sciences, et al. [...] (2007) Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid Mediterranean climate: The magnification of a problem. *Environmental Toxicology*, Bd. 22, S. 399-404. [Kurmayer, Rainer: KoautorIn], peer-rev. indiziert lang
- Schiemer, Fritz; Danielopol, Dan Luca; University of Vienna Faculty of Life Sciences Department of Freshwater Ecology.; Austrian Academy of Sciences Institute for Limnology, (2007) Heinz Löffler (1927-2006). *Hydrobiologia*, S. DOI 10.1007/s 10750-007-9093-2. [Danielopol, Dan Luca: KoautorIn], peer-rev. indiziert
- Schmidt, Roland; Roth, Monika; Tessadri, Richard; Weckström, Kaarina; Institute for Limnology Austrian Academy of Sciences, et al. [...] (2007) Disentangling late-Holocene climate and land use impacts on an Austrian alpine lake using seasonal temperature anomalies, ice-cover, sedimentology, and pollen tracers. *Journal of Paleolimnology* <DOI 10.1007/S10933-007-9174-2>. [Schmidt, Roland: HauptautorIn], peer-rev. indiziert lang
- Stelzer, Claus-Peter (2007) Obligate asex in a rotifer and the role of sexual signals. *Journal of Evolutionary Biology*. [Stelzer, Claus-Peter: AlleinautorIn], peer-rev. indiziert
- Stoeck T, Jost S, Boenigk J Multigene phylogenies of clonal Spumella-like strains, a cryptic heterotrophic nanoflagellate, isolated from different geographic regions. *Int J Sys Evol Microbiol*. [Boenigk, Jens: KoautorIn], peer-rev. lang
- Vannini, C., M. Pöckl, G. Petroni, Q.L. Wu, E. Lang, E. Stackebrandt, M. Schrällhammer, P.M. Richardson, and M.W. Hahn. (2007) Endosymbiosis in statu nascendi: Close phylogenetic relationship between obligately endosymbiotic and obligately free-living Polynucleobacter strains (Betaproteobacteria). *Environmental Microbiology*, Bd. 9, S. 347-359. [Hahn, Martin: KoautorIn], peer-rev. indiziert lang
- Weisse, Thomas; Scheffel, Ulrike; Stadler, Peter; Foissner, Wilhelm (2007) Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. II. Response to pH. *Aquatic Microbial Ecology*, Bd. 47, S. 289-297. [Weisse, Thomas: HauptautorIn], peer-rev. indiziert lang
- Weisse, Thomas (2007) Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective. *Biodiversity and Conservation*, Bd. 10.1007/s10531-007-9249-4. [Weisse, Thomas: AlleinautorIn], peer-rev. lang
- Wu, Q.L., G. Zwart, J. Wu, M.P. Kamst-van Agterveld, S. Liu, and M.W. Hahn (2007) Submersed macrophytes play a key role in structuring bacterioplankton community composition in the large, shallow, subtropical Taihu Lake, China. *Environmental Microbiology*, Bd. 9, S. 2765-2774. [Hahn, Martin: KoautorIn], peer-rev. indiziert
- Wu, Q.L., Y. Chen, K. Xu, Z. Liu, and M.W. Hahn (2007) Intra-habitat heterogeneity of microbial food web structure under the regime of eutrophication and sediment resuspension in the large subtropical shallow Lake Taihu, China. *Hydrobiologia*, Bd. 581, S. 241-254. [Hahn, Martin: KoautorIn], peer-rev. indiziert
- Gido, Zolt; Artheau, Malvina; Colin, Jean-Paul; Marmonier, Pierre; Austrian Academy of Sciences Institute for Limnology, et al. [...] (2007) Description of the stygobiotic crustacean *Dolekiella europaea* ge.nov. sp.nov. (Ostracoda, Limnocytheridae) from Southern France. *Vie Milieu*, Bd. 57, S. 109-116. [Danielopol, Dan Luca: HauptautorIn], peer-rev. indiziert lang
- Hahn, M.W., and M. Schauer. (2007) 'Candidatus Aquirestis calciphila' and 'Candidatus Haliscomenobacter calcifugiens', filamentous, planktonic bacteria inhabiting natural lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Bd. 57, S. 936-940. [Hahn, Martin: HauptautorIn], peer-rev. indiziert
- Helesic, Jan; Leichtfried, Maria; Statzner, Bernhard; Schenkova, Jana; Masaryk University_Department of Botany and Zoology_Brno1, et al. [...] (2007) Univ. Prof. Dr. Gernot Bretschko (1938 - 2002), head of the Biological Station Lunz, Austria, 1977 - 2002 (Preface). *International Review of Hydrobiology*, Bd. 92, S. 361-362. [Leichtfried, Maria: KoautorIn], peer-rev. indiziert

B) längere Beiträge ohne Peer-Review in Fachzeitschriften oder Sammelwerken

- Danielopol, Dan Luca; Gross, Martin; Piller, Werner Eduard; Austrian Academy of Sciences Institute for Limnology.; Landesmuseum Joanneum Graz, et al. [...] (2007) Taxonomic diversity of Middle miocene ostracod assemblages - a useful tool for palaeoenvironmental characterisation of the Hainburg area (Vienna Basin). *Joannea Geologie und Paläontologie*, Bd. 9, S. 25-30. [Danielopol, Dan Luca: HauptautorIn], lang

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

17. Liste

B) längere Beiträge ohne Peer-Review in Fachzeitschriften oder Sammelwerken

Danielopol, Dan Luca; Schiemer, Fritz; Austrian Academy of Sciences Institute of Limnology,; University of Vienna Dept Freshwater Ecol, (2007) Notes and news - In memoriam Heinz Löffler (1927-2006). Crustaceana, Bd. 80, S. 1013-1018. [Danielopol, Dan Luca: HauptautorIn], indiziert lang

Weisse, T. (2007) Der Artbegriff bei Bakterien, Ein- und Vielzellern., In: Evolution - Phänomen Leben: Oberösterreichisches Landesmuseum, S. Denisia 20, 149-154. [Weisse, Thomas: AlleinautorIn], lang

C) Sonstige wissenschaftliche Publikationen

Gächter, Elke; Weisse, Thomas (15.07.2007) LONG-TERM ACCLIMATION OF GROWTH RATES IN THE OLIGOTRICH FRESHWATER CILIATE MESERES CORLISSI (Poster). 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Montreal, Canada. [Weisse, Thomas: KoautorIn],

Pipik, Radovan; Minati, Klaus; Buttinger, Robert; Danielopol, Dan Luca; Bystrica, Slovakian Academy of Sciences Banska et al. [...] (2007) Morphological Disparity within Sarmatian and Pannonian Populations of Cyprideis from the Vienna Basin. Joannea Geologie und Paläontologie, Bd. 9, S. 87-88. [Minati, Klaus: KoautorIn; Danielopol, Dan Luca: KoautorIn],

Groben, R., M.W. Hahn, K. Horžák, J. Mergeay, K. Šimek and J. Vrba (2007) Meeting Report: ALTER-Net Workshop about the "Application of Molecular Techniques to Study Biodiversity, Structure and Function of Planktonic Communities in Lakes" at Blanes, Spain, February 15-16, 2007. Protist, Bd. 158, S. 417-421. [Hahn, Martin: KoautorIn], indiziert

Diplomarbeiten

Mayr, Stefan (2007) The pearlfish (*Rutilus meidingeri* (Heckel 1851))- Its habitat use, food, growth and within population variation in morphology in Lake Mondsee, Austria. Diplomarbeit, Paris Lodron Universität Salzburg, Salzburg. [Mayr, Stefan: HauptautorIn],

Ostermaier, Veronika; Österreichische Akademie der Wissenschaften Institut für Limnologie, (2007) Saisonale Abundanzmuster von toxischen Genotypen in Populationen aquatischer Cyanobakterien. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilian Universität München, München. [Kurmayer, Rainer: HerausgeberIn],

Habilitationen

Kurmayer, Rainer (2007) Genetic diversity of toxin production in cyanobacteria. Habilitationsschrift, Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften, Wien, Wien. [Kurmayer, Rainer: AlleinautorIn],

18. Beiträge zu wissenschaftlichen Veranstaltungen

	gesamt
Eingeladene wissenschaftliche Vorträge	12
· davon auf internationalen Veranstaltungen	5
· davon Keynotes und Named Lectures	3
Sonstige wissenschaftliche Vorträge	20
· davon auf internationalen Veranstaltungen	10
Wissenschaftliche Posterpräsentationen	5
· davon auf internationalen Veranstaltungen	2

18. Liste

Eingeladene wissenschaftliche Vorträge

Hahn, M.W. (15.02.2007) Do populations of planktonic freshwater bacteria show recurrent seasonal dynamics?. Vortrag: ALTER-Net workshop „Application of molecular and genetic techniques to assess and monitor the impact of environmental drivers on the biodiversity, structure and function of planktonic communities in lakes“ Blanes, Spain, 15-16th February 2007, Blanes/SPAIN., Typ: Sonstiger eingeladener Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

Hahn, M.W. (24.09.2007) Planktonic bacteria in Chinese and European lakes: Are they different?. Vortrag: China-Germany Symposium on Microbes and the Environment, Beijing/CHINA., Typ: Sonstiger eingeladener Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

Dokulil, Martin (30.10.2007) Long term dynamics and climate impacts on Lakes in Austria, Central Europe. Vortrag: Taal 2007, World Lake Conference, Jaipur/INDIA <<http://www.taal2007.org/>>., Typ: Sonstiger eingeladener Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

, Boenigk (07.09.2007) Summary and future directions. Vortrag: Symposium of Aquatic Microbial Ecology/PORTUGAL., Typ: Sonstiger eingeladener Veranstaltungsbeitrag

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

18. Liste

Eingeladene wissenschaftliche Vorträge

- , Boenigk (07.12.2007) The past and present dilemma with protist species, diversity and ecophysiological differentiation. Vortrag: Seminar Universität Potsdam/GERMANY., Typ: Sonstiger eingeladenener Veranstaltungsbeitrag
- Boenigk, Jens (12.11.2007) The ecophysiological (dis)advantage of being an animal: lessons learnt from protist ecology. Vortrag: Seminar University Innsbruck/AUSTRIA., Typ: Sonstiger eingeladenener Veranstaltungsbeitrag
- Kurmayer Rainer, (20.06.2007) Phylogenetic and geographic distribution of transposases inactivating the synthesis of the toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria. Vortrag: Mycotoxins and Phycotoxins, Waterville, Maine/UNITED STATES <<http://www.grc.org/programs.aspx?year=2007&program=mycotox>>., Typ: Sonstiger eingeladenener Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)
- Weisse, Thomas (04.05.2007) Ecophysiology and biogeography of freshwater ciliates . Vortrag: Seminar series, Zürich/SWITZERLAND., Typ: Sonstiger eingeladenener Veranstaltungsbeitrag
- Weisse, Thomas (10.12.2007) Ökologie und Diversität von Süßwasser-Ciliaten. Vortrag: Colloquium a. d. Univ. Leipzig, Leipzig/GERMANY., Typ: Sonstiger eingeladenener Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

Eingeladene wissenschaftliche Vorträge: Keynotes and Named Lectures

- Dokulil, Martin (17.07.2007) Climate impacts on Lakes in Central Europe. Vortrag: SEFS5, Palermo/ITALY <<http://www.sefs5.it/pagina1280.html>>., Typ: Keynote
- Rainer, Kurmayer (09.07.2007) Cyanobacteria and toxin production in freshwater: research priorities from a limnological perspective. Vortrag: SEFS-5, Symposium for European Freshwater Sciences, Palermo/ITALY <<http://www.sefs5.it>>., Typ: Keynote
- Weisse, T.; Scheffel, U.; Stadler, P. (24.07.2007) Significance of pH as environmental factor limiting the distribution of freshwater protists. Vortrag: V EUROPEAN CONGRESS OF PROTISTOLOGY and XI EUROPEAN CONFERENCE ON CILIATE BIOLOGY, St. Petersburg/RUSSIAN FEDERATION., Typ: Keynote

Sonstige wissenschaftliche Vorträge

- Huber, Kerstin; Klee, Rolf; Schmidt, Roland (14.06.2007) Climatic and environmental reconstructions of the past 20,000 years with the example of two Austrian lakes. Vortrag: Palaeoecology Workshop: From modern to ancient lakes, Mondsee/AUSTRIA., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)
- Finster, Martin; Wanzenböck, Josef (13.09.2007) Performance of two active sampling gears to follow density dynamics of 0+ European whitefish (*Coregonus sp. L.*, 1758). Vortrag: FSMALR 2007 - Fish Stock Assessment Methods for Lakes and Reservoirs, Ceske Budejovice/CZECH REPUBLIC <<http://www.fsamlr2007.czweb.org/index.htm>>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)
- Guntram, Christiansen (07.08.2007) McyT, a type II thioesterase exclusively found in the microcystin synthetase gene cluster. Vortrag: ICTC 7th-International Conference on Toxic Cyanobacteria, Rio de Janeiro/BRAZIL <<http://www.biof.ufrj.br/cyano>>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag
- , Boenigk (12.09.2007) Distribution pattern in protists: facts and fiction . Vortrag: Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie/GERMANY., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag
- , Boenigk (24.09.2007) The ecophysiological (dis)advantage of being an animal: a case study on protozoa. Vortrag: Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft /GERMANY., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)
- , Boenigk (04.09.2007) Colourless algae: the ecophysiological (dis)advantage of being a plant. Vortrag: Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft/GERMANY., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag
- , Boenigk (27.09.2007) Differential impact of groundwater and surface run-off on eukaryotic microbial diversity in a mountain stream. Vortrag: Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie/GERMANY., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag
- Danielopol, Dan Luca; Knobloch, Josef; Baltanás, Angel (15.06.2007) Between real and virtual ostracod valves, the contribution of the computer package Morphomatica 1.6 . Vortrag: Workshop "From Modern to Ancient Lakes" Limnological Institute, Austrian Academy of Sciences, Mondsee 14 – 15 June 2007./AUSTRIA., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)
- Huber, Kerstin; Klee, Rolf; Schmidt, Roland (24.03.2007) Distribution and morphological variability of *Cyclotella*-taxa in the late glacial Längsee (Austria). Vortrag: 1st Central European Diatom Meeting (1st CE-Diatom), Berlin/GERMANY., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag
- Mayr, Stefan (13.09.2007) Habitat use and food of the pearlfish, *Rutilus meidingeri* (Heckel 1851), in Lake Mondsee, Austria. Vortrag: CEI XII European Congress of Ichthyology, Dubrovnik/CROATIA (local name: Hrvatska) <<http://www.biol.pmf.hr/~ecixii/>>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag
- Okello, William (02.12.2007) Toxic cyanobacteria occurrence in Ugandan freshwater bodies. Vortrag: Chemrawn XII, The role of chemistry in sustainable agriculture and human well-being in Africa/SOUTH AFRICA., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag
- Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (14.08.2007) Assessment of morphological characters, hybrid compatibility and viability of *Coregonus renke* Kottelat (1997) and *Coregonus maraena* Bloch (1779). Vortrag: SIL 2007 - 30th Congress of the International Association of Theoretical and

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

18. Liste

Sonstige wissenschaftliche Vorträge

Applied Limnology, Montreal/CANADA <www.sil2007.org>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

Rainer, Kurmayer (07.08.2007) Distribution and abundance of insertion elements inactivating the synthesis of the toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria . Vortrag: ICTC 7th-International Conference on Toxic Cyanobacteria, Rio de Janeiro/BRAZIL <<http://www.biof.ufrj.br/cyano>>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag

Rainer, Kurmayer (27.10.2007) Über den Einfluss von Transposablen Elementen auf die Variation in der Produktion im Sekundärstoffwechsel bei Cyanobakterien. Vortrag: SIL Austria Jahrestreffen (SIL Austria), Lunz am See/AUSTRIA <<http://www.uibk.ac.at/sil-austria/>>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag

Schmidt, Roland (13.07.2007) Holocene climate-driven environmental changes in an Austrian Alpine lake inferred from sedimentological and calibrated biological proxies. Vortrag: 4th International Limnogeology Congress (ILIC 2007, Barcelona), Barcelona/SPAIN., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

Stelzer, Claus-Peter (16.08.2007) Mechanisms of obligate asexuality in *Brachionus calyciflorus* (Monogononta, Rotifera). Vortrag: 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Montreal/CANADA <<http://www.sil2007.uqam.ca/welcome.htm>>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

Stelzer, Claus-Peter (22.09.2007) Fitness consequences of obligate asexuality in a cyclical parthenogen. Vortrag: 100. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Cologne/GERMANY <<http://www.dzg-ev.de/de/jahrestagung/jahrestagung.php>>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

Wanzenböck, Josef; Finster, Martin (15.09.2007) Assessment of juvenile whitefish densities (*Coregonus lavaretus* L.) in a deep prealpine lake using trawling and hydroacoustics. Vortrag: FSMALR 2007 - Fish Stock Assessment Methods for Lakes and Reservoirs, Ceske Budejovice/CZECH REPUBLIC <<http://www.fsamlr2007.czweb.org/index.htm>>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

Weisse, Thomas; Gächter, Elke; Müller, Helga; Scheffel, Ulrike; Stadler, Peter et al. [...] (22.02.2007) *Meseres corlissi*: ökophysiologische Differenzierung innerhalb einer Art. Vortrag: 26. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Salzburg/AUSTRIA., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag

Weisse, Thomas (16.08.2007) *Meseres corlissi*, a cosmopolitan ciliate with limited dispersal and biogeography. Vortrag: 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Montreal/CANADA., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

Wissenschaftliche Posterpräsentationen

Gächter, Elke; Weisse, Thomas (22.02.2007) Functional response and selective feeding of the filter feeding ciliate *Meseres corlissi*. Posterpräsentation: 26. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Salzburg/AUSTRIA., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag

Carole, Molitor (14.08.2007) Characterization of transposases affecting the synthesis of the toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria . Posterpräsentation: 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Montreal/CANADA <<http://www.sil2007.uqam.ca/>>., Typ: ALT: Ausgewählter Beitrag (Selected/refereed lecture) (internationale Veranstaltung)

Moser, Michael; Weisse, Thomas (27.10.2007) Der 'rote See' von Langau (NÖ) - Untersuchungen am sauersten See Österreichs . Posterpräsentation: SIL-Austria Jahrestagung (WasserKluster Lunz), Lunz am See/AUSTRIA., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag

Stelzer, Claus-Peter (24.08.2007) Fitness consequences of the transition to obligate asexuality in a cyclical parthenogen. Posterpräsentation: 11th Congress of The European Society for Evolutionary Biology, Uppsala/SWEDEN <<http://www-conference.slu.se/eseb2007/index.html>>., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag

Weisse, Thomas (13.08.2007) LONG-TERM ACCLIMATION OF GROWTH RATES IN THE OLIGOTRICH FRESHWATER CILIATE *MESERES CORLISSI* . Posterpräsentation: 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Montreal/CANADA., Typ: Sonstiger Veranstaltungsbeitrag (internationale Veranstaltung)

19. Schutzrechte

	gesamt
Gesamtanzahl der Patente	0
Gesamtanzahl der neu freigegebenen Softwareprodukte	0

19. Liste

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

20. Organisation wissenschaftlicher Veranstaltungen	
	gesamt
Anzahl der durch Mitarbeiter(innen) (mit-)organisierten wissenschaftlichen Veranstaltungen	3
· internationale Veranstaltungen	2
· Kongress/Symposium/Konferenz/Tagung	1
· Workshop/Seminar	2

20. Liste
<p>Kongress/Symposium/Konferenz/Tagung</p> <p>SIL-Austria Jahrestagung (26.10.2007 - 28.10.2007)</p> <p>Leichtfried, Maria (w); (Mit)OrganisatorIn</p>
<p>Workshop/Seminar</p> <p>Ostracoden aus der Paratethys und dem Pannonsee (06.09.2007 - 06.09.2007)</p> <p>Danielopol, Dan Luca (m); (Mit)OrganisatorIn</p> <p>Von modernen und urtümlichen Seen (14.06.2007 - 15.06.2007)</p> <p>Danielopol, Dan Luca (m); (Mit)OrganisatorIn Schmidt, Roland (m); (Mit)OrganisatorIn</p>

21. Populärwissenschaftliche Veröffentlichungen	
	gesamt
von Mitarbeitern veröffentlichte populärwissenschaftliche Werke	1
davon	
· sonstige populärwissenschaftliche Veröffentlichungen oder sonstige Lehrmaterialien	1

21. Liste
<p>sonstige populärwissenschaftliche Veröffentlichungen oder sonstige Lehrmaterialien</p> <p>Weisse, T. (2007) Limnology in Austria and at Mondsee - Going Against the Trend?. SILnews, Bd. 51, S. 7-8. [Weisse, Thomas: AlleinautorIn]</p>

22. Populärwissenschaftliche Vorträge und Präsentationen	
	gesamt
Populärwissenschaftliche Vorträge und Posterpräsentationen	3

22. Liste
<p>Vortrag</p> <p>Winkler, Gerold (19.11.2007) Ökologie der Entwicklungsländer, Ökologie & Management von Binnengewässern in Entwicklungsländern: Herausforderung für Wissenschaft & Gesellschaft. Vortrag: Vorlesungen Universität Wien, Wien/AUSTRIA.</p> <p>Winkler, Gerold (24.04.2007) Roundtable "Austria Movin" - Plattform für österreichische Akteure im Bereich "Natural Resource Management" und Zusammenarbeit mit Entwicklungsländern. Vortrag: Workshop (Universität für Bodenkultur), Wien/AUSTRIA.</p> <p>Winkler, Gerold (28.11.2007) Planungsworkshop BOMOSA Aktivitäten für 2008, "Environmental Impact Studies". Vortrag: Environmental Impact Studies, Mondsee/AUSTRIA.</p>

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

22. Liste

Wirkungen der Forschungseinrichtung

23. Lehrveranstaltungen an Universitäten und Fachhochschulen

	gesamt
Anzahl der von Mitarbeiter(innen) gehaltenen Lehrveranstaltungen	17
- Lehrveranstaltung an Universität	16
- Spezialvorlesung	1

23. Liste

Lehrveranstaltung an Universität

Biologie und Ökologie von Protisten (12.11.2007 - 15.11.2007), Semester: Wintersemester 2007/2008

Boenigk, Jens (m); (Mit)OrganisatorIn

VU Evolution und Diversität (WS07/08) (Universität Salzburg, 01.10.2007) (01.10.2007 - 31.03.2008), Semester: Wintersemester 2007/2008

Hahn, Martin (m); (Mit)OrganisatorIn

Einführung in die Angewandte Limnologie (10.10.2007 - 05.12.2007), Semester: Wintersemester 2007/2008

Weisse, Thomas (m); (Mit)OrganisatorIn

Einführung in die Angewandte Limnologie - Eutrophierung, Versauerung, Verunreinigung (01.10.2007 - 31.01.2008), Semester: Wintersemester 2007/2008

Dokulil, Martin (m); (Mit)OrganisatorIn

Lake Ecology 1 IPGL 2007 (07.05.2007 - 25.05.2007), Semester: Sommersemester 2007

Boenigk, Jens (m); ReferentIn
Hahn, Martin (m); ReferentIn
Weisse, Thomas (m); ReferentIn
Winkler, Gerold (m); (Mit)OrganisatorIn

Lake Ecology 2 IPGL 2007 (29.05.2007 - 15.06.2007), Semester: Sommersemester 2007

Wanzenböck, Josef (m); ReferentIn
Wanzenböck, Sabine (w); (Mit)OrganisatorIn
Winkler, Gerold (m); (Mit)OrganisatorIn

Methoden der aquatischen Ökologie (24.04.2007 - 15.05.2007), Semester: Sommersemester 2007

Weisse, Thomas (m); (Mit)OrganisatorIn

Ökologie der Entwicklungsländer, Ökologie & Management von Binnengewässern in Entwicklungsländern: Herausforderung für Wissenschaft & Gesellschaft (01.10.2007 - 31.01.2008), Semester: Wintersemester 2007/2008

Winkler, Gerold (m); ReferentIn

Ökologie und Physiologie von Cyanobakterien (19.12.2007 - 21.12.2007), Semester: Wintersemester 2007/2008

Kurmayer, Rainer (m); ReferentIn

Praktikum: Aquatische Tierökologie Kurs 2 (11.06.2007 - 13.06.2007), Semester: Sommersemester 2007

Pamminger-Lahnsteiner, Barbara (w, NW); (Mit)OrganisatorIn
Wanzenböck, Josef (m); (Mit)OrganisatorIn

2. Tabellarische Darstellung und wissenschaftliche Kennzahlen

23. Liste

Lehrveranstaltung an Universität

Produktionsbiologie in aquatischen Systemen (01.07.2007 - 06.07.2007), Semester: Sommersemester 2007

Dokulil, Martin (m); (Mit)OrganisatorIn

Tropical Limnology (17.09.2007 - 05.10.2007), Semester: Sommersemester 2007

Winkler, Gerold (m); (Mit)OrganisatorIn, ReferentIn

Vorlesung Fischökologie (01.01.2007 - 28.02.2007), Semester: Wintersemester 2006/2007

Wanzenböck, Josef (m); (Mit)OrganisatorIn

Vorlesung Fischökologie (01.10.2007 - 31.01.2008), Semester: Wintersemester 2007/2008

Wanzenböck, Josef (m); (Mit)OrganisatorIn

VU Evolution und Diversität (Kurs 2) (12.12.2007 - 05.02.2008), Semester: Wintersemester 2007/2008

Stelzer, Claus-Peter (m); (Mit)OrganisatorIn

Weisse, Thomas (m); (Mit)OrganisatorIn

VU Mikrobielle Ökologie (WS06/07) (29.01.2007 - 03.02.2007), Semester: Wintersemester 2006/2007

Hahn, Martin (m); (Mit)OrganisatorIn

Spezialvorlesung

IPGL Kursmodul, Toxic cyanobacteria in water, 2 Tage, 2007 (14.06.2007 - 15.06.2007), Semester: Sommersemester 2007

Kurmayer, Rainer (m); ReferentIn

24. Preise und Auszeichnungen

gesamt

Anzahl der an Mitarbeiter(innen) vergebenen **Preise und Auszeichnungen**

0

24. Liste

3. ERLÄUTERUNGEN ZUR FINANZIERUNG 2007–2013

Erläuterungen zum Rechnungsabschluss 2007

Die Ausgaben des Ordinario betragen nach dem vorläufigen RA 2007 1.61 Mio € und waren damit um ca. 1% geringer als die Einnahmen. Die Ausgaben aus Drittmitteln betragen insgesamt etwas mehr als 1 Mio € und erreichten damit wie in den vergangenen Jahren ca. 40% des Gesamtbudgets. In den Budgetblättern im Anhang sowie in der Tab. 16 des Teil 2 dieses Jahresberichts wurden die Sachmittel und sonstigen Einnahmen aus den ad personam-Projekten (vorwiegend FWF-Projekte), die nicht über die ÖAW abgerechnet wurden, nicht berücksichtigt. Ebenfalls nicht berücksichtigt wurden in den Tabellen die Personalkosten für die zwei beamteten wissenschaftlichen Mitarbeiter (Fixkosten „Lebende Subventionen“).

The expenses of the ordinary budget amounted to 1.61 Mio € in 2007, i.e. they were approximately 1% lower than the revenue. Extramural funds contributed slightly more than 1 Mio € or approximately 40% to the total budget, similar to the previous years. Note that the following tables (in the Annex) do not consider expenses from ad personam projects that were not managed by the Academy (mainly projects funded by the Austrian Science Fund, FWF). Similarly, personnel costs for the two scientific civil servants (“living subsidies“) do not show up in these tables.

Erläuterungen zum Budgetvoranschlag 2008

Die in der Tabelle im Anhang angeführten Einnahmen des Ordinario in Höhe von 1.6397 Mio € berücksichtigen nicht die standortbezogenen Kosten in der Höhe von 47.255 €, die ab heuer zentral budgetiert werden. Die etwas höheren Ausgaben resultieren aus den im Zuge der Umbaumaßnahmen unvermeidlichen anfallenden Sonderausgaben und können aus der Verwahrung gedeckt werden.

The preliminary budget 2008 (1.6397 Mio €) does not consider costs for maintenance (47.255 €) that will be managed centrally by the Academy, beginning with the current year. The expenses listed are somewhat higher than the revenue, due to unavoidable extra costs in the course of the expansion of the Institute's building at Mondsee. Those extra costs can be covered by the surplus resulting from previous years.

Erläuterungen zum Budgetantrag 2009-2013

Der Budgetantrag geht von einer durchschnittlichen Erhöhung der Ausgaben von ca. 3.4% p.a. aus. Dabei ist eine scheinbare Erhöhung der Personalkosten berücksichtigt, die daraus resultiert, dass die Fixkosten für eine „lebende Subvention“ (Stelle Humpesch) ab 2009 im Ordinario budgetiert wurden. Tatsächlich werden die Personalkosten 2009 nicht höher als 2008 sein und nach 2009 vermutlich nur geringfügig steigen, wenn durch Pensionierung ausscheidende Kollegen durch jüngere ersetzt werden. Ein ausgeglichener Haushalt lässt sich in den Jahren 2009-2013 nur durch Rückgriff auf die Verwahrungen oder durch Verzicht auf Investitionen erreichen. Um die Arbeiten im bisherigen Umfang fortführen zu können, wird eine jährliche Steigerung des Ordinario in Höhe von ca. 3.3% erforderlich sein.

The budget proposal 2009-2013 is based upon an average increase of 3.4% p.a.; this increase includes a seeming raise in the costs for personnel, mainly resulting from the

fact that the costs for one of the two “living subsidies” will be covered by the ordinary budget in 2009 and thereafter. The real costs for personnel will not be higher in 2009 than in 2008 and presumably increase only slightly after 2009, when the posts of colleagues retiring will be filled with younger colleagues. Please note that a balanced budget in 2009-2013 can only be reached if the current surplus will be used or if the Institute refrains from any investment. To ensure that the research activities can be continued at the present level requires an annual increase of approximately 3.3% p.a..

ANHANG:

BUDGETBLÄTTER 2007-2013

Finanzierungsübersicht 1 2120: Limnologie

Text	2006	2007	2007	Abweichung	2008	2009
	RA (endgültig)	RA (vorläufig)	BVA	Soll-Ist in %	BVA	BA

I. G E S A M T

Saldoübertrag Vorjahr gesamt	189,262	386,790	393,300	-1.68	126,100	251,800
EINNAHMEN gesamt	2,526,924	2,286,346	2,681,200	-17.27	2,699,700	2,746,700
Budget inkl. Drittmittel	2,456,581	2,188,681	2,681,200	-22.50	2,699,700	2,746,700
Sonstige Einnahmen	70,343	97,665	0	100.00	0	0
AUSGABEN gesamt	-2,291,345	-2,474,142	-2,703,700	-9.28	-2,566,000	-2,804,500
Investitionen	-33,674	-130,216	-149,000	-14.43	-103,000	-188,500
Personalaufwand	-1,721,657	-1,743,126	-1,910,000	-9.57	-1,861,800	-1,989,200
Werkverträge, Freie Dienstverträge	-95,686	-94,263	-85,000	9.83	-80,000	-80,000
Materialaufwand	-147,920	-175,653	-250,400	-42.55	-189,600	-203,400
Betriebsaufwand	-292,408	-330,884	-309,300	6.52	-331,600	-343,400
Interne Verrechnung	-30,050	-59,902	0	100.00	0	0
Budgetumbuchungen	-8,000	-13,000	-8,000	38.46	-8,000	-8,100
Saldoübertrag Folgejahr	386,790	126,093	362,800	-187.72	251,800	185,900

II. O R D I N A R I O (inkl. Investitionsbudget und Mitteln des Rats FTE)

Saldoübertrag Vorjahr	308,480	459,672	462,600	-0.64	486,200	411,900
EINNAHMEN gesamt	1,662,581	1,633,156	1,624,000	0.56	1,639,700	1,696,700
Ordentliches Budget	1,624,000	1,624,000	1,624,000	0.00	1,639,700	1,696,700
Sonstige Einnahmen	38,581	9,156	0	100.00	0	0
AUSGABEN gesamt	-1,510,825	-1,608,190	-1,715,800	-6.69	-1,706,000	-1,923,500
Investitionen	-33,674	-122,202	-149,000	-21.93	-103,000	-188,500
Personalaufwand	-1,194,922	-1,199,347	-1,220,000	-1.72	-1,261,800	-1,368,200
Werkverträge, Freie Dienstverträge	-17,459	-11,283	-25,000	-121.58	-20,000	-20,000
Materialaufwand	-117,617	-121,935	-140,400	-15.14	-89,600	-103,400
Betriebsaufwand	-147,154	-153,423	-181,400	-18.23	-231,600	-243,400
Interne Verrechnung	7,415	9,541	0	100.00	0	0
Budgetumbuchungen	-7,979	-8,000	-8,000	0.00	-8,000	-8,100
Saldoübertrag Folgejahr	459,672	486,179	362,800	25.38	411,900	177,000

III. D R I T T M I T T E L

Saldoübertrag Vorjahr	-119,218	-72,882	-69,300	4.91	-360,100	-160,100
EINNAHMEN gesamt	864,342	653,190	1,057,200	-61.85	1,060,000	1,050,000
Drittmittel	832,581	564,681	1,057,200	-87.22	1,060,000	1,050,000
Sonstige Einnahmen	31,761	88,509	0	100.00	0	0
AUSGABEN gesamt	-780,520	-865,952	-987,900	-14.08	-860,000	-881,000
Investitionen	0	-8,014	0	100.00	0	0
Personalaufwand	-526,736	-543,778	-690,000	-26.89	-600,000	-621,000
Werkverträge, Freie Dienstverträge	-78,227	-82,981	-60,000	27.69	-60,000	-60,000
Materialaufwand	-30,303	-53,718	-110,000	-104.77	-100,000	-100,000
Betriebsaufwand	-145,253	-177,461	-127,900	27.93	-100,000	-100,000
Interne Verrechnung	-37,465	-69,443	0	100.00	0	0
Budgetumbuchungen	-21	-5,000	0	100.00	0	0
Saldoübertrag Folgejahr	-72,882	-360,086	0	100.00	-160,100	8,900

Text	2006	2007	2007	Abweichung	2008	2009
	RA (endgültig)	RA (vorläufig)	BVA	Soll-Ist in %	BVA	BA

Saldoübertrag Vorjahr	308.480	459.672	462.600	-0.64	486.200	411.900
------------------------------	----------------	----------------	----------------	--------------	----------------	----------------

I. EINNAHMEN GESAMT	1.662.581	1.633.156	1.624.000	0.56	1.639.700	1.696.700
Ordentliches Budget	1.624.000	1.624.000	1.624.000	0.00	1.639.700	1.696.700
Sonstige Einnahmen	38.580	9.153	0	100.00	0	0
Finanzerträge	2	3	0	100.00	0	0
II. AUSGABEN GESAMT	-1.513.448	-1.608.190	-1.715.800	-6.69	-1.706.000	-1.923.500
1. INVESTITIONEN	-36.296	-122.202	-149.000	-21.93	-103.000	-188.500
Wissenschaftliche Geräte	-26.489	-68.776	-120.000	-74.48	-70.000	-120.000
Bauteile wissensch. Geräte	1.887	-6.886	-10.000	-45.22	-15.000	-7.000
EDV- und Bürogeräte	812	-2.081	-8.000	-284.47	-3.000	-10.000
Software	-3.515	-8.511	-7.000	17.75	-9.000	-9.000
Maschinelle Ausstattung	-1.185	-499	-2.000	-300.80	-2.000	-2.500
Einrichtungsgegenstände	-11.784	-3.569	-2.000	43.96	-4.000	-10.000
Fahrzeuge	3.978	-31.880	0	100.00	0	-30.000
2. PERSONALAUFWAND	-1.195.022	-1.199.347	-1.223.000	-1.97	-1.264.800	-1.371.700
Wissenschaftler	-644.680	-629.414	-646.000	-2.64	-629.700	-704.500
Technisches Personal	-459.353	-477.898	-488.000	-2.11	-536.500	-552.600
Administratives Personal	-59.081	-59.414	-53.000	10.80	-61.100	-75.600
Reinigungspersonal	-31.807	-32.621	-33.000	-1.16	-34.500	-35.500
Sonstiger Personalaufwand	-101	0	-3.000	0.00	-3.000	-3.500
3. WERKVERTRÄGE, FREIE	-17.459	-11.283	-25.000	-121.58	-20.000	-20.000
Werkverträge für Forschung	-11.502	-2.782	0	100.00	0	0
Freie Dienstverträge Forschung	-5.957	-8.501	-25.000	-194.09	-20.000	-20.000
4. MATERIALAUFWAND	-117.617	-121.935	-140.400	-15.14	-89.600	-103.400
Adaptierungen Gebäude	0	-420	-100	76.19	-400	-100
Wissensch. Geräte und Bauteile	-767	-1.589	-4.500	-183.11	-4.000	-2.500
EDV-Verbrauchsmaterial, Software	-5.973	-4.033	-9.500	-135.57	-7.000	-11.500
Maschinelle Ausstattung	-2.804	-4.280	-4.500	-5.15	-5.100	-4.700
Einrichtung und Bürogeräte	-421	-5.203	-3.000	42.34	-3.500	-11.000
Wissenschaftlicher Bedarf	-42.474	-45.604	-48.900	-7.23	-50.400	-53.900
Nichtwissenschaftlicher Bedarf	-15.359	-16.259	-17.400	-7.02	-18.000	-18.500
Energiebezug, Betriebsstoffe	-49.818	-44.547	-52.500	-17.85	-1.200	-1.200
5. BETRIEBSAUFWAND	-147.053	-153.423	-178.400	-16.28	-228.600	-239.900
Gebäude, Unterbringung	-16.623	-11.553	-24.800	-114.66	-60.900	-65.900
Wissenschaftliche Geräte	-10.991	-15.429	-13.900	9.91	-16.500	-16.800
EDV-Anlagen	0	0	-1.300	0.00	-1.300	-1.300
Maschinelle Ausstattung	-154	-290	-200	31.00	-300	-300
Einrichtungsgegenstände	-34	0	-200	0.00	-200	-200
Bürogeräte	-8.834	-8.454	-6.500	23.11	-8.600	-8.700
Fahrzeuge	-16.293	-15.178	-16.500	-8.71	-15.300	-16.400
Betriebsstoffe	-4.388	-5.030	-5.000	0.60	-5.500	-5.600
Reinigung durch Dritte	-1.443	-1.287	-1.600	-24.32	-1.600	-1.700
Sonst. Leistungen durch Dritte	-9.659	-13	-7.200	-53.751.91	-6.700	-6.700
Reise- und Transportkosten	-9.387	-7.045	-13.000	-84.53	-14.000	-15.000
Teilnahme an wiss. Veranstaltungen	-9.705	-25.939	-13.000	49.88	-22.000	-23.000
Kommunikationsaufwand	-21.938	-20.611	-24.300	-17.90	-22.800	-24.100
Bürobedarf	-4.874	-3.531	-6.700	-89.75	-5.300	-6.100
Bücher, Zeitschriften	-24.907	-23.666	-32.500	-37.33	-31.500	-32.700
Repräsentationsaufwand	-1.637	-4.281	-5.200	-21.48	-5.500	-4.800
Einladung wissensch. Gäste	-2.586	-7.808	-4.200	46.21	-8.200	-8.200
Versicherungen	-803	-803	-1.000	-24.59	-1.000	-1.000
Sonst. Aufwand und Spesen	-2.797	-2.505	-1.300	48.10	-1.400	-1.400
6. FINANZAUFWAND	0	-1	0	100.00	0	0
III. INTERNE VERRECHNUNG	7.415	9.541	0	100.00	0	0
IV. BUDGETUMBUCHUNGEN	-7.979	-8.000	-8.000	0.00	-8.000	-8.100
Saldoübertrag Folgejahr	457,050	486,179	362,800	25.38	411,900	177,000

Finanzierungsübersicht 2

2120: Limnologie

Text		2006	2007	2007	2008	2009
		RA (endgültig)	RA (vorläufig)	BVA	BVA	BA
Saldoübertrag Vorjahr		308,480	459,672	462,600	486,200	411,900
I.	EINNAHMEN GESAMT	1,662,581	1,633,156	1,624,000	1,639,700	1,696,700
1.	Ordentliches Budget					
40000	Ordentliches Budget	1,624,000	1,624,000	1,624,000	1,639,700	1,696,700
		1,624,000	1,624,000	1,624,000	1,639,700	1,696,700
2.	Sonstige Einnahmen					
48000	Sonstige Erlöse	3,090	822	0	0	0
48400	Erlöse aus Verkauf von Sachanlagen	35,400	7,600	0	0	0
48650	Erlöse aus Prüfaufträgen	0	731	0	0	0
48800	Versicherungsvergütungen	90	0	0	0	0
		38,580	9,153			
3.	Finanzerträge					
81100	Zinsertrag Banken	2	3	0	0	0
		2	3			
II.	AUSGABEN GESAMT	-1,513,447	-1,608,189	-1,715,800	-1,706,000	-1,923,500
1.	INVESTITIONEN	-36,296	-122,202	-149,000	-103,000	-188,500
1.1.	Gebäude, baul. Investitionen					
02101	Kumulierte AfA Bebaute Grundstücke	77,447	0	0	0	0
70200	AfA Bebaute Grundstücke etc.	-77,447	0	0	0	0
1.2.	Wissenschaftliche Geräte					
04010	Wissenschaftliche Geräte	270,753	-68,776	-120,000	-70,000	-120,000
04011	Kumulierte AfA wissenschaftliche Geräte	-238,737	0	0	0	0
70400	AfA Wissenschaftliche Geräte etc.	-58,505	0	0	0	0
		-26,489	-68,776	-120,000	-70,000	-120,000
1.3.	Bauteile wissensch. Geräte					
04020	Bauteile wissenschaftliche Geräte	0	-6,886	-10,000	-15,000	-7,000
04021	Kumulierte AfA Bauteile wissenschaftliche Geräte	1,887	0	0	0	0
		1,887	-6,886	-10,000	-15,000	-7,000
1.4.	EDV- und Bürogeräte					
06200	EDV- und Bürogeräte	2,745	-2,081	-8,000	-3,000	-10,000
06201	Kumulierte AfA EDV- und Bürogeräte	-1,933	0	0	0	0
		812	-2,081	-8,000	-3,000	-10,000
1.5.	Software					
01200	Software	-893	-8,511	-7,000	-9,000	-9,000
70100	AfA Immaterielle Vermögensgegenstände	-2,622	0	0	0	0
		-3,515	-8,511	-7,000	-9,000	-9,000
1.6.	Maschinelle Ausstattung					
05000	Maschinelle Ausstattung und	-1,185	-499	-2,000	-2,000	-2,500
05001	Kumulierte AfA Maschinelle Ausstattung	7,048	0	0	0	0
70500	AfA Maschinelle Ausstattung	-7,048	0	0	0	0
		-1,185	-499	-2,000	-2,000	-2,500
1.7.	Einrichtungsgegenstände					
06100	Einrichtungsgegenstände	-534	-3,569	-2,000	-4,000	-10,000
06101	Kumulierte AfA Einrichtungsgegenstände	2,166	0	0	0	0
70600	AfA Betriebs- und Geschäftsausstattung	-13,416	0	0	0	0
		-11,784	-3,569	-2,000	-4,000	-10,000
1.8.	Fahrzeuge					

06301	Kumulierte AfA Fahrzeuge (nicht PKW, LKW)	320	0	0	0	0
06310	Personenkraftwagen	0	-31,880	0	0	-30,000
06311	Kumulierte AfA Personenkraftwagen	3,658	0	0	0	0
		3,978	-31,880			-30,000

1.9. Anzahlungen für Investitionen

1.10 Sonstige Investitionen

2.	PERSONALAUFWAND	-1,195,022	-1,199,347	-1,223,000	-1,264,800	-1,371,700
2.1.	Wissenschaftler					
61100	Wissenschaftler - Bruttogehalt	-514,067	-502,251	-645,000	-629,700	-704,500
61110	Wissenschaftler - Dienstgeberbeitrag SV	-89,648	-88,859	0	0	0
61111	Wissenschaftler - MVK-Beiträge	-246	-636	0	0	0
61120	Wissenschaftler - FLAG	-12,426	-12,229	0	0	0
61140	Wissenschaftler - Vorsorge Abfertigung	-18,348	-17,073	0	0	0
61150	Grundbeitrag Pensionskasse	-5,821	-5,152	0	0	0
61151	Zusatzbeitrag Pensionskasse	-4,125	-3,214	0	0	0
99902	Geldumbuchungen Personalaufwand (ITA)	0	0	-1,000	0	0
		-644,680	-629,414	-646,000	-629,700	-704,500
2.2.	Technisches Personal					
61200	Technisches Personal - Bruttogehalt	-353,052	-369,043	-488,000	-536,500	-552,600
61210	Technisches Personal - Dienstgeberbeitrag SV	-75,352	-77,345	0	0	0
61211	Technisches Personal - MVK-Beiträge	-857	-964	0	0	0
61220	Technisches Personal - FLAG	-15,889	-15,795	0	0	0
61240	Technisches Personal - Vorsorge Abfertigung	-11,154	-11,572	0	0	0
61250	Grundbeitrag Pensionskasse	-2,105	-2,186	0	0	0
61251	Zusatzbeitrag Pensionskasse	-944	-992	0	0	0
		-459,353	-477,898	-488,000	-536,500	-552,600
2.3.	Administratives Personal					
61300	Admin. Personal - Bruttogehalt	-38,748	-39,658	-53,000	-61,100	-75,600
61310	Admin. Personal - Dienstgeberbeitrag SV	-8,458	-7,637	0	0	0
61320	Admin. Personal - FLAG	-1,744	-1,785	0	0	0
61340	Admin. Personal - Vorsorge Abfertigung	-1,468	-1,503	0	0	0
61350	Grundbeitrag Pensionskasse	-321	-328	0	0	0
61351	Zusatzbeitrag Pensionskasse	-321	-328	0	0	0
69300	Admin. Personal - Bruttogehalt	-6,274	-6,395	0	0	0
69310	Admin. Personal - Dienstgeberbeitrag SV	-1,370	-1,396	0	0	0
69311	Admin. Personal - MVK-Beiträge	-96	-98	0	0	0
69320	Admin. Personal - FLAG	-282	-288	0	0	0
		-59,081	-59,414	-53,000	-61,100	-75,600
2.4.	Reinigungspersonal					
61400	Reinigungspersonal - Bruttogehalt	-24,385	-24,926	-33,000	-34,500	-35,500
61410	Reinigungspersonal - Dienstgeberbeitrag SV	-5,324	-5,442	0	0	0
61420	Reinigungspersonal - FLAG	-1,097	-1,122	0	0	0
61440	Reinigungspersonal - Vorsorge Abfertigung	-924	-945	0	0	0
61450	Grundbeitrag Pensionskasse	-78	-187	0	0	0
		-31,807	-32,621	-33,000	-34,500	-35,500
2.5.	Sonstiger Personalaufwand					
73350	Teilnahme Schulungen, Kurse etc.	-101	0	-3,000	-3,000	-3,500
		-101		-3,000	-3,000	-3,500
2.6.	Auslandszulagen					
3.	WERKVERTRÄGE, FREIE DIENSTVERTRÄGE	-17,459	-11,283	-25,000	-20,000	-20,000
3.1.	Werkverträge für Forschung					
58100	Klassische Werkverträge	-11,502	-2,600	0	0	0
58110	Klassische Werkverträge nichtwissenschaftlich	0	-182	0	0	0
		-11,502	-2,782			

3.2.	Freie Dienstverträge Forschung					
58200	Freie Dienstverträge	-5,050	-7,260	-25,000	-20,000	-20,000
58210	Freie Dienstverträge - DGA Soz. Vers.	-907	-1,241	0	0	0
		-5,957	-8,501	-25,000	-20,000	-20,000
3.3.	Sonstige Werkverträge					
4.	MATERIALAUFWAND	-117,617	-121,935	-140,400	-89,600	-103,400
4.1.	Adaptierungen Gebäude					
56010	Adaptierungen Gebäude (unter Euro 400,-)	0	-420	-100	-400	-100
			-420	-100	-400	-100
4.2.	Wissensch. Geräte und Bauteile					
56100	Wissenschaftliche Geräte (unter Euro 400,-)	-499	-1,317	0	-1,500	0
56110	Bauteile wissenschaftliche Geräte	0	-168	-4,000	-2,000	-2,000
56120	Elektronischer Bedarf (unter Euro 400,-)	-268	-104	-500	-500	-500
		-767	-1,589	-4,500	-4,000	-2,500
4.3.	EDV-Verbrauchsmaterial, Software					
56200	Software (unter Euro 400,-)	0	0	-3,000	-2,000	-3,500
56420	EDV - Zubehör inkl. Verbrauchsmaterial	-5,973	-4,033	-6,500	-5,000	-8,000
		-5,973	-4,033	-9,500	-7,000	-11,500
4.4.	Maschinelle Ausstattung					
56130	Maschinelle Ausstattung (unter Euro 400,-)	-167	-1,284	-1,000	-1,500	-1,000
56140	Werkzeuge (unter Euro 400,-)	-2,638	-2,894	-3,500	-3,600	-3,700
56600	Fahrzeuge und Zubehör (unter Euro 400,-)	0	-102	0	0	0
		-2,804	-4,280	-4,500	-5,100	-4,700
4.5.	Einrichtung und Bürogeräte					
56400	Einrichtungsgegenstände (unter Euro 400,-)	-408	-5,203	-2,000	-3,000	-10,000
56410	Bürogeräte (unter Euro 400,-)	-13	0	-1,000	-500	-1,000
		-421	-5,203	-3,000	-3,500	-11,000
4.6.	Wissenschaftlicher Bedarf					
54100	Chemikalien	-5,916	-4,723	-9,500	-7,000	-10,500
54200	Filme	0	0	-200	-200	-200
54300	Sonstiger wissenschaftlicher Bedarf	-36,547	-40,667	-38,000	-42,000	-42,000
54400	Futtermittel	-12	-214	-200	-200	-200
58700	Druckkosten	0	0	-1,000	-1,000	-1,000
		-42,474	-45,604	-48,900	-50,400	-53,900
4.7.	Nichtwissenschaftlicher Bedarf					
56300	Verbrauchsmaterial	-11,935	-12,261	-13,000	-13,500	-14,000
56500	Reinigungsmaterial	-2,754	-2,887	-2,900	-3,000	-3,000
56510	Arbeitskleidung	-670	-1,111	-1,500	-1,500	-1,500
		-15,359	-16,259	-17,400	-18,000	-18,500
4.8.	Energiebezug, Betriebsstoffe					
57100	Stromkosten	-21,716	-26,077	-22,500	0	0
57200	Gaskosten	-1,687	0	-2,000	0	0
57400	Fernwärme	-25,544	-17,252	-27,000	0	0
57600	Wassergebühr	-871	-1,218	-1,000	-1,200	-1,200
		-49,818	-44,547	-52,500	-1,200	-1,200
5.	BETRIEBSAUFWAND	-147,053	-153,423	-178,400	-228,600	-239,900
5.1.	Gebäude, Unterbringung					
71100	Grundsteuer und andere Gemeindeabgaben	-381	-381	-400	-400	-400
72100	Instandhaltung Gebäude	-12,780	-7,719	-15,000	-10,000	-15,000
72110	Serviceverträge Gebäude	-407	-398	-400	-500	-500
74100	Mieten für Räume	0	0	-3,000	-50,000	-50,000
77100	Gebäudeversicherung	-3,055	-3,055	-6,000	0	0
		-16,623	-11,553	-24,800	-60,900	-65,900
5.2.	Wissenschaftliche Geräte					
72230	Wartungsverträge Telefonanlagen	0	-191	0	0	0
72310	Instandhaltung wissenschaftliche Geräte	-10,991	-14,079	-12,000	-15,000	-15,000
72320	Serviceverträge wissenschaftliche Geräte	0	-1,158	-1,900	-1,500	-1,800
		-10,991	-15,429	-13,900	-16,500	-16,800

5.3. EDV-Anlagen						
72340	Instandhaltung EDV - Anlagen	0	0	-1,000	-1,000	-1,000
72360	Wartungsverträge Software	0	0	-300	-300	-300
				-1,300	-1,300	-1,300
5.4. Maschinelle Ausstattung						
72220	Instandhaltung maschinelle Ausstattung	-154	-290	-200	-300	-300
		-154	-290	-200	-300	-300
5.5. Einrichtungsgegenstände						
72210	Instandhaltung Einrichtung	-34	0	-200	-200	-200
		-34		-200	-200	-200
5.6. Bürogeräte						
74300	Mieten für Büro - und Kopiergeräte	-8,113	-8,454	-6,500	-8,600	-8,700
77200	Geräteversicherung	-722	0	0	0	0
		-8,834	-8,454	-6,500	-8,600	-8,700
5.7. Fahrzeuge						
72400	Instandhaltung Fahrzeuge	-7,010	-3,986	-7,000	-4,000	-5,000
72800	Betriebskosten Fahrzeuge	-5,293	-6,497	-5,300	-6,500	-6,500
77340	Fahrzeugversicherung	-3,989	-4,695	-4,200	-4,800	-4,900
		-16,293	-15,178	-16,500	-15,300	-16,400
5.8. Betriebsstoffe						
72920	Kanalgebühr	-2,122	-2,962	-2,500	-3,000	-3,000
72930	Müllabfuhr	-2,266	-2,068	-2,500	-2,500	-2,600
		-4,388	-5,030	-5,000	-5,500	-5,600
5.9. Reinigung durch Dritte						
72500	Reinigung durch Dritte	-1,443	-1,287	-1,600	-1,600	-1,700
		-1,443	-1,287	-1,600	-1,600	-1,700
5.10 Sonst. Leistungen durch Dritte						
72370	Zugangsberechtigungen Datenbanken	-1,624	0	-1,700	-200	-200
72510	Sonstige Leistung durch Dritte	-7,744	-13	-5,000	-6,000	-6,000
72600	Sonstige Instandhaltungen	-291	0	-500	-500	-500
		-9,659	-13	-7,200	-6,700	-6,700
5.11 Reise- und Transportkosten						
73100	Reisekosten	-7,803	-4,958	-9,000	-10,000	-11,000
73200	Taxi	0	0	-500	-500	-500
73400	Transporte durch Dritte	-1,177	-2,040	-3,000	-3,000	-3,000
76040	Medikamente	-408	-47	-500	-500	-500
		-9,387	-7,045	-13,000	-14,000	-15,000
5.12 Teilnahme an wiss. Veranstaltungen						
73300	Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen	-9,705	-25,939	-13,000	-22,000	-23,000
		-9,705	-25,939	-13,000	-22,000	-23,000
5.13 Kommunikationsaufwand						
73810	Telefonkosten	-9,317	-8,389	-10,000	-9,000	-9,500
73820	Porti	-2,896	-2,498	-3,800	-3,000	-3,500
73840	Sonstige Postkosten	0	0	-300	-300	-300
73850	Datenleitungen	-9,724	-9,724	-10,200	-10,500	-10,800
		-21,938	-20,611	-24,300	-22,800	-24,100
5.14 Bürobedarf						
76010	Papier - und Drucksorten	-412	-406	-2,000	-1,000	-1,700
76020	Bürobedarf	-3,324	-2,239	-3,500	-3,000	-3,100
76030	Photokopierkosten (ohne Gerätemiete)	-1,139	-886	-1,200	-1,300	-1,300
		-4,874	-3,531	-6,700	-5,300	-6,100
5.15 Bücher, Zeitschriften						
76050	Buchbindekosten	0	-3,157	-7,000	-5,500	-6,000
76201	Bücher - Zeitschriften	-22,538	-19,925	-21,500	-22,000	-22,200
76210	Leihgebühren Bücher-Zeitschriften	-4	0	0	0	0
76220	Sonderdrucke	-2,365	-584	-4,000	-4,000	-4,500
		-24,907	-23,666	-32,500	-31,500	-32,700

5.16 Repräsentationsaufwand						
76060	Inserate	0	-2,706	-3,000	-3,500	-2,500
76090	Repräsentationsaufwand	-1,637	-1,574	-2,200	-2,000	-2,300
		-1,637	-4,281	-5,200	-5,500	-4,800
5.17 Einladung wiss. Gäste - Beiträge wiss. Org.						
76500	Einladung wissenschaftliche Gäste	-2,438	-7,605	-4,000	-8,000	-8,000
77800	Beiträge zu wissenschaftlichen Organisationen	-148	-203	-200	-200	-200
		-2,586	-7,808	-4,200	-8,200	-8,200
5.18 Versicherungen						
77400	Sonstige Versicherung	-803	-803	-1,000	-1,000	-1,000
		-803	-803	-1,000	-1,000	-1,000
5.19 Sonst. Aufwand und Spesen						
22210	Verrechnung Verlag Sonstige Aufw.	0	-601	0	0	0
71200	Sonstige öffentliche Gebühren und Abgaben	-58	-12	-200	-200	-200
74600	Sonstige Mieten	-482	-1,588	-500	-500	-500
77500	Rechts- und Beratungskosten	-1,774	0	0	0	0
77900	Bankspesen	-481	-431	-600	-700	-700
77950	Kursdifferenzen Aufwand	-2	127	0	0	0
		-2,797	-2,505	-1,300	-1,400	-1,400
6. FINANZAUFWAND - STEUERN						
III. INTERNE VERRECHNUNG						
22400	Interne Verrechnung Raummieten	3,800	3,080	0	0	0
22410	Interne Verrechnung ARZ - Leistungen	0	-794	0	0	0
22420	Interne Verrechnung Kopien/Drucker	140	517	0	0	0
22490	Interne Verrechnung Sonstiges	2,238	6,246	0	0	0
22990	Durchläufer in Handkassen	-492	492	0	0	0
23500	Anzahlungen Lieferanten	1,729	0	0	0	0
		7,415	9,541			
IV. BUDGETUMBUCHUNGEN						
99900	Geldumbuchungen	21	0	0	0	0
99901	Dotierung Reparaturrücklage	-8,000	-8,000	-8,000	-8,000	-8,100
		-7,979	-8,000	-8,000	-8,000	-8,100
Saldoübertrag Folgejahr		457,050	486,180	362,800	411,900	177,000

5-Jahres-Budgetantrag						
2120 / 10: Limnologie Ordentliches Budget						
Text	2009 BA	2010 BA	2011 BA	2012 BA	2013 BA	
Saldoübertrag Vorjahr	411,900	177,000	116,600	38,000	4,800	
I. EINNAHMEN GESAMT	1,696,700	1,779,500	1,820,400	1,867,300	1,923,100	
Ordentliches Budget	1,696,700	1,779,500	1,820,400	1,867,300	1,923,100	
II. AUSGABEN GESAMT	-1,923,500	-1,831,700	-1,890,700	-1,892,100	-1,951,500	
1. INVESTITIONEN	-188,500	-111,500	-132,500	-93,600	-103,600	
1.2. Wissenschaftliche Geräte	-120,000	-80,000	-100,000	-60,000	-70,000	
1.3. Bauteile wissensch. Geräte	-7,000	-8,000	-8,000	-9,000	-9,000	
1.4. EDV- und Bürogeräte	-10,000	-10,000	-10,000	-10,000	-10,000	
1.5. Software	-9,000	-9,000	-9,500	-9,500	-9,500	
1.6. Maschinelle Ausstattung	-2,500	-2,500	-2,500	-2,600	-2,600	
1.7. Einrichtungsgegenstände	-10,000	-2,000	-2,500	-2,500	-2,500	
1.8. Fahrzeuge	-30,000	0	0	0	0	
2. PERSONALAUFWAND	-1,371,700	-1,403,000	-1,433,500	-1,468,200	-1,512,000	
2.1. Wissenschaftler	-704,500	-725,600	-735,000	-757,100	-779,800	
2.2. Technisches Personal	-552,600	-560,000	-576,800	-594,100	-611,900	
2.3. Administratives Personal	-75,600	-77,900	-80,200	-75,000	-77,300	
2.4. Reinigungspersonal	-35,500	-36,500	-37,500	-38,500	-39,500	
2.5. Sonstiger Personalaufwand	-3,500	-3,000	-4,000	-3,500	-3,500	
3. WERKVERTRÄGE, FREIE DIENSTVERTRÄGE	-20,000	-22,500	-23,000	-24,000	-25,000	
3.2. Freie Dienstverträge Forschung	-20,000	-22,500	-23,000	-24,000	-25,000	
4. MATERIALAUFWAND	-103,400	-100,200	-106,000	-107,000	-108,800	
4.1. Adaptierungen Gebäude	-100	-100	-100	-100	-100	
4.2. Wissensch. Geräte und Bauteile	-2,500	-2,500	-3,100	-3,200	-3,200	
4.3. EDV-Verbrauchsmaterial, Software	-11,500	-11,000	-11,500	-11,000	-11,100	
4.4. Maschinelle Ausstattung	-4,700	-4,800	-5,200	-5,300	-5,400	
4.5. Einrichtung und Bürogeräte	-11,000	-5,000	-5,000	-5,000	-5,100	
4.6. Wissenschaftlicher Bedarf	-53,900	-56,500	-60,100	-61,200	-62,300	
4.7. Nichtwissenschaftlicher Bedarf	-18,500	-19,000	-19,700	-19,800	-20,100	
4.8. Energiebezug, Betriebsstoffe	-1,200	-1,300	-1,300	-1,400	-1,500	
5. BETRIEBSAUFWAND	-239,900	-194,500	-195,700	-199,300	-202,100	
5.1. Gebäude, Unterbringung	-65,900	-16,500	-16,500	-16,600	-16,600	
5.2. Wissenschaftliche Geräte	-16,800	-17,000	-17,000	-17,100	-17,100	
5.3. EDV-Anlagen	-1,300	-1,300	-1,300	-1,300	-1,300	
5.4. Maschinelle Ausstattung	-300	-400	-400	-400	-400	
5.5. Einrichtungsgegenstände	-200	-200	-200	-200	-200	
5.6. Bürogeräte	-8,700	-8,800	-8,900	-9,000	-9,000	
5.7. Fahrzeuge	-16,400	-18,000	-19,100	-20,200	-20,300	
5.8. Betriebsstoffe	-5,600	-5,600	-5,700	-5,800	-5,800	
5.9. Reinigung durch Dritte	-1,700	-1,800	-1,900	-2,000	-2,000	
5.10 Sonst. Leistungen durch Dritte	-6,700	-6,700	-6,700	-6,700	-6,700	
5.11 Reise- und Transportkosten	-15,000	-16,100	-14,100	-15,200	-16,200	
5.12 Teilnahme an wiss. Veranstaltungen	-23,000	-22,000	-22,000	-22,000	-22,000	
5.13 Kommunikationsaufwand	-24,100	-24,500	-25,100	-25,300	-26,300	
5.14 Bürobedarf	-6,100	-6,500	-6,900	-7,200	-7,500	
5.15 Bücher, Zeitschriften	-32,700	-32,900	-33,100	-33,500	-33,800	
5.16 Repräsentationsaufwand	-4,800	-5,000	-5,000	-5,000	-5,000	

5.17	Einladung wissenschaftl. Gäste	-8,200	-8,700	-9,200	-9,200	-9,200
5.18	Versicherungen	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000
5.19	Sonst. Aufwand und Spesen	-1,400	-1,500	-1,600	-1,600	-1,700
IV.	BUDGETUMBUCHUNGEN	-8,100	-8,200	-8,300	-8,400	-8,400
	Saldoübertrag Folgejahr	177,000	116,600	38,000	4,800	-32,000

in
1000 €

Budgetblatt Personal	provisorischer RA 2007			BVA 2008			BA 2009		
	Planstellen Mitarbeiterzahl		Kosten	Planstellen Mitarbeiterzahl		Kosten	Planstellen Mitarbeiterzahl		Kosten
ÖAW	unbefristet	befristet		befristet	befristet		unbefristet	befristet	
WISSENSCHAFTLER	8.00	3.00	798.8	7.00	4.00	802.1	5.00	6.00	704.5
TECHN. PERSONAL	6.50	4.10	477.9	7.50	3.50	536.5	8.50	2.50	552.6
ADMIN. PERSONAL	1.00		59.4	1.00		61.1	1.00	0.50	75.6
REINGUNGSPERSONAL	1.00		24.9	1.00		34.5	1.00		35.5
AUSLANDSZULAGE									
PERSONALAUFWAND ÖAW			1361.1			1434.2			1368.2
WERKVERTRÄGE+FDV			11.3			25.0			20.0
Fremdfinanziert									
WISSENSCHAFTLER		5.80	405.0		6.00	460.0		6.50	470.0
TECHN. PERSONAL	2.75		65.0	2.25		65.0		5.00	71.0
ADMIN. PERSONAL	1.75		74.0	1.00	0.75	75.0	1.00	0.75	80.0
REINGUNGSPERSONAL									
AUSLANDSZULAGE									
PERSONALAUFWAND (fremdfinanziert)			544.0			600.0			621.0
WERKVERTRÄGE+FDV						100.0			100.0
Gesamt									
WISSENSCHAFTLER	8.00	8.80	1203.8	7.00	10.00	1262.1	5.00	12.50	1174.5
TECHN. PERSONAL	9.25	4.10	542.9	9.75	3.50	601.5	8.50	7.50	623.6
ADMIN. PERSONAL	2.75		133.4	2.00	0.75	136.1	2.00	1.25	155.6
REINGUNGSPERSONAL	1.00		24.9	1.00		34.5	1.00		35.5
AUSLANDSZULAGE									
PERSONALAUFWAND gesamt			1905.1			2034.2			1989.2
WERKVERTRÄGE+FDV			11.28			125.00			120.00

in 1000 €

Budgetblatt Personal			BA 2010			BA 2011			BA 2012			BA 2013		
	Planstellen Mitarbeiterzahl		Kosten	Planstellen Mitarbeiterzahl		Kosten	Planstellen Mitarbeiterzahl		Kosten	Planstellen Mitarbeiterzahl		Kosten		
	unbefristet	befristet		unbefristet	befristet		unbefristet	befristet						
ÖAW														
WISSENSCHAFTLER	5.00	6.00	725.6	5.00	6.00	735.0	5.00	6.00	757.1	5.00	6.00	779.8		
TECHN. PERSONAL	8.50	2.50	560.0	8.50	2.50	576.8	8.50	2.50	594.1	8.50	2.50	611.9		
ADMIN. PERSONAL	1.00	0.50	77.9		1.50	80.2		1.50	75.0		1.50	77.3		
REINUNGSPERSONAL	1.00		36.5			37.5			38.5			39.5		
AUSLANDSZULAGE														
PERSONALAUFWAND ÖAW			1400.0			1429.5			1464.7			1508.5		
WERKVERTRÄGE+FDV			22.5			23.0			24.0			25.0		
Fremdfinanziert														
WISSENSCHAFTLER														
TECHN. PERSONAL														
ADMIN. PERSONAL														
REINUNGSPERSONAL														
AUSLANDSZULAGE														
PERSONALAUFWAND (fremdfinanziert)														
WERKVERTRÄGE+FDV														
Gesamt														
WISSENSCHAFTLER	5.00	6.00	725.6	5.00	6.00	735.0	5.00	6.00	757.1	5.00	6.00	779.8		
TECHN. PERSONAL	8.50	2.50	560.0	8.50	2.50	576.8	8.50	2.50	594.1	8.50	2.50	611.9		
ADMIN. PERSONAL	1.00	0.50	77.9		1.50	80.2		1.50	75.0		1.50	77.3		
REINUNGSPERSONAL	1.00		36.5			37.5			38.5			39.5		
AUSLANDSZULAGE														
PERSONALAUFWAND gesamt			1400.0			1429.5			1464.7			1508.5		
WERKVERTRÄGE+FDV			22.50			23.00			24.00			25.00		

Abteilung/Projekttitle	Förder einrichtung: *)	über ÖAW	nicht	Summe:
		abgerechnet	über ÖAW abgerechnet	
		RA 2007	RA 2007	
FWF L229-B12 Identification of indigenous whitefish species and extent of potential hybridization with a Baltic species	FWF	30811.56	6000.00	36811.56
FWF 17738 Diversität rezenter Grundwasser- und Paratethys Ostracoden	FWF	64895.28		
FWF18185 Mikroevolution der Toxinsynthese bei Cyanobakterien	FWF	61672.36	8334.14	70006.50
FWF18315 Diversität und Encystierungsmuster von Chrysophyceen	FWF	55429.23	36399.00	91828.23
FWF18595 Klima- und Umweltentwicklung im späten Pleniglazial	FWF	49045.10		49045.10
FWF 18767 Mikrodiversität und Habitatspezifität von Flagellaten	FWF	29258.00	13685.00	42943.00
FWF 19706 Nischendifferenzierung und Koexistenz von alpinen Goldalgen	FWF	6694.64	25921.00	32615.64
FWF 19853 Ökologische Diversität von Polynucleobacter Bakterien	FWF	43859.25	19000.00	62859.25
FWF P16796 Phenotypic and genotypic variability of Meseres	FWF	9654.27	6821.77	16476.04
FWF P20118 Adaptation and tolerance to low pH	FWF	22275.13	308.80	22583.93
FWFI35-B06 Decadal Holocene and Late-glacial Variability of the Oxygen Isotopic Composition in Precipitation over Europe Reconstructed from Deep-lake Sediments (DecLakes)	FWF	58304.95		
BAA Limnologiekurs	ADA	302000		646796.69
BWK0142 Zusatz Pepcy EUP0071		2472.82		2472.82
EUP0071 PEPCY Toxic and bioactive compounds in cyanobacteria	EU	35112.53		35112.53
EUP0125 Integrating BOMOSA cage fish farming systems in reservoirs, ponds and temporary water bodies	EU	38517.62		38517.62
FIR0097 IPGL Externe Teilnehmer	ADA	33682.59		33682.59
FIR0100 Wirtschaftliche Nutzung von Cyanobakterien	Cyano Biotech	79906.69		79906.69
FIR0105 Workshop Bridging Research, Technology and Development	ADA	7361.68		7361.68
CLIM-LAND	ÖAW	18037.82		18037.82
Summe		948922	116470	1065461

Abteilung/Projekttitlel	Förder einrichtung: *)	BVA 2008
FWF L229-B12 Identification of indigenous whitefish species and extent of potential hybridization with a Baltic species	FWF	38900.00
FWFP20231 Genetische Determinierung des Toxingehalts in Cyanobakterien	FWF	55000.00
FWF18185 Mikroevolution der Toxinsynthese bei Cyanobakterien	FWF	5600.00
FWF18595 Klima- und Umweltentwicklung im späten Pleniglazial	FWF	94805.01
CLIM-LAND	ÖAW	27012.18
FWF 19853 Ökologische Diversität von Polynucleobacter Bakterien	FWF	73964.75
FIR0100 Wirtschaftliche Nutzung von Cyanobakterien	Cyano Biotech	120000.00
FWF18315 Diversität und Encystierungsmuster von Chrysophyceen	FWF	3000.00
FWF 18767 Mikrodiversität und Habitatspezifität von Flagellaten	FWF	35000.00
FWF 19706 Nischendifferenzierung und Koexistenz von alpinen Goldalgen	FWF	55000.00
FWF P20118 Adaptation and tolerance to low pH	FWF	105000.00
BAA Limnologiekurs	ADA	310000.00
Summe		923282

beabsichtigte Anträge						
Abteilung/Projekttitlel	Förder einrichtung:*)	BA 2009	BA 2010	BA 2011	BA 2012	BA 2013
FWFP20231 Genetische Determinierung des Toxingehalts in Cyanobakterien	FWF	90000.00	90000.00	50000.00		
FWF 19853 Ökologische Diversität von Polynucleobacter Bakterien	FWF	5000.00				
FIR0100 Wirtschaftliche Nutzung von Cyanobakterien	Cyano Biotech	100000.00				
FWF 19706 Nischendifferenzierung und Koexistenz von alpinen Goldalgen	FWF	40000.00				
FWF P20118 Adaptation and tolerance to low pH	FWF	110000.00	49000.00			
FWF P20360 Ecology of endemic ciliates from bromeliads	FWF	19000.00	19000.00			
BAA Limnologiekurs	ADA	310000.00	315000.00			
Summe		674000	473000	50000		

3. Jahresbericht 2006

**ÖSTERREICHISCHE
AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN**

JAHRESBERICHT 2006

Institut für Limnologie

BERICHTSZEITRAUM:

1.1.2006- 31.12.2006

LEITER DER BERICHTENDEN
FORSCHUNGSEINRICHTUNG:

Prof. Dr. Thomas WEISSE

ANSCHRIFT:

MONDSEESTR. 9, 5310 MONDSEE

Schwerpunktthema:

Untersuchung der Entstehung und Erhaltung der Diversität und Komplexität auf der Ebene des Individuums, der Population, der Art und des Ökosystems

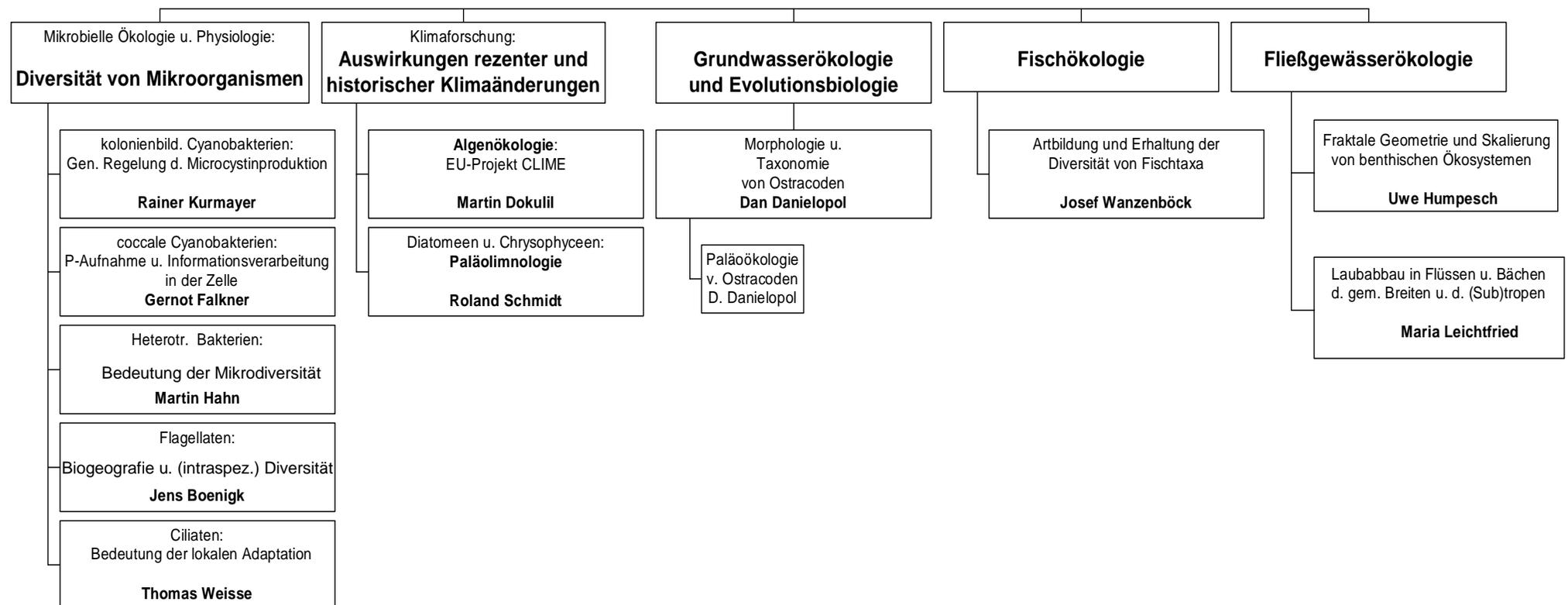


Abb. 1. Organigramm der wissenschaftlichen Forschung mit den einzelnen Arbeitsgebieten und den jeweiligen verantwortlichen Wissenschaftlern

INHALTSVERZEICHNIS

1	WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT	5
1.1	Zusammenfassung des wissenschaftlichen Berichts 2006 in deutscher Sprache...	5
1.2	Summary of the Annual Report 2006	8
1.3	Forschungsbericht 2006	10
1.3.1	Planktische Algenökologie	10
1.3.2	Diversität und Komplexität der Toxinproduktion bei Cyanobakterien	12
1.3.3	Untersuchungen zur Ökologie planktischer Süßwasserbakterien	19
1.3.4	Ökologie und Diversität von Süßwasser-Flagellaten	25
1.3.5	Ökologie und Diversität von Ciliaten.....	29
1.3.6	Evolutionäre Ökologie von Rotatorien	32
1.3.7	Fischökologie	34
1.3.8	Langzeitentwicklung von Alpenseen (Forschungsbereich Paläolimnologie) ...	38
1.3.9	Grundwasserökologie und Paläoökologie der Ostracoden.....	42
1.3.10	Forschungsbereich Fließgewässerökologie	46
1.3.11	Internationaler Postgraduierten-Lehrgang Limnologie (IPGL-Kurs).....	48
1.4	Übereinstimmung/Abweichung zum Mittelfristigen Forschungsprogramm 2006-2010	52
1.5	Aktuelle Fassung des Mittelfristigen Forschungsprogramms 2007-2011	62
1.6	Forschungsergebnisse 2006.....	63
1.6.1	Veröffentlichungen in begutachteten, internationalen Fachorganen.....	63
1.6.2	Buchbeiträge	67
1.6.3	Symposiumsbeiträge, Berichte, Buchbesprechungen, Abstracts, Sonstiges ..	67
1.6.4	Habilitationen.....	69
1.6.5	Dissertationen	69
1.6.6	Diplomarbeiten	69
1.7	Wissenschaftliche Zusammenarbeit 2006	70
1.7.1	Zusammenarbeit mit in- und ausländischen Instituten	70
1.7.2	Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen.....	78
1.7.3	Vorträge von Mitarbeitern an anderen Institutionen	83
1.7.4	Kolloquiumsvorträge	84

1.8	Wissenschaftler austausch 2005	85
1.8.1	Inlands- und Auslandsaufenthalte von Mitarbeitern	85
1.8.2	Aufenthalte von Gastwissenschaftlern	86
1.9	Organisation von wissenschaftlichen Veranstaltungen	88
1.9.1	Tagungen und Workshops:.....	88
1.9.2	Kurse und Praktika:.....	88
1.9.3	Vorlesungen:.....	89
1.9.4	Examenskandidat(inn)en und Praktikant(inn)en am Institut.....	90
1.10	Personalstand 2006	95
	Name.....	95
	Funktion.....	95
	Finanzierung	95
1.11	Aktualisierung / Vorschau auf die weitere Entwicklung im laufenden Jahr 2007 und Planungen für die Jahre bis 2012.....	97
1.11.1	Personell	97
1.11.2	Räumlich	98
1.11.3	Budget.....	98
2.	ERLÄUTERUNGEN ZUR FINANZIERUNG 2006–2012.....	99
2.1	Erläuterungen zum Rechnungsabschluss 2006.....	99
2.2	Erläuterungen zum Budgetvoranschlag 2007	99
2.3	Erläuterungen zum Budgetantrag 2008-2012	99
3.	ANHANG: BUDGETBLÄTTER 2006–2012.....	100

1 WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

1.1 Zusammenfassung des wissenschaftlichen Berichts 2006 in deutscher Sprache

Das Institut für Limnologie konnte seine Forschungsarbeiten im Jahre 2006 auf hohem Niveau fortführen, v.a. dank des hohen Anteils an lukrierten Drittmitteln, der im Berichtszeitraum ca. 1 Mio € betrug (s. Kap. 2 und 3). Im Berichtsjahr wurden 2 EU-/ESF- und 10 FWF-Projekte am Institut durchgeführt (s.a. Kap. 2.1 und 3) sowie das *Polynucleobacter*-Genom-Projekt vom US Joint Genome Institute fortgeführt. Wie im Vorjahr haben 10 der 11 auf Planstellen angestellten Wissenschaftler des Instituts im Jahre 2006 zumindest ein eigenes, international begutachtetes Forschungsprojekt geleitet. Fast alle dieser Projekte beziehen sich inhaltlich direkt auf den gegenwärtigen Institutsschwerpunkt (Abb. 1). Die Arbeiten über die adaptive Anpassung der Phosphataufnahme und Informationsverarbeitung von Cyanobakterien (G. Falkner) sowie ein Teilgebiet der Fließgewässerforschung (Benthosforschung, U. Humpesch) wurden mit dem Ausscheiden der verantwortlichen Wissenschaftler zum Jahresende im Institut abgeschlossen. Die vorzeitige Neubesetzung der einen Wissenschaftlerstelle erfolgte im Hinblick auf den bestehenden Institutsschwerpunkt. Das neu begonnene Arbeitsgebiet Evolutionäre Ökologie von Rotatorien (C.-P. Stelzer) soll ein Bindeglied zwischen den Untersuchungen an Einzellern und den fischökologischen Arbeiten darstellen. Herausragende Forschungsergebnisse des vergangenen Jahres waren

- die Aufklärung des Ausmaßes rezenter und historischer Klimaerwärmung in hochalpinen und voralpinen Seen
- die Charakterisierung verschiedener Mutationsereignisse und einzelner Gene des Microcystinsynthese-Genclusters bei kolonienbildenden Cyanobakterien
- die Genomsequenzierung eines frei lebenden, heterotrophen Bakteriums (*Polynucleobacter* sp.)
- die genetischen und ökophysiologischen Analysen der Mikrodiversität bei heterotrophen Bakterien, Süßwasser-Flagellaten und Ciliaten
- die experimentell gemessenen unterschiedlichen Wachstumsraten baltischer und alpiner Coregonenstämme sowie derer Hybride
- die Entwicklung eines theoretischen Modells mit allgemeiner Anwendbarkeit für Grundwasser-Ökosysteme

Im Bereich Ausbildung, Lehre und Wissenstransfer innerhalb des IPGL-Kurses waren die Organisation eines internationalen Workshops in Kenia durch unser IPGL-Büro sowie der Beginn eines internationalen, von der EU geförderten Aquakulturprojektes in Ostafrika die herausragenden Ereignisse.

Die Publikationstätigkeit erreichte ein Rekordniveau, nicht nur hinsichtlich der Anzahl der referierten Artikel (41) sondern vor allem bezüglich der in hochrangigen Zeitschriften erschienenen Veröffentlichungen (Abb. 2). Im Jahr 2006 erschienen 20 Arbeiten der InstitutsmitarbeiterInnen in Fachzeitschriften mit einem 'impact factor' >2 , wobei der Durchschnitt der vom Science citation index erfassten Zeitschriften in den Fachgebieten Limnologie, Marine und Süßwasserbiologie sowie Ökologie bei etwa 1 liegt (vgl. Jahresbericht 2005).

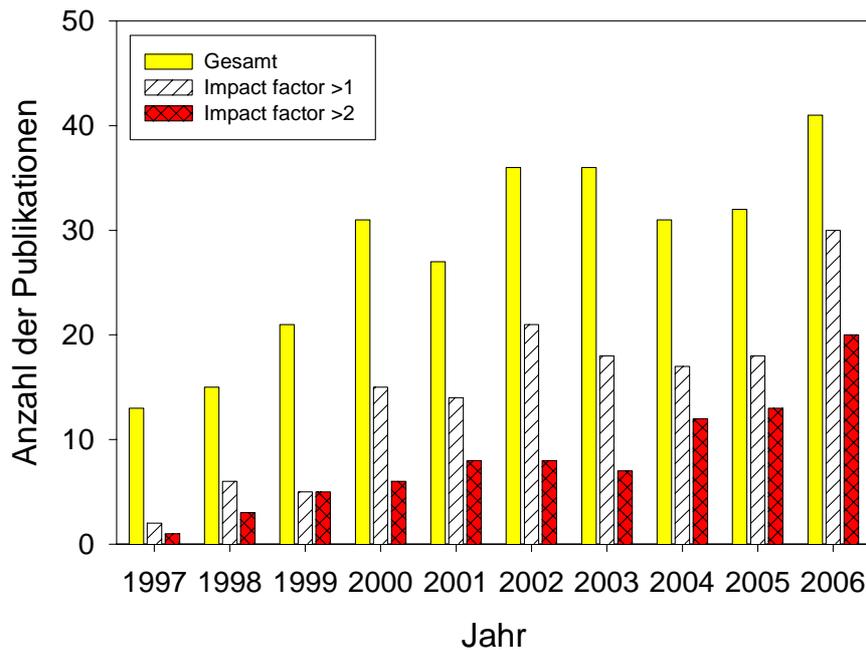


Abb. 2. Gesamtzahl der Publikationen der Abt. Mondsee (bis 2002) bzw. des Instituts für Limnologie (ab 2003) in begutachteten Zeitschriften (1997-2006) sowie Anzahl der Veröffentlichungen, die in Zeitschriften mit einem 'Impact factor' von >1 bzw. >2 erschienen (gemäß Journal Citation Reports®).

Die unbefriedigende räumliche Situation, die sich aus der dringend notwendigen Sanierung des 26 Jahre alten Institutsgebäudes sowie der inzwischen unzureichenden Ausstattung mit Labor- und Büroräumen sowie Stellflächen ergeben, wurde in den letzten Jahresberichten ausführlich geschildert und soll an dieser Stelle nicht nochmals wiederholt werden. Das Institut erwartet, dass das im vergangenen Jahr zwischen der ÖAW und dem Land Oberösterreich getroffene Übereinkommen über eine Teilfinanzierung des Um- und Ausbaus des Laborgebäudes in Mondsee durch das Land Oö im heurigen Jahr zu einem Beginn der Arbeiten führen wird.

Die Arbeiten des vergangenen Jahres wurden überschattet vom Ableben des Gründungsdirektors und langjährigen Obmanns des Kuratoriums des Instituts für Limnologie, Univ.Prof. Dr. Heinz Löffler, am 14. Oktober 2006. Heinz Löffler hat die österreichische Limnologie über fast 50 Jahre und die Entwicklung des Instituts über mehr als drei Jahrzehnte maßgeblich geprägt. Das Institut für Limnologie ist ihm für seine vielfältigen Aktivitäten in den verschiedenen Positionen zu großem Dank verpflichtet. Ein Nachruf für Professor Löffler wurde kürzlich von seinem Nachfolger im Lehrstuhl für Limnologie an der Universität Wien, Prof. F. Schiemer, veröffentlicht¹. Im Mai dieses Jahres wird ein Gedenksymposium für Heinz Löffler in der ehemaligen Biologischen Station Lunz, der früheren Abteilung des Instituts für Limnologie, stattfinden.



Heinz Löffler, 1927-2006

The founding director and long-term chairman of the Advisory Board of the Institute for Limnology of the Austrian Academy of Sciences, Univ.Prof. Dr. Heinz Löffler, passed away on October 14, 2006. Heinz Löffler had a strong impact on Austrian limnology over a period of almost 50 years and influenced the development of the Institute for Limnology over more than three decades. The Institute owes him a debt of gratitude for his many activities in various positions. An obituary by his successor in the chair of limnology at the University of Vienna, Prof. F. Schiemer, was recently published¹. A scientific symposium in memory of Heinz Löffler will take place at the former Biological Station Lunz, the former Department of the Institute for Limnology, during May, 2007.

¹ Schiemer, F. (2006). In memoriam Heinz Löffler (1927-2006). Verh. Zool.-Bot. Ges. Österreich 143: 167-179

1.2 Summary of the Annual Report 2006

The Institute for Limnology could continue its research at a high level in 2006, mainly thanks to a high proportion of extramural funds, which contributed approximately 1 million € to the total budget (see chapters 2 and 3). Two EU/ESF projects, 10 FWF (Austrian Science Fund) projects and the genome project on *Polynucleobacter* were continued during the period of this report. Likewise to the previous year, 10 of the 11 scientist employed on tenure or tenure-track positions headed at least one own, internationally peer-reviewed research project. Almost everyone of those projects is directly related to the Institute's research focus (Fig. 1). The research on adaptive properties of the phosphate uptake system of cyanobacteria and their information storage (G. Falkner), as well as a subdiscipline of river ecology (benthos research, U. Humpesch), have been finished with the retirement of the responsible scientists. One research position was filled prematurely in consideration of the ongoing research focus of the Institute. The freshly started field of research, Evolutionary Ecology of Rotifers (C.-P. Stelzer), shall serve as a link between protist research and research in fisheries ecology. Research highlights of the past year were obtained with respect to the

- analysis of the impact of recent and past climate warming on high alpine and subalpine lakes
- characterization of various mutations and single genes within the microcystin synthesizing gene cluster of colonial cyanobacteria
- genome sequencing of a free-living, heterotrophic bacterium (*Polynucleobacter* sp.)
- genetic and ecophysiological analyses of microdiversity among heterotrophic bacteria, freshwater flagellates and ciliates
- experimentally measured, differing growth rates of baltic and alpine coregonids and their hybrids
- development of a theoretical model with general applicability for groundwater ecosystems

Highlights within the IPGL activities, in the field of education, teaching and dissemination of knowledge, were the organization of an international workshop in Kenya by our IPGL office and the beginning of an international, EU funded project on aquaculture in East Africa.

Publication of research results reached a record level, not only with respect to the total number of peer-reviewed papers (41), but primarily concerning publications in highly ranked journals

Fig. 3). Twenty articles by the Institute's scientists were published in journals with impact factors >2 ; note that the average impact factor of the SCI journals in the fields of Limnology, Marine and Freshwater Biology and Ecology is approximately 1 (see also Annual Report 2005).

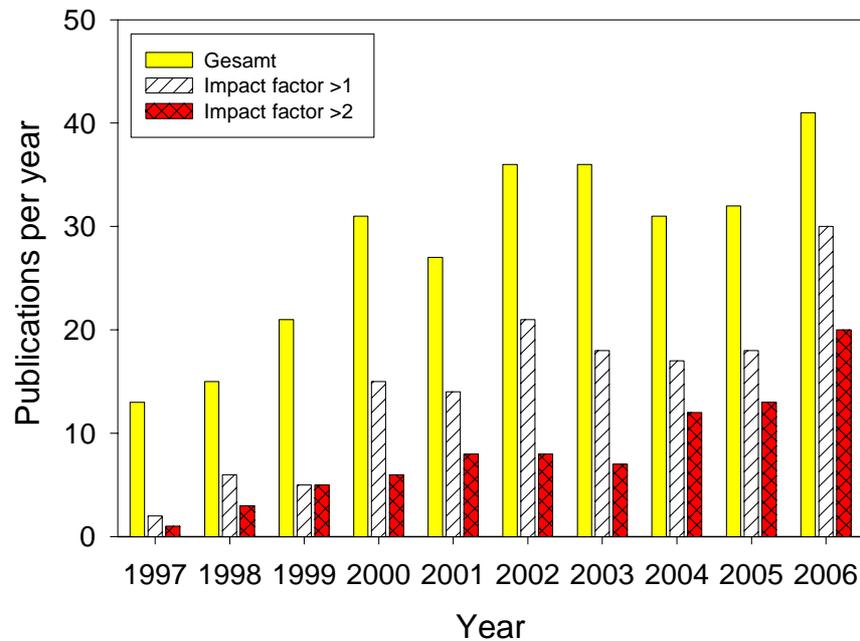


Fig. 3. Total number of publications by the Dept. Mondsee (until 2002) or the Institute for Limnology, respectively, in peer-reviewed journals and number of publications in journals with impact factors >1 and >2 (according to Journal Citation Reports®).

The last Annual Report (2005) discussed in detail the unsatisfactory current situation concerning laboratory and office facilities, which is a consequence of the urgent, but still lacking renovation of the 26 years old laboratory building at Mondsee. A description of the inadequate equipment, with respect to laboratory, office and parking space, shall not be repeated in the present report. The Institute expects that the agreement between the Austrian Academy of Sciences and the State of Upper Austria on the financial support by the latter, that was signed last year, will lead to a beginning of the rebuilding within this year.

1.3 Forschungsbericht 2006

1.3.1 Planktische Algenökologie

Nach dem Auslaufen des EU-Projekts CLIME (<http://www.water.hut.fi/clime>), der zweimaligen Ablehnung eines algenphysiologisch orientierten Projektes zur Analyse von Akklimationsvorgängen bei der Photosynthese von Planktonalgen durch den FWF und des Fortgangs wesentlicher Mitarbeiter, waren die Möglichkeiten der quantitativen Algengruppe (**M. Dokulil**, mit A. Danielopol und C. Kaiblinger) stark eingeschränkt. Ein erheblicher Teil des Jahres wurde daher genutzt um vorhandene Daten aufzuarbeiten und zur Veröffentlichung vorzubereiten. Im Vordergrund stand dabei die Erarbeitung des Kapitels „*The impact of climate change on lakes in Central Europe*“ für das Buch „*The Impact of Climate Change on European Lakes*“, Editor D.G. George, welches 2007 in der Reihe Aquatic Ecology' des Springer Verlags erscheinen soll. Auf Einladung von Prof. Dr. Judit Padisák (Section Editor) wurden zwei Kapitel zum Thema ‚Primärproduktion‘ für die „*Encyclopedia of Inland Waters*“, Editor-in-Chief Gene E. Likens, angefertigt. Wegen der umfangreichen Literatur zu diesem Thema erforderte die Erstellung einen erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand. Die beiden Kapitel mit den Titeln „*Phytoplankton productivity*“ (Dokulil & Kaiblinger) und „*Comparative primary production*“ (Dokulil) werden im kommenden Jahr gedruckt und im Internet erscheinen und allgemein zugänglich sein. Für den eingeladenen Vortrag beim European Large Lakes Symposium in Tartu Estland wurde eine Datenreihe aus 38 Jahren vom Neusiedlersee, bestehend aus eigenen Daten bzw. der von Dr. Herzig zur Verfügung gestellten Datenbank, aufbereitet. Zwei Publikationen dieses umfangreichen Materials sollen folgen. Für den ebenfalls eingeladenen Vortrag bei der Donautagung zum Anlass des 50jährigen Bestandes der Organisation musste gleichfalls eine umfangreiche Literaturrecherche und Aufbereitung des vorhandenen Datenmaterials zur Primärproduktion der Donau vorgenommen werden.

Wichtige Teilergebnisse aus dem CLIME Projekt über die langsam zunehmende Erwärmung des Tiefenwassers in europäischen Seen und dessen Zusammenhang mit dem Klimasignal der Nordatlantischen Oszillation (NAO) wurden zusammen mit einem Autorenkollektiv in einer hochrangigen Fachzeitschrift veröffentlicht (Dokulil et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Tiefentemperaturen in Seen Europas im Mittel um mindestens 0.1-0.2 °C pro Jahrzehnt zunehmen. Diese Temperaturerhöhung ist eindeutig mit dem Frühjahrs-NAO-Index (Mittel der Monate Januar – Mai) gekoppelt (Abb. 4).

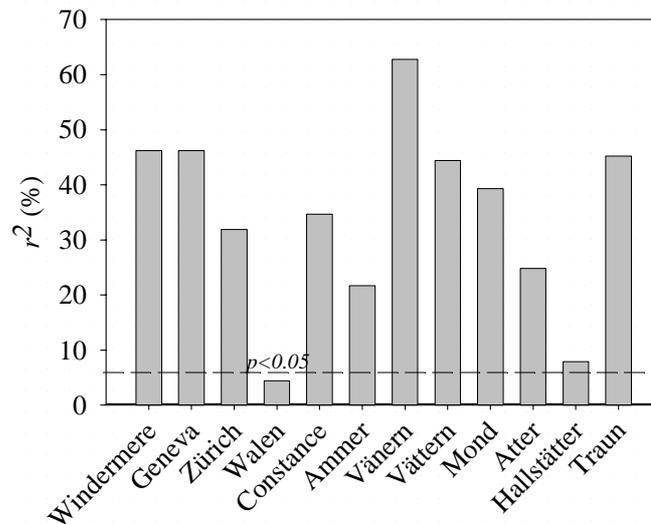


Abb. 4. Bestimmtheitsmaß (r^2) zwischen dem mittleren NAO Index Januar – Mai (NAO_{J-M}) und der Temperatur im Tiefenwasser von 12 europäischen Seen.

Untersuchungen zur physiologischen Steuerung der Photosynthese des Phytoplanktons wurden am Neusiedlersee fortgesetzt. Während einer einwöchigen Messkampagne wurden Momentanwerte der Photosynthese mittels Fluoreszenz ($Fast^{tracka}$) kontinuierlich über mehrere Tage im offenen See und im Schilfgürtel erfasst. Ähnliche Messungen konnten im November an zwei Reservoirs in Sizilien vorgenommen werden. Die Auswertung des gewonnenen Datenmaterials steht noch aus.

Als Auftragsarbeit für das Land Salzburg wurde das Datenmaterial der Routineuntersuchungen 1996 -2005 ausgewertet und in Bezug zu früheren Erhebungen 1981 – 1995 gesetzt. Die praktische Durchführung oblag Frau Dr. Kaiblinger, welche den Abschlussbericht im September 2006 der Salzburger LR vorgelegt hat. Eine Publikation soll folgen.

Vorschau für 2007 und Planung für 2008

Ein von der burgenländischen Landesregierung bereits genehmigtes Kurzprojekt soll im Februar 2007 anlaufen. Untersucht werden sollen Photosyntheseraten als Funktion physikalischer Eigenschaften in stark getrüben sowie braun gefärbten Wässern des Neusiedlersee-Gebietes. In diesem Projekt soll die momentane Anpassung und Effizienz von Planktongemeinschaften direkt im Gewässer mittels Fluoreszenz (FRRF) in unterschiedlichen Gewässertypen erfasst werden. Notwendig sind dazu kurzfristige Messkampagnen bei bestimmten Witterungsverhältnissen, Nachtmessungen und Analysen unter Eisbedeckung. Ergänzend sind auch Messungen photosynthetischer Parameter an Algenkulturen im Labor geplant. Die ersten Ergebnisse dieser

Untersuchungen sollen bereits im Juni 2007 bei der AquaFluo Tagung in der Tschechischen Republik vorgestellt werden.

Vordringlich sind die Vorbereitungsarbeiten für den *Joint Danube Survey* (JDS), da der Berichtersteller (Dokulil) als Koordinator für das Fachgebiet ‚Algen‘ von einem internationalen Gremium nominiert wurde. Die Fahrt von Ulm die Donau abwärts bis ins Delta soll von Mitte August bis Ende September stattfinden. Dabei sind laufende Erhebungen der Algenbiomasse, der Chlorophyll-Konzentration (in vivo und in vitro) sowie photosynthetischer Parameter mittels FRRF geplant.

Tagungsbesuche ergänzen das Programm. Geplant sind die Teilnahme am Deutschsprachigen Diatomeentreffen in Berlin im März, die Organisation eines Klimatages bei der SEFS in Palermo im Juli und der Besuch der internationalen SIL Tagung in Kanada im August.

Das Jahr 2008 wird durch die Pensionierung des Arbeitsgruppenleiters zum Jahresende gekennzeichnet sein. Daher wird Aufarbeiten, Abschließen und Zusammenfassen der Ergebnisse der letzten Jahre im Vordergrund stehen, sowie Vorbereitungen für geplante Buchprojekte. Im Winter soll eventuell eine Tagung in Finnland besucht werden, um dort die Ergebnisse der FRRF Messungen vorzustellen. Für den Herbst 2008 ist eine Teilnahme an der nächsten Tagung der Planktonarbeitsgruppe IAP in Israel vorgesehen.

1.3.2 Diversität und Komplexität der Toxinproduktion bei Cyanobakterien

Mikroorganismen zeichnen sich durch eine große metabolische Vielfalt, zum Beispiel in der Produktion bioaktiver Verbindungen aus. Cyanobakterien der Gattungen *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia* und *Planktothrix* sind als Toxinproduzenten bekannt. Vertreter der Gattung *Planktothrix*, die in Gewässern der gemäßigten Zone weit verbreitet sind, werden aufgrund ihrer Pigmentierung in zwei Arten unterteilt. Die rot-pigmentierte Art *P. rubescens* dominiert in tieferen, mesotrophen und thermisch geschichteten Gewässern, während sich die Verbreitung von *P. agardhii*, der grün gefärbten Art auf seichte, eutrophe und polymiktische Gewässer beschränkt. Diese Cyanobakterien produzieren verschiedene bioaktive Peptide, die nicht-ribosomal durch große multifunktionelle Enzyme in den Zellen synthetisiert werden. Diese Enzyme werden durch komplexe Gencluster kodiert, die sich aus Peptidsynthetasen, Polyketidsynthetasen und verschiedenen modifizierenden Enzymen (N- Methyltransferasen, O- Methyltransferasen, Epimerasen) und auch Enzymen mit Ähnlichkeit zu Proteinen, die eine Transportfunktion aufweisen, zusammensetzen. Jüngste Ergebnisse weisen auf eine kontinuierliche Veränderung

der Gene hin, die für die Synthese von einzelnen Toxinen und deren Strukturvarianten verantwortlich sind. Es wurde bereits berichtet, dass die Gene zur Synthese des toxischen Heptapeptids Microcystin (*mcy*) eine hohe Variabilität aufzeigen, die nicht nur in einer Vielfalt an strukturellen Varianten, sondern auch in einer Inaktivierung der Microcystinsynthese resultiert (siehe Jahresberichte 2004, 2005). Inwieweit die Entstehung neuer toxischer Genotypen von Umweltveränderungen beeinflusst wird bzw. in welchen Zeiträumen diese Veränderungen sich selektiv durchsetzen ist gänzlich unbekannt. Weiters sind selektive Faktoren, die einzelne toxische Genotypen begünstigen sowie die Rolle dieser Toxine im Ökosystem ungeklärt. Als traditionell integrative Disziplin kann die Limnologie wichtige Beiträge leisten, um die Dynamik in der Synthese von bioaktiven Naturstoffen in unseren Gewässern zu verstehen.

Diese Fragen werden von der Arbeitsgruppe **R. Kurmayer** (mit Dr. Guntram Christiansen, Johanna Schmidt, Michael Werndl und Examenskandidatinnen) im Rahmen von drei Forschungsprojekten (FWF, EU, CyanoBiotech GmbH) bearbeitet, und im Berichtszeitraum wurden die folgenden Fortschritte erzielt:

- 1) Verschiedene Mutationsereignisse innerhalb einzelner Gene zur Microcystinsynthese wurden näher charakterisiert und ihre Entstehung mittels phylogenetischen Methoden zeitlich eingeordnet
- 2) einzelne distinkte Gene im Gencluster zur Microcystinsynthese wurden funktionell und phylogenetisch charakterisiert
- 3) Quantifizierung von Peptid-Genotypen in Gewässern

Mutationen durch Transposasen innerhalb der Gene zur Microcystinsynthese

Verschiedene Mutationen innerhalb des *mcy*-Genclusters (Insertionen, Deletionen) führten bei *Planktothrix* zur Inaktivierung der Microcystinproduktion (siehe Jahresberichte 2004, 2005). Die bei *Planktothrix* identifizierten Insertionen sind auf Transposasen zurückzuführen, die in der Lage sind, ihre Position im Genom spontan zu verändern und so genetische Restrukturierungen auslösen. Es ist ein Ziel des FWF-Projekts (P18185, Kurmayer), die Häufigkeit der beschriebenen Mutationsereignisse festzustellen und Anhaltspunkte für die zeitliche Einordnung dieser Mutationen zu finden (Diplomarbeit Carole Molitor, Univ. Innsbruck). Diese Abschätzung ist notwendig, um in Zukunft Aussagen über die Schnelligkeit dieser genetischen Veränderungen im *mcy*-Gencluster machen zu können. Dafür wurden verschiedene Mutationen innerhalb des *mcy* (Microcystin)-Genclusters phylogenetisch charakterisiert. Sowohl inaktive, als auch aktive Microcystin-Genotypen wurden hinsichtlich mehrerer Genloci (*mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, 16S rRNA, 16S-23S ITS, PC IGS) sequenziert und mit phylogenetischen Methoden verglichen. Zudem sollte

die Häufigkeit und Kopienzahl der Transposase im Genom der beiden wichtigen Arten *P. rubescens* und *P. agardhii* bestimmt werden.

Insgesamt wurden 35 aktive und inaktive *mcy*-Genotypen untersucht. Die höchste genetische Variabilität wurde in bestimmten Genregionen der Microcystinsynthese von *mcyA* (42,5 %, 501 bp) und *mcyB* (2,6%, 508 bp) festgestellt. Dagegen war die genetische Variation innerhalb von *mcyC* (1,3%, 458bp) und der 16S rRNA Region (0%, 302 bp) sehr gering. Die beiden Spacer Genregionen PC-IGS (6,2%, 211 bp) und 16S-23S ITS (2,3%, 317 bp) zeigten eine höhere Variabilität, es wurde aber nur ein Verwandtschaftszweig von *P. agardhii* mit Isolaten aus Deutschland und Finnland von allen anderen Isolaten von *P. rubescens* und *P. agardhii* klar abgegrenzt. Häufig zeigten die Genregionen von *mcyABC* der inaktiven Microcystin-Genotypen eine perfekte Übereinstimmung mit den *mcyABC* Genen aktiver Microcystin-Genotypen. Folglich wurden inaktive Genotypen zusammen mit aktiven Vertretern verschiedenen Verwandtschaftslinien zugeordnet (Abb. 5). Zum Beispiel wurden Microcystin-Genotypen, die durch Insertion der Transposase an derselben Stelle des Genclusters (in *mcyD*) inaktiviert wurden, verschiedenen Verwandtschaftszweigen zugeordnet. Diese Ergebnisse bedeuten, dass die Inaktivierung des *mcy*-Genclusters durch Transposasen mehrmalig und unabhängig entstanden ist. Zusätzlich ist die Insertion des einen Verwandtschaftszweiges (Stämme No139, 145, 170) wahrscheinlich jünger anzusetzen als die Insertion, die im Stamm No110 passiert ist. Für eine wiederholte Aktivität der Transposase spricht auch, dass bei einzelnen inaktiven Microcystin-Genotypen Punktmutationen (genetische „Fußabdrücke“) detektiert wurden (z.B. No 67), die wahrscheinlich durch ein ungenaues Ausschneiden der Transposase entstanden sind.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Mutationen bedingt durch die Transposase zeitlich versetzt ablaufen und unabhängige Ereignisse darstellen. Während einzelne Isolate die Insertion in *mcyD* noch besitzen, haben andere Isolate die Transposase bereits wieder verloren. Zum Teil bleiben punktuelle Mutationen übrig, die eine (Re)Aktivierung der Microcystinsynthese verhindern. Die Transposase scheint also kontinuierlich über die Zeit aktiv zu sein. Man könnte annehmen, dass inaktive *mcy*-Genotypen durch die Transposase in einzelnen Gewässern tatsächlich entstanden sind, z.B. stammen alle Isolate der *mcyDIS2* Inaktivierung aus dem Grabensee im Flachgau (No139, 145, 161, 166, 169, 170, 178). Die beiden inaktiven *mcy*-Genotypen der Isolate No62, 65 stammen hingegen aus dem Irrsee und enthalten nur mehr mögliche Fußabdrücke der Transposase. Die Möglichkeit, dass es sich bei diesen Insertionen um Laborartefakte handelt, kann aufgrund des Nachweises dieser Mutationen direkt in den Gewässern ausgeschlossen werden (Christiansen et al. 2006). Die Transposasen wurden bei allen rot-pigmentierten Isolaten der Art *P. rubescens* aus ganz Europa gefunden (n=72), während bei

den grün-pigmentierten Isolaten der Art *P. agardhii* dieselbe Transposase entweder vorhanden (73%) war oder fehlte (27%, n=28). Im Vergleich zur Kopienzahl des Phycocyanin-Genclusters schwankte die Kopienzahl der Transposase im Genom einzelner Isolate maximal um das Vierfache. Aufgrund dieser weiten Verbreitung kommt der Transposase als Faktor in der Regulation der Microcystinproduktion im Gewässer Bedeutung zu.

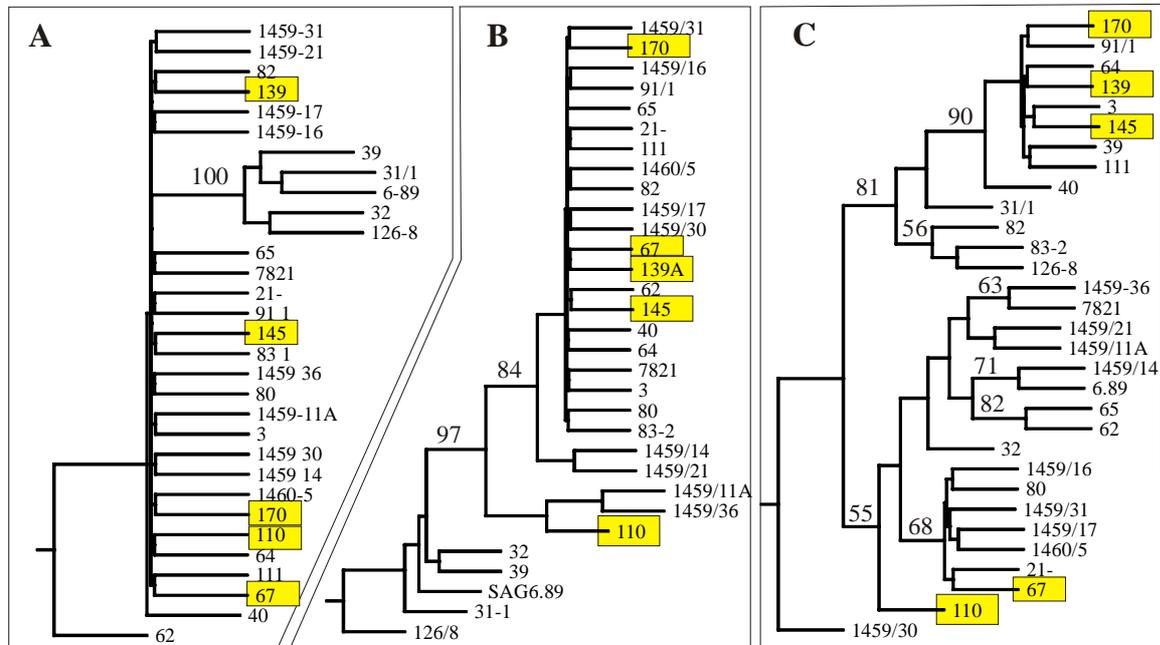


Abb. 5. Stammbäume für drei Genloci (A: 16S-ITS (314 bp), B: PC-IGS (211 bp), C: *mcyB* (506 bp) aus 35 aktiven und inaktiven Microcystin-Genotypen von *Planktothrix* spp. Inaktive Genotypen, die die Insertion einer Transposase in *mcyD* (oder Reste davon, No67) aufweisen, sind gelb unterlegt. Die Stammbäume wurden nach dem Maximum Likelihood Prinzip (Programm PHYLIP) berechnet.

Charakterisierung einer TypII - Thioesterase, eines distinkt gelegenen Enzyms am 5' Ende des Microcystin Synthetase Genclusters

Auffällig ist bei der Gattung *Planktothrix* spp., dass im Unterschied zu allen anderen Microcystin produzierenden Cyanobakterien ein Enzym auftritt, das für eine zusätzliche Thioesterase kodiert. Typ II - Thioesterasen wurden sowohl innerhalb als auch am 5' oder 3' Ende von Peptidsynthetase-Genclustern bei *Bacillus subtilis* beobachtet. Die entgegengesetzte Transkriptionsrichtung im Vergleich zu den andern *mcy*-Genen und die flankierende Anordnung von *mcyT* machen deutlich, dass es sich hierbei um ein eigenständiges Modul handelt, das nicht in das *mcy*-Gencluster (Abb. 6) integriert ist und nicht zwangsläufig nur mit der Microcystinsynthese interagieren muss. Funktionelle Studien bei *Bacillus subtilis* zeigten, dass Typ II - Thioesterasen Acylgruppen entfernen, die durch das Co-Enzym A an den

Phosphopantethein-Peptidyl-carrier gebunden sind und dadurch die Syntheserate für ein bestimmtes Peptid erhöhen.

Um die Rolle von *mcyT* experimentell zu überprüfen wurde dieses Gen durch homologe Rekombination mit einem Gen, das für Resistenz gegen Chloramphenicol kodiert, ausgeschaltet und die Microcystinsyntheseraten analysiert. Tatsächlich wurden in den Zellen der Mutanten mit inaktiviertem *McyT* zwanzig- bis dreißigfach geringere Microcystingehalte in den Zellen nachgewiesen, die Microcystinsynthese an sich wurde aber nicht gestoppt. Die Syntheseraten verwandter Peptide, Aeruginosin und Anabaenopeptin blieben unbeeinflusst. Daraus folgt, dass einzelne Isolate mit einer inaktiven TypII - Thioesterase tatsächlich nur sehr wenig Microcystin produzieren. Bis jetzt wurden zwei solche Isolate aus den Salzkammergutseen isoliert (Christiansen et al. in prep.)

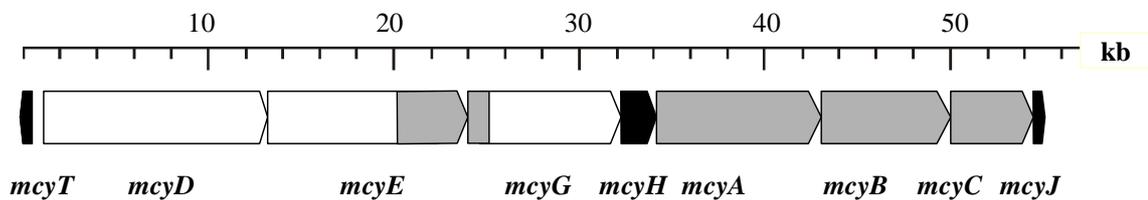


Abb. 6. Schematische Darstellung des Microcystin-Synthetase-Genclusters von *Planktothrix* spp. Dieser Gencluster setzt sich aus 10 Proteinen zusammen, die sich aus Peptidsynthetasen (grau), Polyketidsynthetasen (weiss) und modifizierenden Enzymen (schwarz) und Proteinen mit Transportfunktion (*mcyH*) zusammensetzen. Zwischen den Genen *mcyT*, einer TypII - Thioesterase und *mcyD*, einer Polyketidsynthase, liegt die Promotorregion, von der aus die Transkription in beide Richtungen erfolgt.

Quantifizierung von Peptid-Genotypen in Gewässern

Es ist seit längerem bekannt, dass toxische Genotypen gemeinsam mit nicht-toxischen im Gewässer vorkommen und sehr bald ist die Hypothese entstanden, dass die Abundanz toxischer Genotypen der entscheidende Faktor für die Toxin-Produktion im Gewässer ist. Es wurde bereits häufig vermutet, dass bestimmte Faktoren, wie z.B. aquatische Crustaceen, das Auftreten toxischer Genotypen fördern und es daher, abhängig vom Weidedruck, saisonale Verschiebungen in der Genotypenzusammensetzung gibt. Die in Mondsee entwickelte real-time PCR - Methode (siehe Jahresbericht 2003) ist bis jetzt die einzige Möglichkeit, einzelne Genotypen im Gewässer zu quantifizieren. Im Zuge der real-time PCR wird die Amplifikation des PCR-Produkts über Fluoreszenzmarker verfolgt, und die Anzahl der benötigten Zyklen zur Erreichung einer festgelegten Signalintensität gemessen. Dadurch können Kalibrierkurven mit verdünnten DNA-Gehalten erstellt werden und aus der Zahl der benötigten PCR-Zyklen auf die DNA in Zelläquivalenten umgerechnet werden. Wir haben die Methode derart entwickelt, dass der Anteil toxischer Genotypen immer im Vergleich zur gesamten Population abgeschätzt wird, wodurch der Einfluss physiologisch bedingter Schwankungen im DNA-Gehalt minimiert wird.

In dem im Juni 2006 beendeten EU Netzwerk „PEPCY“ (Toxic and other bioactive peptides in cyanobacteria“, www.pepcy.de) stellte sich die Aufgabe, das Auftreten einzelner Peptid-Genotypen in europäischen Gewässern zu quantifizieren. Nachdem in diesem EU - Netzwerk die Zusammenarbeit von zehn Partnerinstitutionen aus Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Großbritannien, Norwegen sowie aus den Niederlanden erforderlich war, mussten (1) die verwendeten DNA-Extraktionsmethoden auf Ihre Tauglichkeit überprüft und standardisiert und (2) die Ergebnisse zwischen einzelnen Arbeitsgruppen verglichen werden. Diese methodischen Probleme wurden im Zuge der Dissertation von Eva Schober (Univ. Wien) aufgearbeitet. Die Ergebnisse zeigen, dass (i) es ähnlich zur Extraktion von Pigmenten aus Algen (z.B. ist die Extraktionsmethode für Chlorophyll a zur Abschätzung der Phytoplanktonbiomasse international standardisiert) möglich ist, DNA quantitativ und in hoher Qualität aus Gewässerproben zu isolieren, (ii) die mittels quantitativer PCR erzielten Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen auch reproduziert werden können (Schober & Kurmayer 2006, Schober et al. 2006).

Da die Zellzahl von Cyanobakterien in Gewässern saisonal bedingt um das hunderttausendfache schwankt, war es wichtig, für einzelne toxische Genotypen die Häufigkeit sowohl zum Zeitpunkt geringer Zelldichten im Winter als auch zum Zeitpunkt hoher Zelldichten im Spätsommer zu bestimmen. Diese Messungen wurden für drei Peptid-Genotypen durchgeführt, die bereits im Vorjahr durch Knockout - Mutagenese experimentell überprüft worden waren (siehe Jahresbericht 2005). Interessanterweise kann das Wachstum einzelner toxischer Genotypen durch den Zuwachs der gesamten Population am besten erklärt werden (zu mehr als 90%), was bedeutet, dass es saisonal bedingt zu keiner Verschiebung der Genotypenzusammensetzung gekommen ist. Dadurch kann die im Mikroskop bestimmte Zellzahl als Faktor für die Risikoabschätzung im Gewässer herangezogen werden. Die grün-pigmentierten Populationen von *Planktothrix* spp. (aus dem Wannsee und dem Frederiksborg Slotso, Dänemark) zeigten einen deutlich niedrigeren Anteil an Microcystin-Genotypen als die rot-pigmentierten Populationen in den Alpenseen (Abb. 7A). Bei dem Anteil der Aeruginosin-Genotypen (Abb. 7B) und dem Anteil der Anabaenopeptin-Genotypen (Abb. 7C) gab es zwischen den Alpenseen und den seichten Gewässern keine Unterschiede.

Vorschau für 2007 und Planung für 2008

Die praktische Arbeit für 2007 wird im wesentlichen durch das FWF-Projekt P18185 „Mikroevolution der Toxinsynthese bei Cyanobakterien“ (Kurmayer, Laufzeit Juli 2005 – Dez 2007) bestimmt (G. Christiansen, M. Werndl, C. Molitor, V. Ostermaier). Die phylogenetischen Analysen zur Rolle von Transposasen bzw. zum Abbau inaktiver und nicht mehr benötigter

Erbanlagen und deren zeitliche Einordnung sind im wesentlichen abgeschlossen und im Stadium der Auswertung. Seit Sommer 2005 erfolgen regelmäßige Beprobungen von Zuflüssen zur Verbreitung von Genotypen sowie die Untersuchung von mehr als zehn Seen der Alpenregion hinsichtlich der Häufigkeit von Mutationen und anderen Rekombinationsereignissen (Michael Werndl, Technische Assistenz). Die Mutationen werden wiederum mit Hilfe quantitativer PCR-Technik gemessen und statistisch bezüglich verschiedener Umweltfaktoren analysiert (Diplomarbeit Veronika Ostermaier, Univ. München). Die Translation der *mcy* Gene soll durch den immunologischen Nachweis der für die Microcystin-Synthese verantwortlichen Enzyme untersucht werden (Dr. Guntram Christiansen).

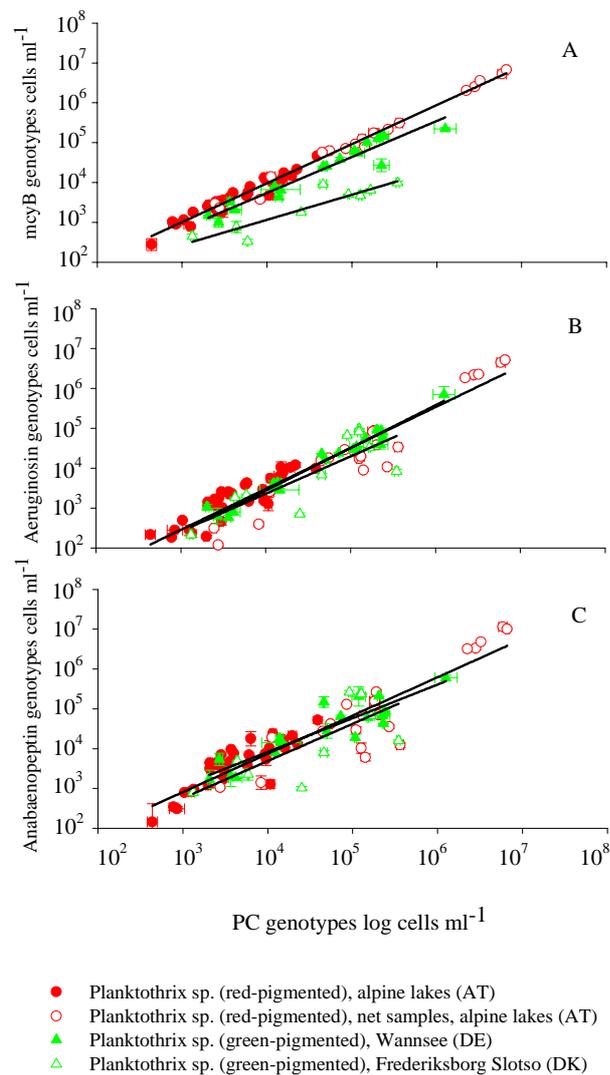


Abb. 7. Beziehung zwischen der Zahl der (A) Microcystin-Genotypen, (B) Aeruginosin-Genotypen, (C) Anabaenopeptin-Genotypen und der gesamten Population (Phycocyanin-Genotypen) von *Planktothrix* spp. (in log Zellen ml⁻¹), rote Symbole (rot-pigmentierte Populationen aus den Alpenseen), grüne Symbole (grün-pigmentierte Populationen aus seichten Gewässern). Die Regressionsgeraden wurden durch Approximation der kleinsten Quadrate berechnet und waren statistisch hochsignifikant. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) lag in allen Fällen deutlich über 0,5 (Schober et al., in prep.).

Im Zuge einer Kooperation mit der Firma Cyano Biotech GmbH sollen verschiedene Stämme von Cyanobakterien auf ihre genetische Transformierbarkeit getestet werden. Dazu werden 30 ausgewählte Stämme mit verschiedenen Plasmiden, die Antibiotikaresistenzgene tragen auf ihre natürliche Kompetenz getestet. Weiters werden die Zellen unterschiedlich behandelt, um ihre Transformierbarkeit zu erhöhen. Schließlich soll versucht werden mit *E. coli* und selbstreplizierenden Plasmiden Cyanobakterien durch Konjugation genetisch zu verändern. Dadurch sollen die Stämme identifiziert werden, die genetisch manipulierbar sind und für zukünftige genetische Veränderungen in Frage kommen.

1.3.3 Untersuchungen zur Ökologie planktischer Süßwasserbakterien

Die Forschungsarbeiten über die Ökologie der Süßwasserbakterien (M. Hahn, mit U. Brandt, Q. Wu, M. Tarao, A. Minasyan, M. Kaddumukasa, T. Scheuerl) widmeten sich im Berichtsjahr im wesentlichen drei Schwerpunkten: (1.) Die Arbeiten zur ökologischen Bedeutung der Mikrodiversität bei pelagischen Bakterien, und insbesondere bei *Polynucleobacter* spp. wurden fortgesetzt, (2.) die Analyse des Genoms von *Polynucleobacter* sp. QLW-P1DMWA-1 wurde begonnen und (3.) die Analyse der Struktur und Diversität von *Polynucleobacter*-Populationen wurde intensiviert.

Ökologische Bedeutung der Mikrodiversität bei Bakterien

Im Berichtszeitraum wurde eine Untersuchung zur Diversität des Bakterioplanktons entlang eines Salinitätsgradienten in Seen des tibetischen Plateaus abgeschlossen (Wu et al. 2006). Es wurden Süßwasserseen (Salinität < 1g/L) und unterschiedliche Salzseen (oligosalin bis hypersalin) bis zu einer Salinität von 200g/L untersucht. Es zeigte sich, dass die taxonomische Zusammensetzung des Bakterioplanktons vor allem durch die Salinität kontrolliert wurde. Mit wenigen Ausnahmen konnten Bakterientaxa, die typischerweise im Süßwasser gefunden werden, zwar auch in den tibetischen Süßwasserseen nachgewiesen werden, nicht jedoch in den verschiedenen Salzseen (Abb. 8E). Erstaunlich war der Nachweis verschiedener aus Flachlandgewässern gut bekannter Taxa in großen Höhenlagen. So konnten *Polynucleobacter* spp. auch in 5000 Meter über Normalnull nachgewiesen werden. Einige aus Süßgewässern bekannte Taxa, wie z.B. die GKS98 Gruppe (*Betaproteobacteria*), wurden jedoch auch in Salzgewässern nachgewiesen. Die GKS98 Gruppe ist aus dem sehr ionenarmen Gossenköllesee (Tirol) bekannt und konnte von uns aus verschiedenen Süßgewässern isoliert werden. Diese Gruppe wurde jedoch auch in hypersalinen tibetischen Salzgewässern gefunden (Abb. 8E). Ökophysiologische Experimente mit Süßwasserisolaten zeigten, dass einzelne Vertreter dieser Gruppe keine Salztoleranz aufweisen, die die Existenz in hypersalinen Habitaten erlauben würde

(Abb. 8E). Diese Befunde weisen auf eine große ökophysiologische Diversität innerhalb der GKS98 Gruppe hin. Die phylogenetische Untersuchung von 16S rRNA Gensequenzen von Organismen der tibetischen Salzseen zeigen jedoch, dass auch in einigen anderen Verwandtschaftsgruppen eng verwandte Süßwasser- und Salzwasserbewohner auftreten (Abb. 9). Diese Befunde unterstreichen die große ökologische Diversität innerhalb vieler artähnlicher Prokaryotentaxa.

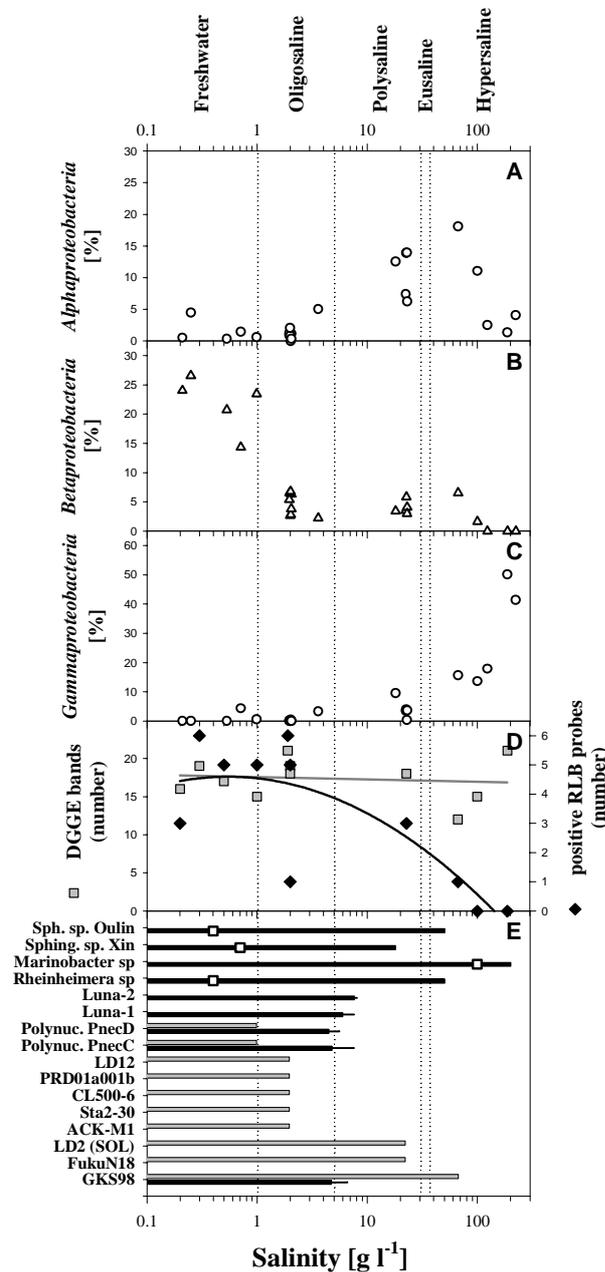


Abb. 8. Relative Abundanzen von *Alphaproteobacteria* (A), *Betaproteobacteria* (B), und *Gammaproteobacteria* (C) in tibetischen Seen unterschiedlicher Salinität. (D) Abschätzung der prokaryotischen Diversität mittel Denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) und Reverse Line Blot Hybridisierung (RLB). (E) Ergebnisse ökophysiologischer Untersuchungen der Salztoleranz von kultivierten Bakterienstämmen unterschiedlicher Verwandtschaftsgruppen (schwarze Balken) und Detektion verschiedener aus Süßgewässern bekannter Bakteriengruppen in Gewässern unterschiedlicher Salinität (graue Balken). Verwendete Abkürzungen: Sph. sp. Oulin – *Sphingomonas* sp. “Oulin”, Sphing. sp. Xin – *Sphingomonas* sp. „Xin“, Polynuc. – *Polynucleobacter* (nach Wu et al., 2006)

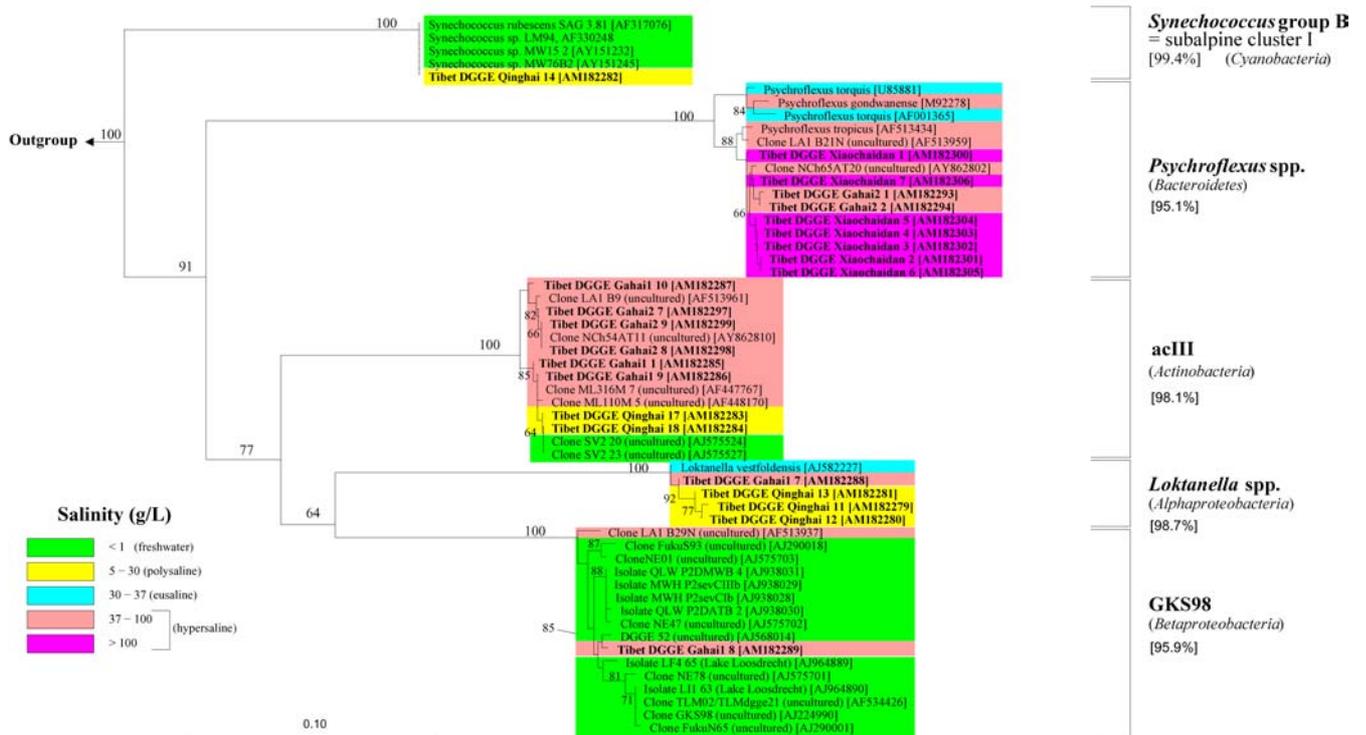


Abb. 9. Enge Verwandtschaftsbeziehungen zwischen süßwasserbewohnenden Bakterientaxa aus Flachlandgewässern und tibetischen Salzwasserbewohnern. Der Stammbaum basiert auf partiellen 16S rRNA Gensequenzen. Die Salinität der Heimatgewässer der Organismen wird durch unterschiedliche Hintergrundfarben angezeigt (nach Wu et al., 2006).

Weiterhin wurden im Berichtszeitraum verschiedene Projekte abgeschlossen. So wurden die Untersuchungen zur Ökologie und Diversität der filamentösen SOL-Bakterien (Schauer und Hahn 2005, Schauer et al. 2005, Schauer et al. 2006) mit der Beschreibung der neuen Taxa ‘*Candidatus Aquirestis calciphila*’ and ‘*Candidatus Haliscomenobacter calcifugiens*’ abgeschlossen (Hahn & Schauer, in press).

Polynucleobacter Genom Projekt

Im Jahr 2005 wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Joint Genome Institute (JGI) ein Genomprojekt begonnen. Dieses Projekt hat die vergleichende Analyse der Genome zweier eng verwandter *Polynucleobacter*-Stämme zum Ziel. Beide Stämme gehören dem artähnlichen Subcluster C des *Polynucleobacter*-Clusters an, unterscheiden sich jedoch grundlegend in ihrer Ökologie. Beim einen Stamm handelt es sich um ein freilebendes Planktonbakterium und beim zweiten Stamm um einen obligaten Endosymbionten des Ciliaten *Euplotes aediculatus* (Vannini et al. 2007). Der freilebende Vertreter konnte als Reinkultur gezüchtet werden, so dass die Bereitstellung entsprechender Mengen an DNA für die Genomsequenzierung unproblematisch war. Die Gewinnung ausreichender Mengen von Erbsubstanz des obligaten Endosymbionten ist jedoch sehr problematisch, da dieser Bakterienstamm nicht als Reinkultur gezüchtet werden kann. Durch die intensiven Bemühungen der Kooperationspartner Dr. Giulio Petroni und Dr. Claudia Vannini (beide Universität Pisa) konnten jedoch im Jahr 2006 ausreichende DNA-Mengen des Endosymbionten für den Beginn von Sequenzierarbeiten gewonnen werden.

Im Berichtszeitraum wurden vom Joint Genome Institute (JGI) die ersten Sequenzen des Genoms des freilebenden *Polynucleobacter* sp. QLW-P1DMWA-1 in Form einer „draft genome sequence“ zur Auswertung zur Verfügung gestellt. Der verfügbare Sequenzdatensatz bestand aus 15 Contig-Sequenzen. Im Dezember 2006 wurde die Genomsequenzierung dieses freilebenden *Polynucleobacter* Stammes abgeschlossen und die erstellte komplette Genomsequenz befindet sich derzeit in der abschließenden Qualitätskontrolle.

Erste Analysen der „draft sequence“ deuten auf eine starke Rationalisierung der Genomsequenz des freilebenden Stammes hin. So unterscheidet sich das Genom dieses Süßwasserbakteriums hinsichtlich Genomgröße (Abb. 10A), Genlänge, GC-Gehalt (Abb. 10B und C) und Redundanz in erheblichem Umfang von den Genomen der nächstverwandten Bodenbakterien (z.B. *Cupriavidus metallidurans*, *Ralstonia solanacearum*).

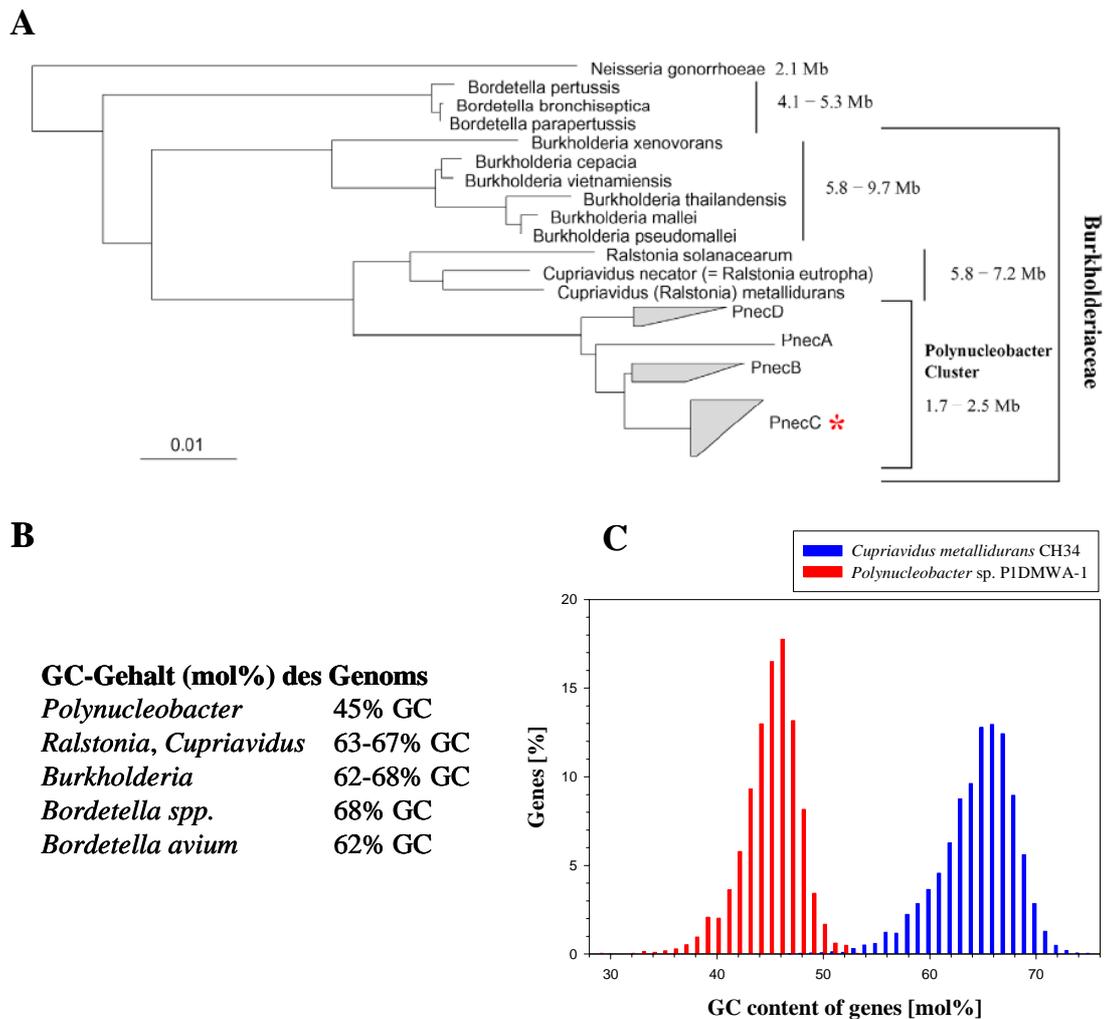


Abb. 10. (A) Verwandtschaftsverhältnisse zwischen *Polynucleobacter* spp. und anderen *Burkholderiaceae* (*Betaproteobacteria*) sowie Genomgrößen (in Mb, 10^6 Basenpaare) der jeweiligen Vertreter. (B) GC-Gehalte der Genome der in (A) gezeigten Bakterien. (C) Verteilung des GC-Gehaltes einzelner Gene bei *Polynucleobacter* sp. QLW-P1DMWA-1 und *Cupriavidus* (ehemals *Ralstonia*) *metallidurans*.

Populationsstruktur und Dynamik von *Polynucleobacter* Populationen

Durch die Verfügbarkeit der Genomsequenz ergeben sich neue Möglichkeiten zur kultivierungsunabhängigen Detektion von *Polynucleobacter* Bakterien in Umweltproben. So konnten PCR-getriebene Methoden zur genotypspezifischen Detektion des genomsequenzierten Stammes entwickelt werden. Diese Methoden werden derzeit genutzt um das Vorkommen dieses Stammes in den Gewässern eines 2000 km² großen Gebietes im Salzkammergut zu untersuchen. Hierzu wurden zahlreiche Seen und Teiche in unterschiedlichen Höhenlagen im Sommer 2006

beprobte (Abb. 11). In die Untersuchung wurden limnologisch stark unterschiedliche Gewässer, wie zum Beispiel der große, oligotrophe Attersee, kleine Makrophyten-dominierte Teiche und saure Hochgebirgs-Lacken eingeschlossen (Abb. 11). Trotz der enormen physico-chemischen und ökologischen Unterschiede wurde für alle 43 untersuchten Gewässer die Anwesenheit von *Polynucleobacter* Bakterien des Subclusters C (PnecC) nachgewiesen. Die Untersuchungen zur Biogeografie des genomsequenzierten Stammes sollen im laufenden Jahr abgeschlossen werden.

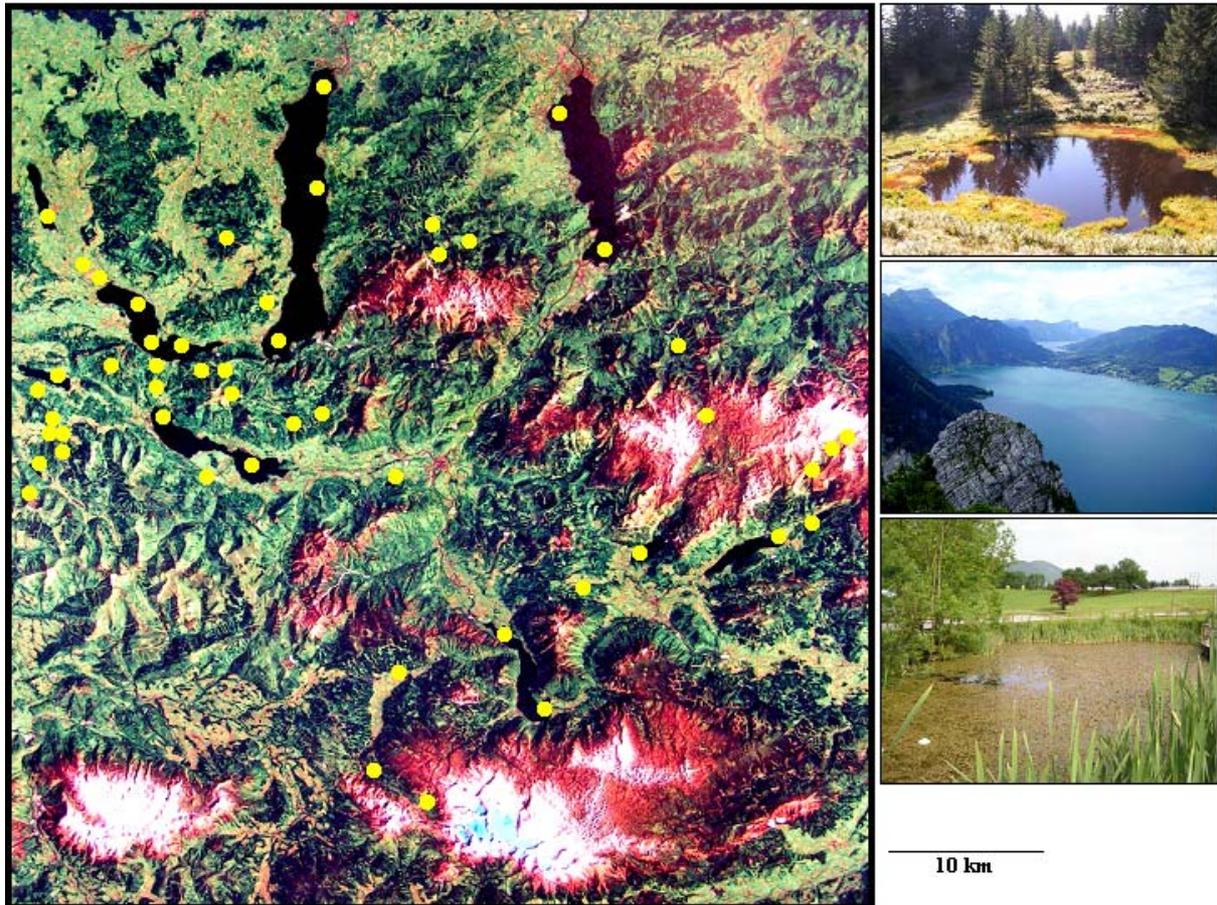


Abb. 11. Untersuchungen zur Biogeografie des *Polynucleobacter* Subclusters C im Salzammergut. Es wurden 50 Proben (gelbe Punkte) aus 43 Gewässern entnommen. Die untersuchten Gewässer unterscheiden sich in vielerlei Aspekten, so z.B. hinsichtlich pH-Wert (4,7 bis 8,5) und Leitfähigkeitswert (5 bis 500 $\mu\text{S cm}^{-1}$).

1.3.4 Ökologie und Diversität von Süßwasser-Flagellaten

Im Berichtsjahr wurde von dieser Arbeitsgruppe (**J. Boenigk**, mit K. Pfandl, B. Auinger, L. Eisl, A. Wiedlroither und Gästen) das Forschungsprojekt FWF P 15940 (J. Boenigk) abgeschlossen und die wesentlichen Ergebnisse publiziert (Boenigk et al. 2006 c, Pfandl & Boenigk 2006). Drei weitere Projekte (FWF P18315, FWF P18767 und CLIM-LAND) wurden im Berichtszeitraum begonnen. Eine intensive Probennahmecampanie charakterisierte dementsprechend das Jahr. Die Beprobung umfasste einerseits die 14tägige Beprobung von Seen in einem alpinen Gradienten vom Alpenvorland bis in die Niederen Tauern, andererseits die Beprobung der Fuschler Ache, ihrer Hauptzuflüsse und der umliegenden Böden. Die Proben wurden hinsichtlich der Algen- und Protistengesellschaft charakterisiert und für molekulare Untersuchungen vorbereitet. Über 100 Goldalgenstämme aus verschiedenen Seen wurden isoliert und erfolgreich in Dauerkultur überführt.

Die experimentelle Arbeit im Berichtszeitraum gliederte sich in folgende Schwerpunkte:

Funktionelle Diversität der Goldalgen

Die Untersuchungen zur Ernährungsstrategie von verschiedenen Goldalgenarten (der mixotrophen *Poteroiochromonas* und der heterotrophen *Spumella*) in Kooperation mit Dr. P.J. Hansen wurden abgeschlossen und publiziert (Boenigk et al. 2006c). Die Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Arten erheblich in ihrer Ernährungs-/ Überlebensstrategie voneinander abweichen. Während der mixotrophe *Poteroiochromonas* ein K-Strategie ist, also lange Hungerperioden überdauern kann, aber dafür andererseits bei guten Futterbedingungen keine hohen Wachstumsraten erreicht, ist der heterotrophe *Spumella* ein r-Strategie mit hohen Wachstumsraten bei ausreichendem Futterangebot, aber hohen Mortalitätsraten bei Hungerbedingungen (Abb. 12).

Lokale Adaption und biogeographische Verteilungsmuster von Protisten

Im Rahmen der neu angelaufenen FWF-Projekte wurden insgesamt 40 Seen im Salzkammergut zum Teil alle zwei Wochen beprobt. Die Auswertung des umfangreichen Datensatzes soll im laufenden Jahr erfolgen.

Hinsichtlich der Verwandtschaftsgruppe der *Spumella*-artigen Flagellaten geben die molekularen Daten (SSU rRNA) grobe Hinweise hinsichtlich der ökophysiologischen Anpassung, reichen aber für eine Charakterisierung des Ökotyps nicht aus.

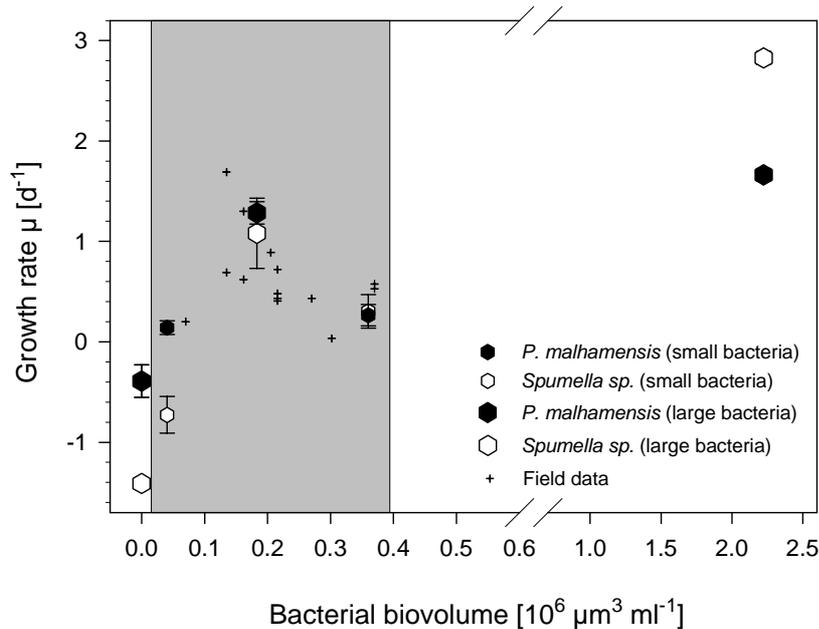


Abb. 12. Wachstumsraten von *Poteroiochromonas* und *Spumella* bei unterschiedlichen Futterbedingungen. Der grau hinterlegte Bereich bezeichnet die Futterbedingungen, die im Freiland realisiert sind (Boenigk et al. 2006c).

In Kooperation mit Dr. T. Stoeck wurde weiterhin eine Analyse weiterer phylogenetisch wichtiger Sequenzabschnitte in Angriff genommen. Die molekularen Daten wurden von Herrn S. Jost in einer Diplomarbeit erhoben und stehen unmittelbar vor der Publikation. Sie sollen in Verknüpfung mit den ökophysiologischen Daten eine Aussage hinsichtlich der Eignung unterschiedlicher phylogenetischer Marker für ökologische Zwecke erlauben.

Ökologie suspendierter Sedimente

Die im Rahmen des FWF-Projektes P15940 „Interaktionen zwischen Protisten und suspendiertem Sediment“ durchgeführten Experimente zur Bedeutung suspendierter Feinsedimente wurden abgeschlossen. Die Arbeiten zur funktionellen und numerischen Antwort heterotropher Chrysomonaden auf suspendierte Sedimente im Rahmen der Doktorarbeit von Frau K. Pfandl wurden publiziert (Pfandl & Boenigk 2006). Die Ergebnisse deuten auf eine enorme Bedeutung suspendierter Feinsedimente für die Fraßinteraktionen zwischen Flagellaten und Bakterien hin. Die Partikelgröße konnte hier als Kernparameter identifiziert werden.

Mikrodiversität und mikrobielle Ökologie der Wasser-Land-Schnittstelle

Zur Überprüfung der bisherigen Ergebnisse zur intraspezifischen Variabilität wurde das Ökoton Fuschlsee-Fuschler Ache-Mondsee mit den umliegenden Bodenhabitaten erneut intensiv beprobt. Die Proben des Vorjahres wurden ausgewertet und werden derzeit im Rahmen der Dissertation von Frau Mag. K. Pfandl ausgewertet. Eine gewässerchemische Analyse wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Frau M. Strobl begonnen.

Die Untersuchungen zur Mikrodiversität auf globaler Ebene wurden publiziert (Boenigk et al. 2006a, b). Die Ergebnisse belegen einen Zusammenhang zwischen phylogenetischer Verwandtschaft (auf Basis der SSU rRNA Sequenz) und der Temperaturanpassung. Dieser Zusammenhang wird deutlich in den unterschiedlichen Anpassungen der Stämme des C1- und des C3-Clusters. Der Zusammenhang zwischen Verwandtschaft und ökophysiologischer Anpassung wird aber überlagert von geographischen Mustern. So sind alle Isolate aus der Antarktis kaltadaptiert (Abb. 13)

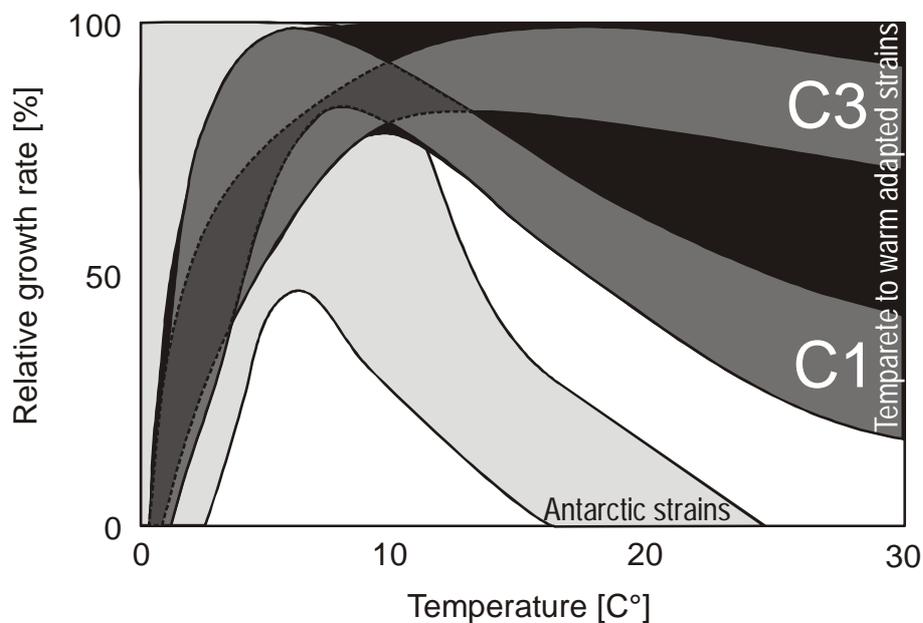


Abb. 13. Relative Temperaturanpassung von Stämmen aus temperaten und tropischen Gebieten (Dunkelgrau bis schwarz) und aus der Antarktis (hellgrau). Die temperaten und tropischen Stämme lassen eine unterschiedliche Temperaturanpassung erkennen, die mit der phylogenetischen Zugehörigkeit zu unterschiedlichen SSU rRNA Clustern korreliert (dargestellt für den C1- und C3-Cluster; Boenigk et al. 2006b).

Projekte:

FWF Projekt 15940 „Interaktionen zwischen Protisten und suspendierten Sedimenten“

FWF Projekt 18315 „Diversität und Encystierungsmuster von Chrysophyceen“ (seit 15.12.2005)

CLIML_LAND in Kooperation mit Roland Schmidt

Sanofi-Aventis: „Bioaktive Sekundärmetabolite in Flagellaten“

Vorschau für 2007 und Planung für 2008

- Die oben angesprochenen Projekte sollen weitergeführt werden, die Auswertung und Publikation der Ergebnisse soll vorbereitet werden
- in Kooperation mit Sanofi-Aventis sollen weitere Stämme hinsichtlich der Sekundärmetabolite analysiert werden

1.3.5 Ökologie und Diversität von Ciliaten

Die Ciliaten wurden weiterhin als Modellorganismen für die experimentelle Bearbeitung allgemeiner ökophysiologischer und evolutionsökologischer Fragestellungen eingesetzt (T. Weisse, mit E. Gächter, U. Scheffel & P. Stadler). Der Stand der Forschung zu diesem Thema wurde im Berichtszeitraum in einem Übersichtsartikel publiziert (Weisse 2006a).

Die Untersuchung des kosmopolitisch verbreiteten, aber seltenen oligotrichen Ciliaten *Meseres corlissi* wurde im Rahmen des interdisziplinären, internationalen FWF-Projektes P16796 (Weisse, in Zusammenarbeit mit Prof. W. Foissner, Salzburg, Dr. H. Müller, Konstanz und Dr. M. Strüder-Kypke, Guelph, Kanada) fortgesetzt. Die vergleichenden, ökophysiologischen Laborexperimente zu der Temperaturreaktionsnorm von 8 verschiedenen *Meseres*-Klonen aus unterschiedlichen Kontinenten und Klimazonen ergaben eindeutige Belege für Standort-spezifische, lokale Adaptation (Gächter & Weisse 2006 sowie die im Herbst 2006 erfolgreich abgeschlossene Dissertation von Frau Elke Gächter). Die im Labor ermittelte, zur Populationsvermehrung benötigte, Minimaltemperatur zeigte eine deutliche Beziehung zur Minimaltemperatur der Habitate, aus dem die jeweiligen Klone isoliert worden waren (Abb. 14).

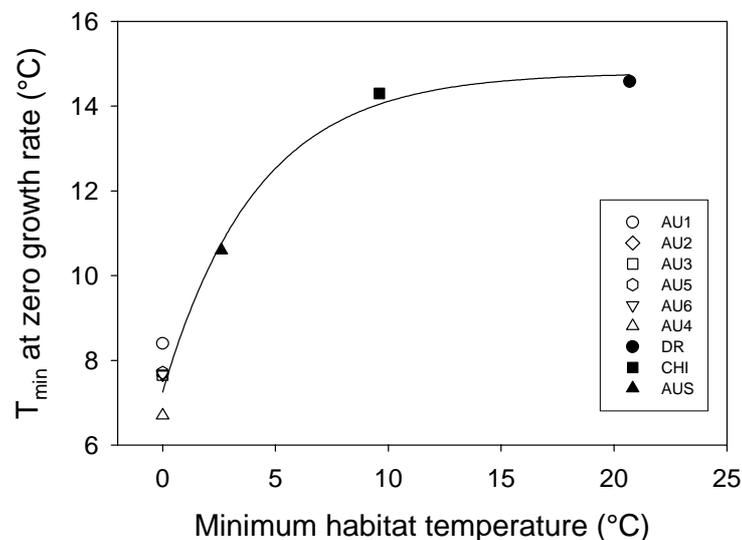


Abb. 14. Minimum temperature tolerated by *Meseres corlissi* clones from different geographical regions vs minimum monthly temperature encountered in their respective habitat. Data were fit to an equation describing exponential rise to the maximum of the form $y=y_0 + a(1-e^{-(b*x)})$, where y_0 , a and b are constants. Open symbols=Austrian clones, filled symbols=non-Austrian strains (Gächter & Weisse 2006)

Signifikante Unterschiede zwischen den Klonen wurden für eine Reihe weiterer Untersuchungsparameter (Zellvolumen, Produktionsraten, pH-Toleranz) ermittelt. Die Abb. 15 zeigt, dass die zelluläre Produktionsrate in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums innerhalb zweier Klone des Salzburger Typusstandortes konstant war (Abb. 15a), sich aber bei anderen

Klonen mit zunehmender geografischer Entfernung von diesem Standort signifikant veränderte. Die pH-Optima des australischen (Abb. 15c) und des chinesischen Stammes (Abb. 15d), die sich nicht überlappen, verdeutlichen die Nischendiversifizierung innerhalb dieser Art.

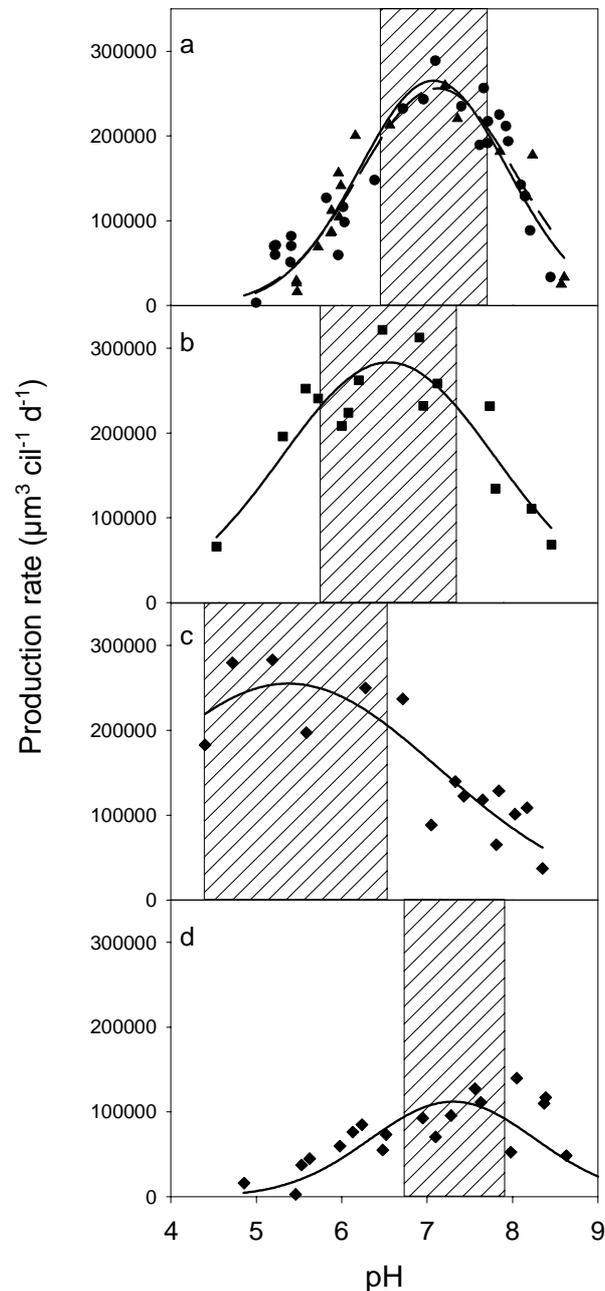


Abb. 15. Cellular production rate of 5 *Meseres corlissi* clones vs pH. Solid lines represent the fit of a 3 parameter Gaussian peak equation. The hatched areas indicate the pH optimum at which production reached >80 % of the respective maximum (a=clone AU3, circles and clone AU5, triangles; b=clone AU6; c=clone AUS, d=clone CHI). (Weisse et al., manuscript submitted)

Die intraspezifischen Unterschiede in der pH-Reaktionsnorm von *M. corlissi* entsprechen in ihrer relativen Bedeutung etwa jenen interspezifischen Unterschieden, die zuvor unter sehr ähnlichen experimentellen Bedingungen bei drei nahe verwandten Arten prostomer Ciliaten der

Gattung *Urotricha* gemessen worden waren (Weisse & Stadler 2006). Wenn sich diese Ergebnisse verallgemeinern lassen, muss auch bei dem Umweltfaktor pH-Wert damit gerechnet werden, dass keine klare Trennung zwischen der relativen Bedeutung inter- und intraspezifischer Einnischung besteht. Ähnliche Ergebnisse waren bisher nur für den Umweltfaktor Temperatur erzielt worden (Weisse & Rammer 2006). Die allgemeine Bedeutung derartiger ausgeprägter, ökophysiologischer Unterschiede innerhalb einer Art für die Messung der Biodiversität der frei lebenden Mikroorganismen wurde in einem weiteren Übersichtsartikel diskutiert (Weisse 2006b).

Die Bildung von Dauerstadien (Cysten) ist ein wichtiger Teil der Lebensstrategie von *Meseres corlissi*, wodurch sich dieser Ciliat erfolgreich an zeitweilig trocken fallende Gewässer wie Wiesentümpel, Überflutungsbereiche von Flüssen und die Reservoirs von Kannenpflanzen (Bromelien) angepasst hat. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Salzburger Kooperationspartners enthüllten im Detail die Vorstufen der Cystenbildung, die eine Encystierung des Ciliaten innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes (~ 1h bei Raumtemperatur) ermöglichen (Foissner et al. 2006, Foissner & Pichler 2006; s.a. http://www.oeaw.ac.at/limno/files/pdf/Meseres_update06_01.pdf). Diese Arbeiten wurden ergänzt durch experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung des 'soil factors' für die Lebensstrategie von *M. corlissi* (Müller et al. 2006). Unsere Ergebnisse zeigen, dass, im Gegensatz zu dem früher untersuchten Stamm von der Dominikanischen Republik (Weisse 2004), zumindest einige der österreichischen Stämme Kontakt mit Erde bzw. Erdextrakt zum optimalen Wachstum und zur erfolgreichen Encystierung/ Excystierung benötigen. Auch dieser intraspezifische Unterschied wurde als lokale Adaptation interpretiert (Müller et al. 2006). Die Konstanzener Kooperationspartnerin führte weiters im Rahmen des FWF-Projektes detaillierte Lebensbeobachtungen zur Excystierung von *M. corlissi* durch (Müller 2007).

Vorschau für 2007 und Planung für 2008

Die laufenden Arbeiten zur Hungerresistenz von *Meseres corlissi* sollen in den ersten Monaten des Jahres fortgeführt und das Gesamtprojekt Mitte 2007 beendet werden.

Aufbauend auf der erfolgreichen Zusammenarbeit innerhalb des '*Meseres*'-Projektes wurde von Prof. W. Foissner gegen Ende des Berichtszeitraumes der gemeinsame FWF-Antrag 'Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study' eingereicht. Im Bewilligungsfalle werden wir innerhalb dieses Projektes die Ökologie der Bromelien-Ciliaten bearbeiten.

Die Untersuchungen zur pH-Adaptation und pH-Toleranz sollen von Ciliaten auf weitere Planktonorganismen erweitert und durch Freilanduntersuchungen in sehr sauren (pH <3)

Tagebaurestseen in Niederösterreich (Langau) und in der Lausitz (in Ostdeutschland) ergänzt werden. Hierzu wurden im vergangenen Jahr Kooperationen mit zwei Arbeitsgruppen in Potsdam (LS Prof. Ursula Gaedke) und Leipzig (Dr. Thomas Berendonk, LS M. Schlegel) vorbereitet und ein FWF-Antrag (Weisse) im Februar 2007 eingereicht. Im Genehmigungsfall werden die Arbeiten in diesem Projekt voraussichtlich den Schwerpunkt der Untersuchungen des Jahres 2008 bilden.

1.3.6 Evolutionäre Ökologie von Rotatorien

Dr. Claus-Peter Stelzer ist seit September 2006 am Institut für Limnologie beschäftigt (zunächst als Postdoc, seit Januar 2007 als Wissenschaftler, Nachfolge G. Falkner). Das neue Arbeitsgebiet „Evolutionary Ecology“ untersucht die Evolution von sexueller und asexueller Reproduktion und nutzt planktische Rädertiere (Rotatorien) als Modellorganismen. Rotatorien sind mikroskopisch kleine, aquatische Invertebraten mit zyklisch parthenogenetischer Fortpflanzung, d.h. sie können sich sowohl sexuell als auch asexuell (ameiotisch) fortpflanzen (Abb. 16). Der Hauptmodellorganismus der Arbeitsgruppe ist *Brachionus calyciflorus*, ein Rädertier das in vielen Kleingewässern in der Umgebung des Instituts vorkommt.

Der Fokus der gegenwärtigen Arbeiten richtet sich auf folgende Aspekte:

- Die Labilität dieses zyklisch parthenogenetischen Fortpflanzungssystems, d.h. das spontane Auftreten von Genotypen bzw. Mutanten mit obligat asexueller Fortpflanzung.
- Die adaptive Signifikanz obligater Asexualität (z.B. die Abschätzung des Fitnessvorteils von obligat asexuellen vs. sexuellen Individuen).
- Die Charakterisierung der genetischen Mechanismen des Ursprungs von obligat asexueller Fortpflanzung.

Die wissenschaftliche Tätigkeit (Sept.-Dez. 2006) umfasste:

- 1) Verfassen eines FWF-Antrags, „Evolution von Asexualität bei Rotatorienpopulationen“. Der Antrag wurde Mitte Jänner 2007 beim FWF eingereicht.
- 2) Konstruktion und Etablierung eines 2-stufigen Chemostat-Systems (1.Stufe: Futteralgen; 2. Stufe: Rotatorien; Abb. 16). Dieses System erlaubt die simultane und automatische Kultivierung von 12 Rotatorienpopulationen unter gleichbleibenden Bedingungen über mehrere Monate.

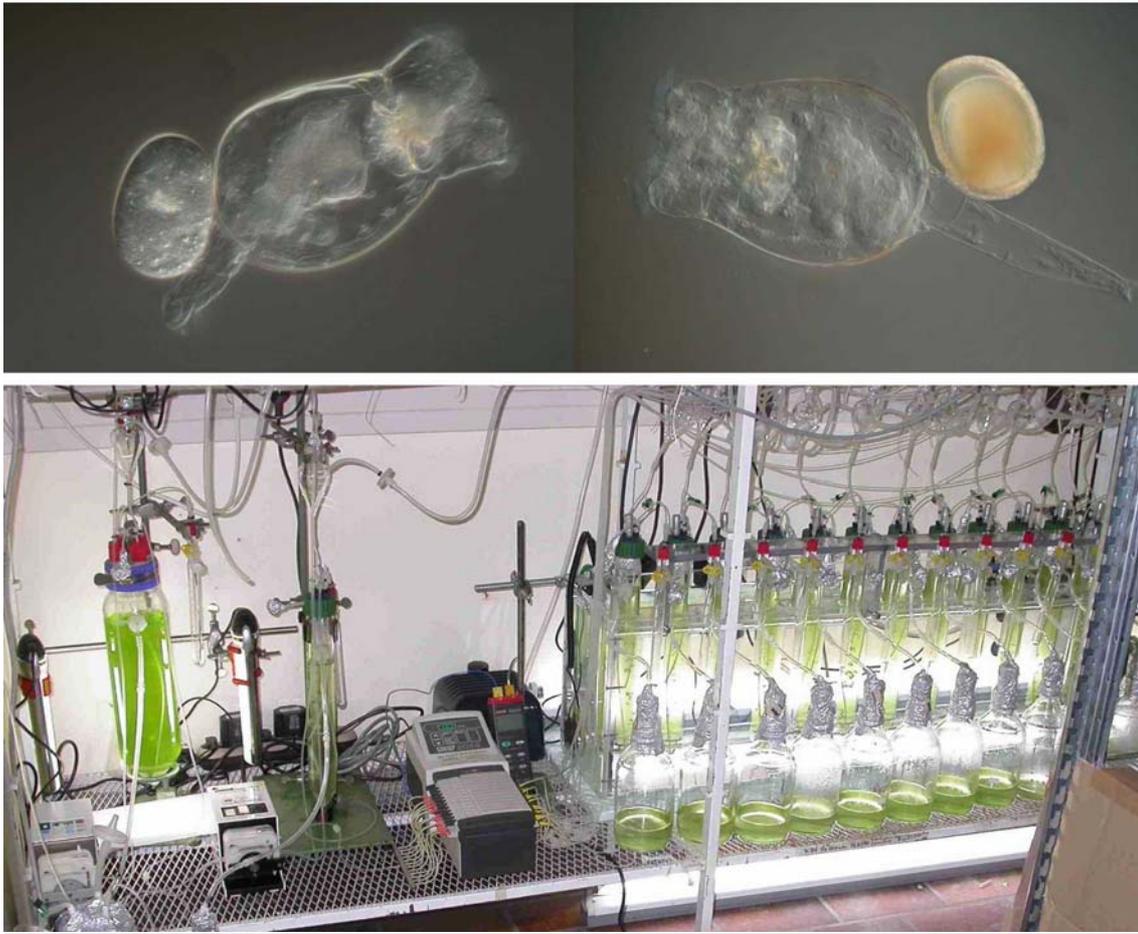


Abb. 16. Chemostat-Kultivierung des Rädertieres *Brachionus*. Asexuelles Weibchen (oben links) und sexuelles Weibchen mit Dauerei (oben rechts). Unteres Bild: Zweistufiges Chemostat-System mit einem Algenchemostat und zwölf parallel geschalteten Rotatorienchemostaten.

Vorschau für 2007 und Planung für 2008

- 1) Durchführung eines Langzeit-Selektionsexperiments im Chemostat-System.
- 2) Etablierung von Mikrosatelliten-Markern für *Brachionus calyciflorus* (in Zusammenarbeit mit Prof. Christian Schlötterer, Universität Innsbruck)
- 3) Ökophysiologische Charakterisierung von obligat asexuellen vs. sexuellen Klonen bei *Brachionus calyciflorus*. Es werden hierbei Klone verwendet, die von anderen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt wurden (Prof. N.G. Hairston, Cornell University, USA; Prof. J.J. Gilbert, Dartmouth College, USA).

1.3.7 Fischökologie

Die Aktivitäten der Arbeitsgruppe Fischökologie (**J. Wanzenböck**, mit B. Pamminer-Lahnsteiner, M. Finster, S. Mayr, K. Maier, M. Pichler, G. Lupini) waren im Jahr 2006 auf die vergleichende Erforschung der ökologischen Nischendifferenzierung und der genetischen Differenzierung der heimischen Renkenstämme (Coregonen) fokussiert. Am ersten Jänner des Jahres wurde das FWF Forschungsprojekt mit dem Titel „Conservation of natural biological resources in Austria: Identification of indigenous whitefish species and extent of potential hybridization with a Baltic species“ begonnen (FWF Projekt Nr. L229-B12, Umfang: ca. 300000 €). Die zum Teil umfangreichen Vorarbeiten zu diesem Projekt, welches in Kooperation mit Kollegen der Universität Graz (Prof. Steven Weiss und Prof. Christian Sturmbauer) bearbeitet wird, wurden fortgesetzt und intensiviert. Hervorzuheben sind die experimentellen Kreuzungsversuche, die Ende 2005 mit Coregonen aus dem Baltischen Raum und flusslaichenden Coregonen aus dem Hallstättersee durchgeführt wurden. Die dabei gewonnen Eier wurden während der gesamten Embryonalentwicklung von Dezember 2005 bis März 2006 hinsichtlich der Mortalitätsraten untersucht und die geschlüpften Larven vergleichenden Wachstumsversuchen bis in den Spätsommer 2006 unterzogen. Diese Experimente bildeten einen Hauptteil der Dissertation von Barbara Pamminer-Lahnsteiner. Dabei zeigten sich charakteristische Unterschiede im Wachstumsverlauf zwischen baltischen und alpinen Coregonenstämmen (Abb. 17), indem an baltischen Coregonen deutlich rascheres Wachstum in den ersten Lebensmonaten nachgewiesen werden konnte. Die entsprechenden Hybriden lagen in ihren Wachstumsleistungen zwischen den reinstämmigen Gruppen. Neben den experimentellen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit dem Bundesinstitut für Wasserwirtschaft – Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde auch die Coregonenstämme des Wörthersees in Kärnten, des Achensees in Tirol und der Trumer Seen sowie der Zeller See in Salzburg untersucht. Es wurden eingehende morphometrische Vermessungen durchgeführt (Abb. 18), zusammen mit der Entnahme von Gewebematerial für spätere, genetische Untersuchungen. Diese Arbeiten profitierten wesentlich durch die Verstärkung der Arbeitsgruppe durch unsere neue Mitarbeiterin (TA) Maria Pichler.

Ein zweites Projekt zur Ökologie der heimischen Renken ist das Dissertationsprojekt von Martin Finster, das durch ein ÖAW-Doc Stipendium finanziert wird. Ziel des Projektes ist die Populationsdynamik der jungen Coregonen während ihres ersten Lebensjahres, von den frühen Larvenstadien bis zu den etwa 15-20 cm langen Jungfischen im Herbst, zu untersuchen und die Ausdünnung der Fischdichten und damit die Mortalitätsraten in diesem demographisch entscheidenden Entwicklungszeitraum zu bestimmen. Für dieses Projekt musste eine neue

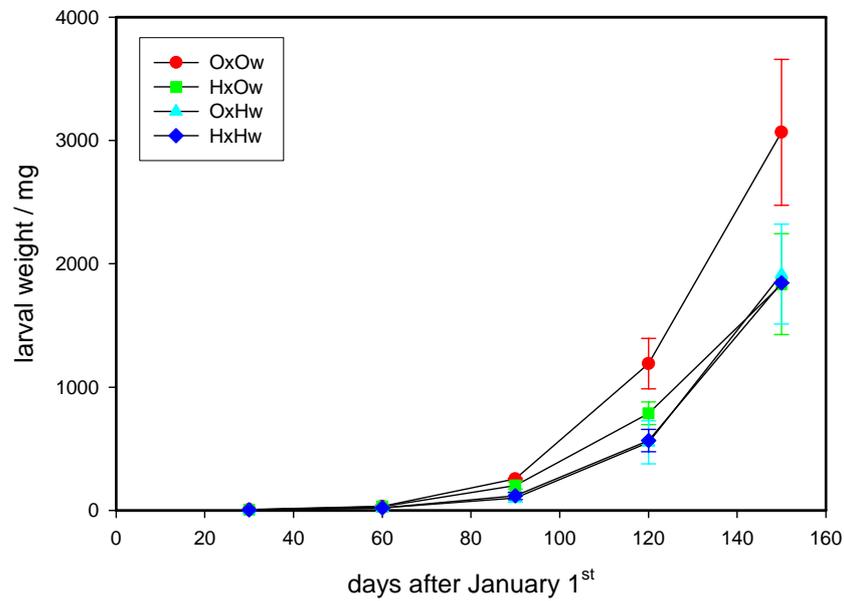


Abb. 17. Gewichtszuwachs während der ersten Lebensmonate von reinstämmigen baltischen Coregonen (rot), reinstämmigen alpinen Coregonen (blau) und deren reziproken Hybriden (grün und cyan).

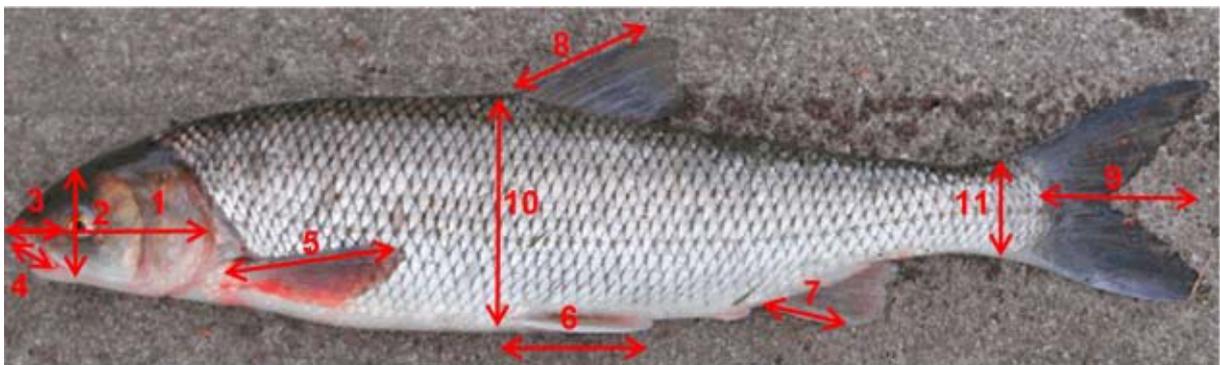


Abb. 18. Morphometrische Vermessungsstrecken an Coregonen und Perlfischen. 1 – Kopflänge, 2 – Kopfhöhe, 3 – Schnauzenlänge, 4 – Maxillenlänge, 5 – Brustflossenlänge, 6 – Bauchflossenlänge, 7 – Afterflossenlänge, 8 – Rückenflossenlänge, 9 – Schwanzflossenlänge, 10 – Körperhöhe, 11 – Schwanzstielhöhe.

Schleppnetztechnik für die Fischgrößen ab 3 cm adaptiert und getestet werden (Abb. 19).



Abb. 19. Schleppnetz an spezieller Kranvorrichtung mit Handkurbel.

Durch den kreativen Einsatz unseres Institutsmechanikers, Hannes Höllerer, und unseres Fischereimeisters Karl Maier, ist es im Verlauf des Jahres gelungen, ein Fangprogramm am Hallstättersee zu entwickeln und umzusetzen. Trotz der Komplikationen durch einen schweren Sturm, der beträchtlichen Schaden an Boot und Ausrüstung verursachte, konnte die Fangtechnik soweit verfeinert werden, dass unerwartet gute, und gleichmäßig hohe Fänge erzielt wurden, die die gestellten Anforderungen an die quantitative Beschreibung der Populationsentwicklung im Zusammenspiel mit Echolotaufzeichnungen erfüllten. Es konnte nachgewiesen werden, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz (2,19%) der im See geschlüpften Larven bis Ende August überlebt. Eine wichtige Rolle in der Quantifizierung spielt die Tiefenverteilung der Fische. So kann aufgrund der Schleppnetzfüge die Vermutung bestätigt werden, dass juvenile Coregonen erst nach dem Sommer in tiefere Wasserschichten vordringen.

Das Diplomarbeitenprojekt von Stefan Mayr zur Habitat- und Nahrungswahl des Perlfisches am Mondsee konnte im Jahr 2006 beendet werden. Die Ergebnisse wurden zum Teil schon publiziert (Mayr & Wanzenböck 2006), und die Diplomarbeit wurde im Dezember des vergangenen Jahres eingereicht. Es zeigte sich, dass die vom Perlfisch genutzte Nahrung, die hauptsächlich aus Wasserpflanzen, Schnecken und Dreikantmuscheln besteht, eine deutliche Bestätigung der Litoralbindung des Perlfisches (siehe Jahresbericht 2005) darstellt. Darüber hinaus zeigten die morphometrischen Erhebungen (siehe Abb. 18) eine unerwartet hohe Variabilität in den Gestaltmerkmalen verschiedener Altersklassen des Perlfisches bzw. auch

zwischen den Geschlechtern. Im Jänner 2007 konnte dieses Projekt mit der erfolgreichen Diplomprüfung abgeschlossen werden.

Die Kooperation mit den russischen Kollegen Anna Pasternak und Victor Mikheev erreichte im Berichtsjahr durch die Veröffentlichung früherer, experimenteller Arbeiten einen Höhepunkt (Mikheev et al. 2006). Allerdings wurde ein Fortsetzungsprojekt beim ÖAD nicht bewilligt, was in weiterer Folge eine Verschiebung gemeinsamer Arbeiten auf das Jahr 2007 erforderte.

Ein anderes Kooperationsprojekt mit polnischen Kollegen lief im Berichtsjahr aus. Die Zusammenarbeit war im wesentlichen von den gemeinsamen Bemühungen um ein EU-Projekt geprägt, was jedoch letztendlich keinen unmittelbaren Erfolg brachte.

Im September 2006 wurde die Arbeitsgruppe durch den Gastforscher Guliano Lupini aus Rom verstärkt. Er wurde über das Trainingsprogramm „Leonardo da Vinci“ der EU bis März 2007 finanziert und bearbeitet die Embryonalentwicklung von Coregonen. Einerseits werden die Kreuzungsversuche von alpinen und baltischen Stämmen wiederholt, andererseits wird ein Teilprojekt zur Erforschung von Domestikationseffekten auf Eiqualität und Embryonalsterblichkeit bei Coregonen aus dem Mondsee bearbeitet.

Im Frühjahr 2006 wurde Josef Wanzenböck seitens der Europäischen Kommission (DG Fischerei) eingeladen eine Arbeitsgruppe zur Rettung des gefährdeten, europäischen Aals zu leiten. Bei einem Arbeitstreffen im März 2006 im „Joint Research Centre“ der EU in Ispra, Italien, an dem 12 Aal – Experten aus verschiedenen europäischen Ländern teilnahmen, konnten Vorschläge zum Schutz und Erhalt des europäischen Aalbestandes erarbeitet werden (für weitergehende Informationen siehe <http://stecf.jrc.cec.eu.int/event.php?id=58>).

Vorschau für 2007 und Planung für 2008

Die weitere wissenschaftliche Tätigkeit der Arbeitsgruppe wird sich 2007 und 2008 auf die Fortführung des FWF Projektes zur ökologischen und genetischen Differenzierung der alpinen Coregonen konzentrieren. Dabei werden die aus dem Winter 2006/2007 wiederholten Kreuzungsversuche im Frühjahr/Sommer 2007 durch anschließende Wachstumsversuche ergänzt. Darüber hinaus sollen von weiteren Alpenseen (2007: Wolfgangsee, Millstättersee; 2008: Attersee) Proben der Renkenpopulationen gesammelt und morphometrisch und genetisch untersucht werden. 2008 soll dieses Projekt der mit Datenauswertung und Publikation der Ergebnisse abgeschlossen werden bzw. mit einem Neuantrag, der auf die gewonnen Erkenntnisse aufbaut, beendet werden. Die Freilandarbeiten im Rahmen der Dissertation von Martin Finster werden 2007 fortgesetzt und im Herbst abgeschlossen. Hier soll 2008 der Datenauswertung und Publikation bzw. Promotion vorbehalten bleiben. Die bewährte Kooperation mit russischen Kollegen soll 2007 wiederbelebt werden.

1.3.8 Langzeitentwicklung von Alpenseen (Forschungsbereich Paläolimnologie)

Das multidisziplinäre Projekt des Wissenschaftsfonds (FWF, P18595-B17) mit dem Thema **“Late-Pleniglacial climatic and environmental evolution“** (2006-2009, Projektleitung **R. Schmidt**,) mit Vernetzung nationaler und internationaler Institutionen umfasst die Auswertung von Diatomeen, Chrysophyceen-Dauerstadien, Sauerstoff-Isotopen ($\delta^{18}\text{O}$) an ausgewählten Ostracoden (Verknüpfung mit dem ESF-Projekt DecLakes, Leitung U. von Grafenstein sowie der Projektgruppe **D. Danielopol**, siehe Kap. 1.3.9) und Mineralogie, Tephra und Pollen in einem Sedimentkern des Längsees in Kärnten. Für diesen schon seit mehr als 50 Jahren paläolimnologisch untersuchten See existieren zahlreiche Voruntersuchungen, im besonderen zur Entwicklung der Meromixie. Für die nun quantitative und zeitlich hochauflösende Rekonstruktion von klimaabhängigen Variablen wird ein Kalibrier-Datensatz von Diatomeen und Chrysophyceen aus 45 Seen der Niederen Tauern verwendet, der derzeit im Rahmen einer projektbezogenen Dissertation (Kerstin Huber) auf Seen in den Nördlichen und Südlichen Kalkalpen ausgedehnt wird. Als Zeitfenster für die multidisziplinäre Auswertung des Sedimentkerns Längsee (LAENG) wurde aus folgenden Gründen das ausklingende Pleniglazial und Spätglazial gewählt: (i) quantitative saisonale Klimarekonstruktionen dieses Zeitraums (u.a. des Längsee - Interstadials) fehlen im Alpenraum; (ii) der rasche Wechsel unterschiedlicher Klimate ist für das Verständnis der Wechselbeziehungen Klima/Umwelt im hochalpinen Bereich der Alpen von aktuellem Interesse; (iii) aus dem multidisziplinären Ansatz werden Vergleichsparameter zu Fragen der Entwicklungsdynamik moderner Seen erwartet, die sich mit dem rapiden Gletscherrückzug aufgrund der globalen Erwärmung in den Alpen bilden oder bilden werden (siehe auch Punkt 3 der Vorschau 2007/08).

Neben der Erweiterung des Kalibrier-Datensatzes wurde im Berichtszeitraum die Datierung des Kerns LAENG mittels AMS ^{14}C (in Kiel) an terrestrischen Pflanzenresten abgeschlossen und die Extraktion und Präparation von Ostracoden-Schalen (beides durch Projekt-TA Jutta Schmidt) für die Analyse der Sauerstoffisotopen ($\delta^{18}\text{O}$) an ausgewählten Ostracoden begonnen. Gleichzeitig wurde mit der stratigraphischen Auswertung der Diatomeen im Sedimentkern LAENG sowie mit der licht- und rastermikroskopischen Identifizierung von Morphotypen der taxonomisch schwierigen Gattung *Cyclotella* begonnen (Diss. K. Huber). Ergänzend zum Längsee wurde ein weiterer Sedimentkern aus dem Jeserzer (Saisser) See, Kärnten, gezogen und mit der Aufbereitung für die verschiedenen Analysen begonnen (für beide Kerne durch TA Johann Knoll). Der Sedimentkern Jeserzersee dient als Referenz zum Längsee, im besonderen zur Validierung der klimatischen Bedingungen des Längsee-Interstadials und für den Vergleich der nach-eiszeitlichen Entwicklung von Seen und Umwelt unterschiedlicher Morphometrie und Ausgangsgesteins. Die Untersuchungen an den silikatischen Algenresten des

Jeserzer Sees werden im Rahmen eines PostDoc Stipendiums (2 Jahre) der Finnischen Akademie der Wissenschaften von Dr. Kaarina Weckström (Helsinki) durchgeführt (Beginn Jänner 2007).

Projekt des Forschungsprogramms „Alpenforschung“ der Österr. Akademie der Wissenschaften mit dem Thema **“Seasonal climate impact on alpine land-use development (CLIM-LAND)”**(Projektleitung R. Schmidt, Projektbeginn 2006, Laufzeit 2 Jahre):

Die im Forschungsfonds-Projekt (FWF, P14912-B06, „Alpine lake temperatures/ice as climate signals“, R. Schmidt & C. Kamenik) begonnene paläolimnologische Auswertung eines Sedimentkerns aus dem hochalpinen (2076 m ü.A.) Oberen Landschitzsee (ObLAN), Lungau, Salzburg, wurde mit einer Diplomarbeit (Monika Roth, „Rekonstruktion Holozäner Umweltveränderungen in einem Alpen See mittels Diatomeen und Chrysophyceen, Oberer Landschitzsee, Niedere Tauern) im Rahmen des Programms „Alpenforschung“ der ÖAW für das Zeitfenster der letzten 4000 Jahre fortgesetzt. In Hinblick auf die jüngsten Klimaveränderungen hat dieser Zeitabschnitt einen besonderen Stellenwert für das Verständnis der Interaktionen Klima/Mensch im sensitiven Bereich der Hochalpen. Aufgrund der vielfältigen Untersuchungen, die auch noch in den nächsten Jahren fortgesetzt werden, entwickelt sich der Obere Landschitzsee zusehends zu einer Schlüsselstelle der Paläolimnologie und Paläoklimatologie in den Österreichischen Alpen. In langjähriger Zusammenarbeit mit C. Kamenik (Dissertation am Institut für Limnologie Mondsee, derzeit Universität Bern) konnten zum erstenmal mit Hilfe kalibrierter silikatischer Algen für die Zeitpunkte von Frühlings- und Herstdurchmischung und der Korrelation Meereshöhe/Lufttemperatur saisonale (Frühling, Herbst) Temperatur-Anomalien für die letzten 4000 Jahre berechnet werden (Abb. 20). Aus diesem innovativen Ansatz ergaben sich weit über das Untersuchungsgebiet hinausgehende Schlussfolgerungen. Die Temperaturminima zweier markanter Klimaschwankungen stimmen mit Minima der Sauerstoffisotopen des Grönländischen Inlandeises (GRP $\delta^{18}\text{O}$) überein. Die während der zwei Jahrtausende v. Chr. signifikant miteinander korrelierten mittleren Herbst- und Frühlingstemperatur-Anomalien entkoppelten sich seit dem Mittelalter (siehe Abb. 20). Langfristig zeichnete sich ein Trend zu wärmeren Herbst ab. Als Grund dafür werden Veränderungen in den großräumigen Zirkulationsströmungen (z.B. NAO und deren mediterrane Komponente) angesehen, die wahrscheinlich zu kontinentaleren Bedingungen im Lungau führten. Die Rekonstruktion der mittleren Frühlings-Temperatur-Anomalien deutet für die Römerzeit und Teile des Frühen und Hoch-Mittelalters auf mit heute vergleichbare Warmphasen hin. Dabei ergab sich eine gute Übereinstimmung mit anderen Alpenen Klimaindikatoren (Baumringe, Baumgrenze, Gletscher). Bezüglich des menschlichen Einflusses konnten vier durch

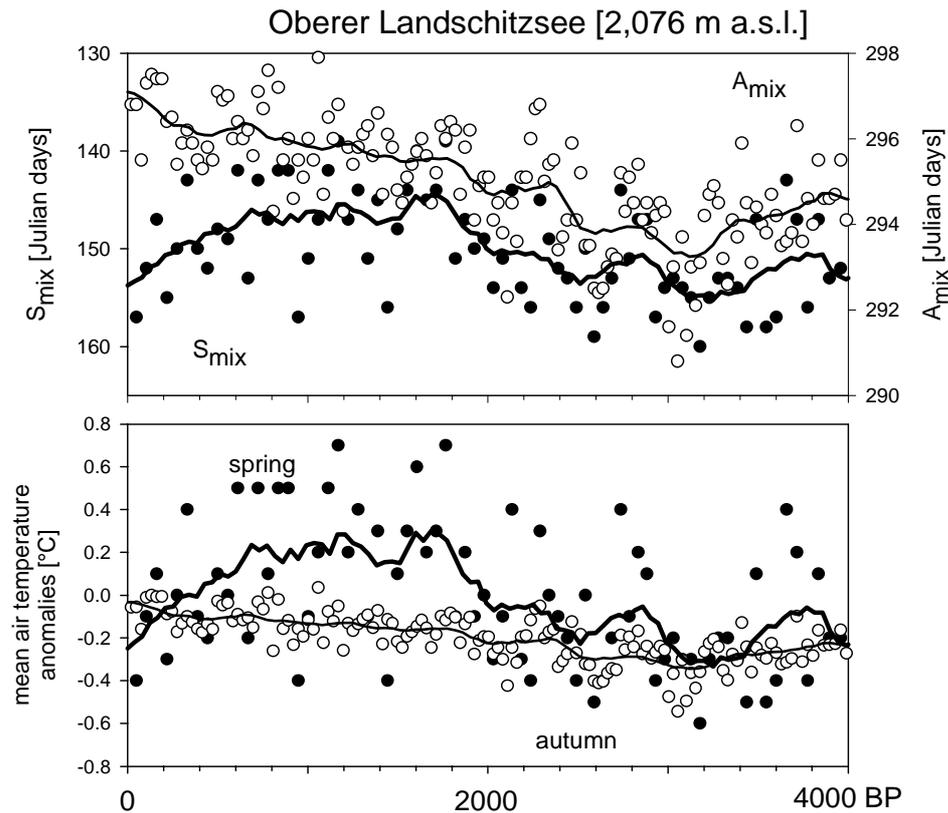


Abb. 20. Rekonstruktion des Datums der Frühlings- (S_{mix}) und Herbstdurchmischung (A_{mix}) (in Julianischen Tagen) mit Hilfe kalibrierter Chrysophyceen-Dauerstadien und Diatomeen und den daraus abgeleiteten mittleren Temperatur-Anomalien im Sedimentkern Oberer Landschitzsee für die letzten 4000 Jahre vor heute (BP) (verändert nach Schmidt et al., im Druck). Bemerkenswert aus paläoklimatologischer Sicht sind die mit heute vergleichbaren Römerzeitlichen (ca. 200 n. Chr.) und Mittelalterlichen (zwischen ca. 800 und 1500 n. Chr.) Wärmeperioden ausgedrückt durch positive Werte in der Kurve der mittleren Frühlings-Temperaturanomalien (spring, untere Grafik) und die zunehmende Entkoppelung von A und S_{mix} seit dem Mittelalter (obere Grafik) und der daraus abgeleiteten mittleren Temperaturanomalien (untere Grafik).

Kaltphasen voneinander getrennte „Wellen“ der Hochlagenennutzung festgestellt werden: Ältere Bronzezeit, Jüngere Bronze- und Hallstatt Zeit, Kelten- und Römerzeit, Früh- bis Hoch-Mittelalter.

Im Berichtszeitraum wurde innerhalb des Projektes CLIM-LAND auch mit der Analyse der Chironomiden-Reste (M. Rieradevall) sowie der Mineralogie (R. Tessadri) und Geochemie (A. Cheburkin, B. Shotyk) für die letzten 4000 Jahre von ObLAN begonnen. Mittels des in Ausarbeitung befindlichen Chironomiden Kalibrier-Datensatzes „Niedere Tauern“ können dann neben Frühling (Chrysophyceen) und Herbst (Diatomeen) auch Juli-Temperaturen rekonstruiert werden, ein in Summe neuartiger Ansatz in der Paläolimnologie/Paläoklimatologie, der bahnbrechend für das Verständnis der saisonalen Variabilität des Holozäns sein könnte.

In Bezug zur Nutzung von Chrysophyceen Dauerstadien als paläolimnologische Indikatoren wurde in CLIM-LAND auch eine Verschneidung zur rezenten Ökologie dieser Algengruppe begonnen (siehe Projektpartner und Arbeitsgruppe Jens Boenigk, Kap. 1.3.4). Für die Zuordnung von Chrysophyceen-Dauerstadien zu Arten wird auf neuentwickelte molekular-genetische Methoden (Zusammenarbeit mit C. Kamenik, Bern) zurückgegriffen. Zu Fragen der Saisonalität von Chrysophyceen in Bergseen wurden Sedimentfallen in ausgewählten Seen der Ostalpen exponiert und im 2-wöchigen Rhythmus beprobt.

Um die paläolimnologischen Ergebnisse der Landschitzseen einer breiteren Öffentlichkeit zugänglich zu machen, werden diese derzeit, neben vorangegangenen TV-Beiträgen in den Serien „Universum“ (ORF) und „nano“ (3-sat), in gekürzter und vereinfachter Form in Zusammenarbeit mit der Salzburger Landesregierung (P. Jäger) in der Reihe Gewässerschutz veröffentlicht.

Im Rahmen eines internationalen Projektes des Schweizer Nationalfonds (W. Tinner, Universität Bern) zur Klimaentwicklung im Mediterranraum wurden Voruntersuchungen über die Nutzbarkeit unseres alpinen Datensatzes in hochalpinen Seen Korsikas durchgeführt. Oberflächenproben aus dem Melosee ergaben eine mit wenigen Ausnahmen vergleichbare Diatomeenflora, sodass sich hier erfolgversprechende Perspektiven für die zukünftige Auswertung von Sedimentkernen zur quantitativen Klimarekonstruktion im nördlichen Mittelmeerraum ergeben.

Vorschau für 2007 und Planung für 2008

- Fortführung der multidisziplinären Untersuchungen an Längsee, Jeserzersee und Oberen Landschitzsee sowie der Kalibrierung silikatischer Algen österreichischer Bergseen im Rahmen der Projekte des Wissenschaftsfonds (FWF) und der Alpenforschung (CLIM-LAND).
- Vernetzung des FWF-Projektes mit dem Projekt DecLakes durch ergänzende multidisziplinäre Untersuchungen am Mondsee.
- Verknüpfung der rekonstruierten Holozänen Klima- und Umweltdaten des Oberen Landschitzsees mit meteorologischen Messdaten der letzten Jahrhunderte (Zusammenarbeit mit der ZAMG Wien) mit dem Ziel der Erstellung eines „future climate impact scenarios“.
- Einbringung von konzeptionellen und funktionellen Vorschlägen für eine mögliche Beteiligung am geplanten EU-Projekt „Climate change impacts on vulnerable mountain regions“ (Mountain Research in FP7).
- Weitere Voruntersuchungen korsischer Bergseen.

1.3.9 Grundwasserökologie und Paläoökologie der Ostracoden

Grundwasserökologie

Die moderne Grundwasserökologie (GWÖ) der letzten Jahre (die sogenannte „New Groundwater Ecology“) ist durch folgende Schwerpunkt-Forschungsthematik geprägt:

- (a) Benützung der GWÖ für Umweltschutzmaßnahmen und Umweltschutzpläne;
- (b) Untersuchung der Diversität GW-Lebensräume und ihre organismische Vielfalt. Es wird versucht, diese Informationen für Umwelt-Monitoring Programme anzuwenden.
- (c) Neue Möglichkeiten werden gesucht, GWÖ-Erkenntnisse einem breiteren Publikum zu kommunizieren. Insbesondere versucht man zu überzeugen, dass die GW-Ökosysteme und/oder die GW-Organismen für Menschen und Natur wichtige „Services and Goods“ leisten. Folgende Beiträge wurden innerhalb dieses Konzepts von der Arbeitsgruppe (**D. Danielopol**, mit K. Minati, Dissertant, M. Pichler, J. Knoblechner, G. Roidmayr, A. Danielopol und zahlreichen Gästen und weiteren ExamenskandidatInnen) im Jahr 2006 realisiert:

(1) Ein theoretisches Ökosystem-Modell mit allgemeiner Anwendung. GW-Körper in ihrer Ganzheit sind komplexe Systeme und werden metaphorisch „GW Arena“ genannt. Innerhalb dieser Mega-Strukturen hat man verschiedene Module, einige sind untereinander stark vernetzt („Ecotonal Compartments“), andere haben eine stärkere Autonomie („quasi-independent structures“), wie z.B. „Deep GW-Systems“. Theoretische und empirische Beschreibungen dieser Vision wurden in folgenden Publikationen ausführlich dokumentiert und weiter diskutiert: Danielopol et al. 2006a, 2006b, Danielopol, D.L. et al. (2007b,in press).

(2) Neue Kriterien und Maßnahmen für den Schutz der GW-Lebewesen und ihrer Lebensräume wurden vorgeschlagen und weiter diskutiert. Besonders für den Schutz seltenerer Grundwasserorganismen wurde dokumentiert, wie sinnvoll die Algorithmen sind, die in der phylogenetischen Systematik und in der Evolutions-Ökologie (der Taxonomische Diversität Algorithmus von Clarke und Warwick) verwendet werden. Folgende Publikationen (Danielopol et al. 2007a, in press, Gidó et al., in press) und ein Gastvortrag beschäftigen sich mit diesem Thema (Danielopol et al.²).

(3) Argumente für die Notwendigkeit einer verbesserten Integration der grundwasserökologischen Kenntnisse in ein europäisches „Science-policy interface channel“ wurden in Danielopol et al. (2006c) präsentiert. Relevante wissenschaftliche Informationen aus

² **Danielopol D.L.**, S. Iepure, M. Artheau, 2006. Protected subterranean areas in Europe defined by taxonomic and phylogenetic diversity criteria. – Examples of tools for scientific argumentation regarding the necessary implementation decisions (Invited Presentation to the ESF LESC/Exploratory workshop “ Effectiveness and gaps in the european legislation concerning subterranean fauna protection and the importance of setting up a european network of protected caves”, Cluj-Napoca, July 2006).

der GWÖ sollen an „Stakeholders“, „Operational managers“ und/oder „Policy-makers“ in verständlichen und brauchbaren Formaten weitergegeben werden.

(4) “Member in the organizing and scientific advisory committee” bei der Tagung HydroEco 2006 und Mitarbeit am wissenschaftlichen Programm und am “Report of Conference for UNESCO/IHP”.

(5) Mitarbeit am Antrag „Linking aquifer ecology and hydrogeochemistry for sustainable groundwater management“ für das Programm EC- COST Action (Hauptantragsteller, Dr. C. Griebler).

(6) Mitarbeit als Wissenschaftlicher Experte für OTHU (Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine, Lyon).

Paläoökologie der Ostracoden

Unsere Aktivitäten konzentrierten sich während des Jahres 2006 auf die Arbeiten in den zwei folgenden FWF Projekten:

(1) Innerhalb des FWF-ESF Projektes DecLakes, Subprojekt „Morphology and systematics of Ostracods from Mondsee and Jezioro Hańcza (Polen), (Zusammenarbeit mit G. Roidmayr, Dr. T. Namiotko und Mag. M. Pichler), haben wir eine „Multiscale analysis in red (100-1000 Jahre Scala) und blue (10-100 Jahre Scala) spectra“ durchgeführt. Auf der „Red Scala“ haben wir festgestellt, dass während der Spät-Glazial kalt-klimatischen Periode nordeuropäische arktische (psychrophile) Arten ihre geographische Verbreitung nach Süden verschoben haben, z.B. *Fabaeformiscandona rectangulata*. Zwei Poster wurden beim General Assembly der EGU (European Geosciences Union) in Wien (April 2006) und der Ö-SIL in Innsbruck, (Okt. 2006) vorgestellt⁴. Auf der „Blue Scala“ haben wir festgestellt, dass für eine Art, *Candona neglecta*, die Disparität der Schalen im Profundal des Mondsees während der letzten 100 Jahre höher ist, als in der Gegenwart. Es gibt auch leichte morphologische Unterschiede in der Klappengestalt zwischen den Mondsee- und Jezioro Hańcza -Populationen. Die Ursache für diese geringen, morphologischen Unterschiede wird weiter untersucht. Die „Parsimony“ - Hypothese wäre eine Abspaltung des genetischen Pools durch die geographische Trennung und ökologische Isolation der zwei Ostracoda Populationen.

³ **Danielopol, D.L.**, I. Tabacaru. The Heritage of Emil G. Racovitza SIBIOS (International Society for Subterranean Biology), Vortrag

⁴ Namiotko T., **D.L. Danielopol**, A. Baltanas, U. von Grafenstein, A. Brauer 2006. Late-Glacial and Holocene ostracod sequences from lacustrine sediments of Lake Mondsee (Austria), Geophysical Res. Abstracts, 8, 06076.

Namiotko T., M. Pichler, **D.L. Danielopol**, **G. Roidmayr** 2006. Eine arktische Ostracodenart (Crustacea, Ostracoda) im Spät Glacial und frühen Holozän Sediment des Mondsees. Abstracts, SIL-Austria Treffen Innsbruck 22-23.10.2006 (Poster)

(2) Innerhalb des Projektes „Comparative morphology and taxonomical relationships between living subterranean and fossil “Paratethyan“ Ostracoda (Crustacea) from Central and Eastern Europe: an approach to use ostracods as diagnostic tools for evaluation of environmental changes in Lake Pannon during the Upper Miocene” waren folgende Personen beteiligt:

(a) K. Minati hat mit J. Knoblechner und Kollegen aus Österreich, Slowakei und Portugal die Mikroevolution einer fossilen Art, *Vestalenula cylindrica*, im Rahmen seiner Dissertation bearbeitet (Minati et al. 2007, in press). Mit morphometrischen Methoden und Multivariat-Statistik ist es möglich, West- und Zentral-Europäische Populationen von *Vestalenula cylindrica* zu unterscheiden.

(b) K. Minati hat die Beprobungsmethode für harte Sedimente mit dem sog. „Piller Corer“ weiter entwickelt und Bohrkerne aus Hennersdorf und Mataschen ausgewertet.

(c) R. Buttinger hat die Ostracodendaten aus St. Margarethen weiter ausgewertet. Ein Poster mit den paläoökologischen Interpretationen wurde bei der SIL-Austria - Tagung in Innsbruck präsentiert und zum Abschluss der Tagung mit dem ersten Preis ausgezeichnet⁵.

(d) D. Danielopol hat die Größe der morphologischen Divergenz zwischen Populationen von *Cyprideis macrostigma*, die unter verschiedenen ökologischen Bedingungen im Pannonsee während des oberen Miozäns im Wiener Becken (Hennersdorf, NÖ) lebten, untersucht. Diese Daten wurden mit Hilfe zweier Algorithmen erarbeitet: mit 1) dem Gingerich „Evolutionary rates algorithm“ (eine parametrische Statistik Methode) und 2) dem Clarke-Warwick „ANOSIM“ algorithm (dabei kommt nicht parametrische Statistik zur Anwendung). Mit diesen beiden Methoden konnte man feststellen, dass während hypoxischer Perioden die Muschelkrebse viel kleiner waren als nach der hypoxischen Periode. Nach dem Verschwinden dieser ursprünglichen Population besiedelte ein neuer Stamm mit leicht veränderten morphologischen Merkmalen diesen Bereich wieder.

(e) W. Neubauer hat seine Diplomarbeit „Measuring the difference of approximating B-splines curves with application to Ostracoda valve-outlines“ beendet. Eine neue geometrische Berechnung der Gestaltungsunterschiede zweier Ostracoden-Klappen wurde entwickelt („The area deviation algorithm“) und weiter in das „Morphomatica“ Programm Version 1.6 implementiert. Eine Publikation ist entstanden (siehe Minati et al. 2007) und eine weitere ist kurz vor ihrer Fertigstellung (Iepure et al., in prep.).

(f) Anfang September 2006 haben wir im Rahmen des wissenschaftlichen Austauschprogrammes zwischen der ÖAW und der Rumänischen Akademie der Wissenschaften, eine paläontologische Expedition nach Banat (Südwest Rumänien) durchgeführt. Gemeinsam mit

⁵ Buttinger R., D.L. Danielopol, M. Harzhauser, M. Zuschin 2006. Small scale shifts in agitated palaeoenvironments of Lake Pannon based on ostracod assemblages. Abstracts, SIL-Austria Treffen Innsbruck 22-23.10.2006.

Kollegen der Universitäten Graz und Wien, des Naturhistorischen Museums Wien und des Landesmuseums Graz wurde Ostracodenmaterial von einer klassischen paläontologischen Fundstelle (Soceni) gesammelt und in Mondsee weiter bearbeitet.

Vorschau für 2007 und Planung für 2008

Fortlaufende Arbeiten der FWF und ESF-Projekte.

Expertisen für den ESF in Straßburg und für EC-General Directorate in Brüssel.

1.3.10 Forschungsbereich Fließgewässerökologie

Die Arbeiten von Frau Dr. **M. Leichtfried** (mit A. Wiedroither, ExamenskandidatInnen und Gästen) konzentrierten sich im Jahre 2006 auf folgende Bereiche:

- a) Aktivitäten im Rahmen des IRESA Projects (Initiative in River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application), einem Kooperationsprojekt von Österreich (Institut für Limnologie, Mondsee und Institut für Ökologie der Universität Innsbruck) und Sri Lanka (Institute for Zoology der University of Kelaniya), insbesondere
 - Weitere ökologische Untersuchungen an zwei Fließgewässern in Sri Lanka: Yan Oya, ein saisonaler Zufluss des Hurulu-Wewa Reservoirs in der „dry zone“ von Sri Lanka und Eswathu Oya, ein perennierender Zufluss der Kelani Ganga in der bergigen „wet zone“ von Sri Lanka.
 - Longitudinale Probennahme und Datenaufnahme von physikalischen, chemischen und biologischen Parametern an den Bächen in Sri Lanka.
 - Darauf folgende Proben- und Datenanalyse in Österreich, internationale und nationale Präsentationen.
- b) Arbeiten im Rahmen der Zusammenarbeit mit der TU Berlin, Institut für Umweltmikrobiologie, zur Diversität der aquatischen Hyphomyzeten in Fließgewässern der tropischen und temperierten Zone.
- c) Aktivitäten in der „Internationalen Arbeitsgemeinschaft Donauforschung“: Mitorganisation der Jubiläumstagung in Klosterneuburg / Wien, Landesvertreterarbeit.
- d) Editor- und Reviewertätigkeit für mehrere internationale Fachzeitschriften.

Vorschau für 2007 und Planung für 2008

- a) Abschlussaktivitäten im Rahmen des Projektes „IRESA – Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application“ in Sri Lanka und Österreich; Datenauswertung, Publikation, Organisation von Workshops und Roundtables in Zusammenarbeit mit der Universität Innsbruck und University of Kelaniya, Sri Lanka und anderes.
- b) Antragsausarbeitung für ein Nachfolgeprojekt und, wenn erfolgreich, weitere Projektarbeit. Einige Organisationen zeigen sich interessiert, diese Forschungsrichtung zu fördern: UNIDO (United Nations Industrial Development Organisation) in Wien, KEF (Kommission für Entwicklungsfragen) an der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, UNESCO in Paris.
- c) Verstärkt Arbeiten zur Kenntnis der aquatischen Hyphomyzeten und ihrer Rolle in den Biofilmen der Fließgewässerökosysteme in Zusammenarbeit mit der TU Berlin.

- d) Tätigkeit im EU-Project: Network of Excellence on „A Long-term Biodiversity, Ecosystem and Awareness Research Network” (ALTER – NET Region Eisenwurzen).
- e) Tätigkeit als Landesvertreterin für Österreich in der SIL (International Association of Theoretical and Applied Limnology) und in der IAD (Internationale Arbeitsgemeinschaft Donauforschung“).

Das in den vorausgegangenen Jahresberichten 2004 und 2005 beschriebene FWF-Projekt 15597-B03 “Fractal geometry and scaling in benthic ecosystems” (U. **Humpesch**, in Zusammenarbeit mit Dr. Jenny Schmid - Araya, Dr. Peter E. Schmid & Dr. Christian Fesl) wurde im Berichtszeitraum fortgeführt.

1.3.11 Internationaler Postgraduierten-Lehrgang Limnologie (IPGL-Kurs)

Insgesamt wurden 28 WasserexpertInnen von IPGL betreut und die entsprechenden akademischen Aus/Weiterbildungsprogramme von IPGL organisiert und durchgeführt (Masterprogramm 10 TeilnehmerInnen, IPGL short-courses 18 TeilnehmerInnen). Die WasserexpertInnen kamen aus 10 verschiedenen Ländern (Äthiopien, Kenia, Kolumbien, Korea, Uganda, Spanien, Sri Lanka, Sudan, Tanzania, Zambia). 23 Personen wurden durch Mittel der ADA (Austrian Development Agency) und 5 TeilnehmerInnen aus anderen Quellen finanziert (EU, DANIDA, Arbeitgeber).



Abb. 21. IPGL-Kursmodul „Tropical Limnology“ in Kenia.

Anlässlich des 30-jährigen Bestehens von IPGL wurde vom 4. bis 8. Dezember der Workshop "Bridging Research, Technology and Development - Sustainable Water Resource Management in Eastern Africa" in Mombasa, Kenia, veranstaltet (

Abb. 22). Der Workshop verfolgte einen transdisziplinären Ansatz und die 130 TeilnehmerInnen setzten sich aus WissenschaftlerInnen, KommunalvertreterInnen, NGO's und politischen EntscheidungsträgerInnen zusammen. Im Mittelpunkt des Workshops stand die Standortbestimmung und Zukunft von Wissenschaft und Forschung im östlichen Afrika und die Entwicklung von Perspektiven zur Optimierung der Forschungsbeiträge in Richtung nachhaltiger Entwicklung am Beispiel Wasserressourcen und Ökosystemleistungen. Im Rahmen des

Workshops wurden zunehmende Diskrepanzen zwischen Nutzungsansprüchen und Quantität/Qualität von Wasserressourcen aufgezeigt und das Verhältnis zwischen Öffentlichkeit, ForscherInnen und EntscheidungsträgerInnen analysiert. Empfohlen wurde eine bessere Integration der Wissenschaft in die Gesellschaft, sowie der Gesellschaft in die Wissenschaft um eine dynamischere Interaktion von Wissenschaft, Politik und Gesellschaft zu erzielen. Grundvoraussetzung ist dabei ein „echter Dialog“ sowie ein wechselseitiger Lernprozess, der sowohl bei der Wissenschaft, als auch bei der Gesellschaft ansetzt. Eine strukturierte Vernetzung aller Interessensgruppen wurde im Rahmen des Workshops begonnen und soll 2007 weitergeführt werden. Als weitere wichtige Maßnahmen zur nachhaltigen Entwicklung in Ostafrika wurden genannt: Die Entwicklung von öffentlich-privaten Partnerschaften im Bereich Forschung/Technologieentwicklung, die Implementierung von Qualitätssicherungsmaßnahmen im Wissenschafts- und Ausbildungsbereich, die partnerschaftliche Ausarbeitung von politischen Leitlinien, sowie die stärkere Mobilisierung von lokalen finanziellen Ressourcen für Forschung und Entwicklung.



Abb. 22. Workshop Bridging Research, Technology and Development in Mombasa, Kenia

Im Oktober 2006 begann das, für eine Laufzeit von 3 Jahren genehmigte, EU-Projekt BOMOSA (Abb. 23). Das Projekt basiert auf der langjährigen Zusammenarbeit mit der Universität für Bodenkultur Wien, Sagana Fisch Farm und Moi Universität. Wesentliche Projektvorarbeiten wurden im Rahmen von IPGL-Diplomarbeiten durchgeführt. ILIMNO/IPGL übernimmt dabei die Leitung eines Arbeitspaketes und ist in zwei weitere Arbeitspakete maßgeblich involviert. Ziel der Projektaktivitäten ist die Lebensqualitätsverbesserung der ländlichen Bevölkerung im östlichen Afrika hinsichtlich der Nahrungsversorgung mit hochqualitativem Protein und der Schaffung von zusätzlichen Einkommensquellen. Es soll ein hinsichtlich Nachhaltigkeit

optimiertes Aquakultursystem etabliert werden, das den ganzen Produktionszyklus umfasst, Synergieeffekte zwischen Landwirtschaft und Aquakultur maximiert und negative Umweltauswirkungen minimiert. Speziell designte Netzgehege sollen bis dato fischereilich ungenutzte Gewässer für die extensive Fischzucht erschließen und Abfallprodukte aus der lokalen Landwirtschaft sollen für die Produktion von Fischfutter genützt werden. Die Projektaktivitäten werden in unmittelbarer Zusammenarbeit mit der lokalen Bevölkerung geplant und ausgeführt um eine nachhaltige Abdeckung der jeweiligen sozio-ökonomischen Bedürfnisse zu erreichen. Die Bildung von aquakulturellen Netzwerken soll die Lücke zwischen subsidiärer und industrieller Fischzucht schließen und auch die lobbyistische Einflussnahme auf sozio-ökonomische und politische Rahmenbedingungen verbessern. Die Umweltverträglichkeit wird durch die Abschätzung der ökologischen Tragfähigkeit der jeweiligen Gewässer, optimales Fischfuttermanagement und der weitgehenden Verwendung von lokalen Ressourcen gewährleistet. Untersucht wird das sozio-ökonomische Potential des BOMOSA-Fischzuchtsystems für die gesamte ostafrikanische Region durch satellitengestützte Gewässercharakterisierungen, intensive ökonomische Studien und Einbeziehung der politischen Entscheidungsträger.



Abb. 23. EU-Projekt BOMOSA

Wissenschaftliche Arbeiten und Projekteinreichung

Die Ergebnisse aus drei IPGL Diplomarbeiten wurden in internationalen Fachjournalen publiziert.

Folgende zwei Projektanträge wurden 2006 eingereicht und genehmigt:

- Projektantrag an Austrian Development Agency (ADA): Mombasa Workshop – Bridging Research, Technology & Development (Projektleitung Mag. G. Winkler). Projektlaufzeit 01.08.2006 – 31.12.2007, Projektnummer EZA 612-00/2006, Projektsomme € 80.000,-- .

- EU-Projekt, FP-6, INCO-Dev, STREP: Integrating BOMOSA cage fish farming system in reservoirs, ponds and temporary water bodies in Eastern Africa (Projektleitung Prof. H. Waidbacher, Universität für Bodenkultur, Institut für Hydrobiologie und Gewässermanagement). Projektaufzeit 01.10.2006 - 30.09.2009, Projektnummer 032103; Projektsumme € 1.499.998,--.

Vorschau für 2007 bis 2009

- Durchführung der IPGL-Programme mit 80 TeilnehmerInnen.
- Durchführung von 15 IPGL-Diplomarbeiten.
- Produktion der Mombasa-Workshopproceedings.
- Ausbau der „East African –Water Association (EAWA)“.
- Durchführung des EU-Projektes BOMOSA (2006-2008).
- Aufbau von weiteren Kursmodulen in Ostafrika.
- Akademische Akkreditierung der IPGL-Programme in Österreich und Ostafrika.
- Weitere Projekteinreichungen (EU, AWF, UNDP/GEF).

1. 4 Übereinstimmung/Abweichung zum Mittelfristigen Forschungsprogramm 2006-2010

1. Hauptzielrichtung des Forschungsprogramms des Instituts für Limnologie

Die Untersuchung der *“Ökophysiologie und Evolutionsökologie aquatischer Organismen und Lebensgemeinschaften“* soll weiterhin die Hauptzielrichtung des Instituts für Limnologie bleiben, wobei es im neuen Mittelfristigen Forschungsprogramm (MFFP) jedoch zu deutlichen inhaltlichen und strukturellen Änderungen kommen soll. Aufbauend auf dem Schwerpunktthema des MFFP 2001-2005 und unter Berücksichtigung der strukturellen Veränderungen infolge des Institutsausbaus und der Nachbesetzung von 4 Wissenschaftlerstellen in den kommenden 3 Jahren streben wir eine Modifizierung des bisherigen Forschungsprogramms im MFFP 2006-2010 an. Im bisherigen Schwerpunktthema, der Untersuchung der *“Entstehung und Erhaltung der Diversität und Komplexität auf der Ebene des Individuums, der Population, der Art und des Ökosystems“*, wurden vor allem zwei wesentliche neue Themenkreise erschlossen: (1) innerhalb der mikrobiellen Ökologie wurde anhand mehrerer Organismengruppen eine bisher unbekannte ausgeprägte intraspezifische Diversität nachgewiesen; (2) die Klima-bezogenen Untersuchungen innerhalb der Algenökologie und der Päläolimnologie belegten die große Bedeutung des Einzugsgebietes sowie die Fernwirkung großklimatischer Ereignisse auf die Seenökosysteme. Im MFFP 2006-2010 wird eine Synthese dieser beiden Themenkreise angestrebt, die eine Ergänzung der limnologischen Forschungsarbeit durch komplementäre terrestrische und evolutionstheoretische Untersuchungen und im Hinblick auf eine zukunftsweisende Ausrichtung des Instituts unter dem veränderten gesellschaftlichen

Anmerkungen/Begründungen bei Änderung des MFP gegenüber der im April 2005 formulierten Fassung

Die erste Nachbesetzung (G. Falkner) erfolgte im Herbst 2006 (C.-P. Stelzer)

Kontext, der eine deutlichere Wahrnehmung und unmittelbarere Anwendung der Erkenntnisse der Grundlagenforschung erfordert, erscheint eine Namensänderung in "Institut für Aquatische und Evolutionäre Ökologie" sinnvoll. Ein weiteres Ziel der Namensänderung ist die Signalwirkung im Hinblick auf die Erschließung eines neuen, interdisziplinären Themenbereichs.

2. Prioritätenkatalog

Anstelle des bisherigen tritt das modifizierte Schwerpunktthema *"Ausmaß, Entstehung und ökologische Bedeutung der intraspezifischen Diversität aquatischer Mikro- und Makroorganismen"*, das von allen Arbeitsrichtungen mit höchster Priorität bearbeitet werden soll. Stärker als bisher sollen hierbei grundsätzliche Unterschiede zwischen pro- und eukaryontischen Organismen untersucht werden. Die Genomforschung der letzten Jahre zeigte, dass Mikroorganismen einer Art sich häufig enorm in ihrer genetischen Ausstattung unterscheiden, während intraspezifische genetische Unterschiede bei höheren Organismen (z. B. bei Wirbeltieren) vergleichsweise gering ausfallen, obwohl auch bei letzteren spezifische Anpassungen an das Habitat ("Ökotypen") bekannt sind. Diese offenbar grundsätzlichen Unterschiede in der intraspezifischen genetischen Diversität zwischen Mikro- und Makroorganismen haben in der ökologischen Forschung bisher wenig Beachtung gefunden. Die ökologische Bedeutung der intraspezifischen genetischen Diversität ("microdiversity") soll in unserem Hause an aquatischen Makroorganismen (z. B. den Coregonen in der Fischökologie) und Mikroorganismen (heterotrophe Bakterien, photoautotrophe Cyanobakterien, Pilze und Protisten) unter Verwendung neuester molekulargenetischer Methoden und unter Einbeziehung

Das neue Arbeitsgebiet Evolutionäre Ökologie von Rotatorien verstärkt diesen Wunsch

s. hierzu das inzwischen begonnene FWF-Projekt

des terrestrischen Umfeldes untersucht werden. Letzteres ist vor allem für die frei lebenden Mikroorganismen wichtig, für die gegenwärtig eine prinzipiell globale und ubiquitäre Verbreitung angenommen wird. Die zentrale Herausforderung eines solchen Forschungsprogramms ist die Verknüpfung der charakterisierten intraspezifischen genetischen Diversität mit ökologischen Aspekten, wie sie im MFFP 2001-2005 bezüglich der Frage der Biogeographie von Mikroorganismen innerhalb der mikrobiellen Ökologie bereits erforscht wird. Besitzen Arten mit einer größeren genetischen Diversität ein größeres ökologisches Potenzial, d. h. größere ökologische Reaktionsnormen gegenüber den jeweils wichtigen Umweltparametern, oder wird die ökologische Amplitude nur durch einige wenige Schlüsselgene und nicht über eine Genom-weite genetische Variabilität bestimmt? Bei der Beantwortung dieser zentralen Fragen müssen die unterschiedlichen Zeitskalen von kurzfristigen, reversiblen Akklimatisierungen bis hin zu genetisch fixierten evolutiven Adaptationen der Organismen berücksichtigt werden. Die Paläo(limno)logie bietet hierbei die Möglichkeit, langfristige Veränderungen zu analysieren, die der experimentellen evolutionsökologischen Forschung an rezenten Organismen nicht zugänglich sind.

Das skizzierte Forschungsprogramm ist international themenführend innerhalb der aquatischen Ökologie und verknüpft zudem die Limnologie mit der terrestrischen Ökologie und der theoretischen Evolutionsökologie. Das neue Forschungsprogramm wird dadurch dem bereits im MFFP 2001-2005 formuliertem Anspruch gerecht, die Limnologie als Teilgebiet der Ökologie zu begreifen und Impulse für das übergeordnete Fachgebiet zu geben. Aquatische Organismen und Ökosysteme sollen weiterhin als relativ leicht zugängliche Objekte genutzt werden, um allgemeine ökologische und evolutionsbiologische Frage-

s. hierzu die FWF-Projekte zur Diversität der Bakterien, Chryomonaden und Ciliaten

s. hierzu die laufenden Genom-Projekte zu *Polynucleobacter* und *Planktothrix*

s. die beiden laufenden paläolimnologischen FP

stellungen zu bearbeiten. Obwohl die Forschungsthemen primär der Grundlagenforschung zuzurechnen sind, sind die Übergänge zur Angewandten Limnologie fließend. Dies trifft z. B. auf die Untersuchung der Toxinproduktion bei Cyanobakterien sowie der Ökologie der Grundwasserorganismen zu. Die Grundwasservorräte werden für die Wasserversorgung des Menschen im 21. Jahrhundert zunehmend wichtiger, und die (Mikro-) Organismen bewirken die Stoffumsetzungen einschließlich der Detoxifikation schädlicher Xenobiotika. Dennoch sind die genetische Diversität und die physiologischen Leistungen der (Mikro-)Organismen des Grundwassers nahezu unbekannt. Die Wechselwirkung zwischen Grundlagenforschung und Angewandter Limnologie wird auch bei der Beurteilung der ökologischen Funktionsfähigkeit der Gewässer, die in der EU-Wasserrahmenrichtlinie verbindlich vorgeschrieben ist, deutlich. Das Institut ist gewillt, sich als zweite Priorität die notwendige umfassende Fachkompetenz zu erhalten, um weiterhin beratend für Bundes- und Länderbehörden tätig sein zu können.

In dritter Priorität wird das Institut in der Lehre tätig sein. Der Internationale Postgraduiertenlehrgang Limnologie (IPGL) verkörpert die Schnittstelle zwischen Forschung und Lehre im besonderen Maße. Der IPGL-Kurs genießt national und international als vorbildliches Projekt im Rahmen des Wissenstransfers von den entwickelten in die afrikanischen und asiatischen (China) Schwellenländer einen hervorragenden Ruf. Mehrere aktuelle und zukünftige Forschungsprojekte des Instituts in tropischen und subtropischen Ländern sind aus der fortgesetzten Zusammenarbeit mit ehemaligen IPGL-Kursabsolventen entstanden. Die habilitierten Wissenschaftler(innen) werden weiters an den Universitäten Salzburg, Wien und Innsbruck lehren. Dabei wird jedoch, stärker als an den Universitäten zumeist üblich, die unmittelbare Einbindung der Examenskandidat(inn)en in die Forschungstätigkeit des Instituts angestrebt.

dazu mehrere Projekte der Algenökologie und Fischökologie

das IPGL-Programm wurde 2005/2006 kontinuierlich ergänzt und um mehrere Module erweitert

s. Publikationsliste

3. Änderungen in den Prioritäten im Vergleich zum bisherigen Forschungsprogramm

Die in den ersten beiden Abschnitten ausgeführten Änderungen der Prioritäten ergeben sich aus den neu gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnissen (Modifizierung des Schwerpunktthemas) im Rahmen des veränderten gesellschaftlichen Umfeldes, dem bevorstehenden Ausscheiden mehrerer langjähriger wissenschaftlicher Mitarbeiter (Falkner, Dokulil, Danielopol, Humpesch) sowie der damit verbundenen Möglichkeit, nach erfolgtem Ausbau des Institutsgebäudes neuen Mitarbeitern ein attraktives Forschungsumfeld bieten zu können. Die Gebäudeadaptierungen und die Nachbesetzungen der Wissenschaftlerstellen sollen auf den Schwerpunkt hinzielen und das bisherige Tätigkeitsfeld des Instituts inhaltlich im Hinblick auf eine allgemeinere ökologische und evolutionsbiologische Ausrichtung erweitern. Hiervon werden die Einbringung neuer Ideen und Synergieeffekte mit dem bisherigen Themenbereich erwartet.

4. Kooperationsfähigkeit

Schon im MFFP 2001-2005 waren zahlreiche unserer Drittmittel-finanzierten Forschungsprojekte inter- und transdisziplinär. Dies ist eine grundsätzliche Anforderung an die EU-Projekte, trifft jedoch auch auf die meisten anwendungsorientierten limnologischen Projekte zu. Untersuchungen, die sich mit der Gewässerqualität i. w. S. beschäftigen, müssen stets physikalische, hydrologische, chemische und biologische Aspekte ebenso wie die Frage der unterschiedlichen Nutzungsansprüche (Gewässerqualität wofür?) berücksichtigen. Die Beurteilung der ökologischen Funktionsfähigkeit von Gewässern, ein zentrales Anliegen der EU-Wasserrahmenrichtlinie, erfordert unmittelbar einen interdisziplinären und trans-

Falkner und Humpesch beendeten Ende 2006 ihre Mitarbeit, Danielopol wird Ende 2007 pensioniert

disziplinären Forschungsansatz. Das Institut hat im Jahr 2004 einen Kooperationsvertrag im Rahmen des sog. Projektes "Water-Tec-Net" unterzeichnet, in dem sich mehrere Betriebe, regionale Entwicklungsvereine und Forschungsinstitute in Oberösterreich zu einer zwischenbetrieblichen Kooperation in Form eines Netzwerkes zusammengeschlossen haben. Die Projektleitung obliegt dem Technologiezentrum Attnang-Puchheim, die heuer auch das Symposium "Innovatives Wassermanagement 2005 im Salzkammergut" unter Beteiligung des Instituts für Limnologie veranstalten wird.

Im Rahmen des IPGL-Kurses wurden in den letzten Jahren Kooperationsvereinbarungen mit niederländischen und tschechischen Partnerinstitutionen getroffen, die eine fachübergreifende Ausbildung der Kursabsolventen zum M.Sc. gewährleisten. Die Aktivitäten des IPGL-Kurses sind eingebettet in zahlreiche internationale Kooperationen, z. B. in Form der "East African - Austria Water Association" (EAAWA) oder im Rahmen der Global Environment Facility. Auf die bilateralen Folgeprojekte in tropischen Ländern, die sich aus IPGL-Kontakten entwickelt haben, wurde bereits oben (Punkt 2) hingewiesen. Alle diese Aktivitäten mit unmittelbarem sozio-ökonomischen Bezug sollen im MFFP 2006-2010 fortgesetzt werden.

Derzeit wird die Einreichung eines Nationalen Forschungsnetzwerkes (NFN) beim FWF zum Themenbereich aquatische Protozoologie unter der Koordination unseres Hauses vorbereitet, das im Genehmigungsfall einen interdisziplinären Schwerpunkt der Forschungsaktivitäten des Institutes im MFFP 2006-2010 bilden wird. Die angestrebte mittelfristige inhaltliche Erweiterung der Forschungstätigkeiten (s. o.) verfolgt das Ziel, die limnologische Forschung stärker als bisher mit den Nachbardisziplinen (terrestrische, chemische und theoretische Ökologie, Geowissenschaften, Umwelttoxikologie) zu verknüpfen.

s. internationaler Workshop
in Mombasa im Dezember
2006

Die Koordination der
österreichweiten Aktivitäten
erwies sich schwieriger als
erwartet, wird jedoch
fortgesetzt

Im Jahresbericht 2004 finden sich nähere Angaben zu den >100 aktuellen nationalen und internationalen Kooperationspartnern des Instituts aus zahlreichen Nachbardisziplinen

(<http://www.oeaw.ac.at/limno/research.htm>).

5. Neue Kooperationen

Mit der inhaltlichen Erweiterung werden neue Kooperationsmöglichkeiten, sowohl in der Grundlagenforschung als auch im anwendungsorientierten Forschungsbereich, verbunden sein. Erste Kooperationen mit biomedizinischen und pharmazeutisch-technischen Unternehmen bezüglich der möglichen Nutzung bioaktiver Naturstoffe wurden bereits im laufenden MFFP 2001-2005 begonnen. Die im zukünftigen Forschungsprogramm geplanten Arbeiten werden mit einer Hinwendung zu den jungen Forschungsgebieten der Chemischen Ökologie und der Ökotoxikologie verbunden sein und zu neuen, interdisziplinären Kooperationen führen. Das neue Instrument des Translational-Research-Programm des FWF soll vor allem an der Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und angewandter Forschung genutzt werden. Konkrete Anwendungsziele sollen z. B. in der Fischökologie und Aquakultur gesetzt werden, die zu Kooperationen mit erwerbsorientierten Finanzierungspartnern führen werden. Ähnliches gilt für den Bereich der Abwasserbehandlung, bei dem die bestehenden Kontakte zu Unternehmen ggf. intensiviert werden sollen.

Bezüglich theoretischer Aspekte zur Artbildung und zu den Lebensstrategien der Organismen soll eine Zusammenarbeit mit dem Institute for Applied Systems Analysis (IIASA) in Laxenburg begonnen werden. Hinsichtlich evolutionsökologischer Fragen, die das Verhalten von Organismen betreffen, und der Eignung und

gilt unverändert in der jeweils aktualisierten Form

neue Partnerschaften wurden 2005 und 2006 abgeschlossen

Anwendung molekulargenetischer Methoden für ökologische Fragestellungen wird eine engere Kooperation mit dem Konrad Lorenz Institut für Vergleichende Verhaltensforschung und dem Gregor-Mendel-Institut für Molekulare Pflanzenbiologie der ÖAW in Form gemeinsamer Forschungsprojekte, Austausch von Examenskandidat(inn)en, Seminaren etc. angestrebt.

6. Abgabe gemeinsam betreuter Forschungsprojekte

Die von der Stadt Wien finanzierten Projekte im Donauraum werden mit der Pensionierung der beteiligten Wissenschaftler beendet werden.

7. Abschluss aktueller Forschungsprojekte

Die derzeitigen Projekte in den Fachbereichen Theoretische Algenphysiologie (Falkner), Algenökologie (Dokulil), Fließgewässerökologie (Humpesch) sowie Evolution und Ökologie der Grundwasser-Crustaceen (Danielopol) werden mit der Pensionierung der leitenden Wissenschaftler in den Jahren 2006-2008 abgeschlossen werden. Die meisten dieser Projekte waren, z. T. aus historischen Gründen, im Raum Wien angesiedelt. Diese Projekte sollen im Sinne einer regionalen Fokussierung der nationalen Zusammenarbeit nicht fortgesetzt werden; vielmehr soll dieses Tätigkeitsfeld den Fachkollegen der Wiener Universitäten (Universität für Bodenkultur, Universität Wien) überlassen werden. Ebenso sollen die Projekte über den Abbau von organischem Material in Bächen, die im Rahmen der RITRODAT-Studie in Lunz begonnen worden waren, mit der Einreichung einschlägiger Publikationen beendet werden.

8. Wiederaufnahme derzeit nicht aktueller Forschungsprojekte

Gegenwärtig nicht geplant.

9. Vorzeitige Einstellung derzeitiger Forschungsprojekte

Keine.

Abschluss der Benthosprojekte mit dem vorzeitigen Ausscheiden von U. Humpesch

10. Auswirkung des Prioritätenkataloges auf die mittelfristige Personalplanung

Die in den ersten beiden Abschnitten genannten Änderungen bzw. Ergänzungen in der Hauptzielrichtung des Forschungsprogrammes können realisiert werden, wenn die in den nächsten drei Jahren ausscheidenden vier Wissenschaftlerstellen adäquat nachbesetzt werden können. Eine dieser vier Wissenschaftlerstellen sollte eventuell in zwei Laboranalytikerstellen umgewidmet werden, um für neu hinzukommende Forschungsfelder mit anspruchsvoller Analytik eine angemessene technische Assistenz zu gewährleisten.

11. Auswirkung des Prioritätenkataloges auf die Infrastruktur

Die hier skizzierten Ziele setzen voraus, dass die Sanierung und Erweiterung des Institutsgebäudes in Mondsee in den nächsten zwei Jahren erfolgt. Der jetzige Zustand der im Dachgeschoss eingerichteten vier Arbeitsräume verletzt die gesetzlichen Bestimmungen der Arbeitsstättenverordnung (s. Bescheid des Arbeitsinspektorats Vöcklabruck vom 23.2.2005) und muss auf jeden Fall beseitigt werden.

Das Land OÖ hat im Sommer 2006 eine zweckgebundene Förderung von 450.000 € zugesagt

Die unzureichende Isolierung des Daches führt auch dazu, dass die Decke mehrerer Räume während der Schneeschmelze wasserdurchlässig wird. Ohne eine direkte Anbindung des Hauptgebäudes an die Bibliothek und die Einrichtung weiterer Labor- und Büroräume fehlen die mittelfristigen Entfaltungsperspektiven für die jetzigen und neu einzustellenden, experimentell arbeitenden Kollegen. Die Neueinstellungen, die Ausweitung der molekularbiologischen Arbeiten und die geplante inhaltliche Öffnung zur terrestrischen Ökologie werden Geräte-

Der unbefriedigende Status quo ante gilt unverändert

investitionen in der Analytik notwendig machen (z. B. Sequenzer, Atomspektroskopie oder Ersatz des veralteten Rasterelektronenmikroskops [REM] durch ein REM mit EDX-Spektrometer zum Elementnachweis). Die benötigten Investitionsmittel werden in dem Fünfjahreszeitraum 2006-2010 in der Größenordnung von 500.000 € liegen.

12. Budgetplanung 2006-2010

Das Institut wird im MFFP 2006-2010 voraussichtlich nur den oben skizzierten Forschungsschwerpunkt bearbeiten. Die Budgetplanung hierfür wurde für die Kuratoriumssitzung vorbereitet und liegt in elektronischer Form auf dem Server des Rechnungswesens vor.

13. Mögliche Anreize für Sponsoren

Das Institut verfügt über das 'know how' und die Infrastruktur für die Hälterung von Fischen und anderen schwer kultivierbaren Süßwasserorganismen, die für verschiedene Zwecke, z. B. als Produzenten bioaktiver Naturstoffe, eingesetzt werden können (s. Abschn. 5). Das Institut kann beratend oder direkt tätig werden bei experimentellen Testreihen, die biomedizinische, pharmazeutische oder in der Wassertechnik i. w. S. tätige Unternehmen für die Entwicklung und Anwendung neuartiger Produkte durchführen müssen. Das internationale Ansehen des Instituts ist als Multiplikator ihrer (umweltschonenden) Produkte für derartige Unternehmen interessant. Die von uns für die *in situ* - Charakterisierung von Mikroorganismen entwickelten neuen molekularbiologischen Analysemethoden können als Frühwarnmethoden für unerwünschte, umwelttoxische Arten (z. B. bei den Cyanobakterien) sowie allgemein im Umweltmonitoring von Oberflächengewässern und Kläranlagen eingesetzt werden.

1. 5 Aktuelle Fassung des Mittelfristigen Forschungsprogramms 2007-2011

Die angestrebte inhaltliche Erweiterung der Institutsziele im Hinblick auf allgemeinere evolutionsökologische Fragestellungen wurde mit der Nachbestetzung der Stelle G. Falkner durch Dr. C.-P. Stelzer Ende 2006 begonnen. Durch die Umwandlung der befristeten in eine unbefristete Antellung von Dr. R. Kurmayer Anfang 2007 erscheint sichergestellt, dass diese erfolgreiche Arbeitsgruppe ihre Untersuchungen zur Entstehung der Diversität und Komplexität der Toxinproduktion bei Cyanobakterien auf genotypischer und phänotypischer Ebene in den nächsten Jahren fortsetzen wird.

Die seit Jahren geplante Sanierung und Erweiterung des Laborgebäudes in Mondsee ist bis dato weder beschlossen noch terminiert worden. Die umfangreichen Umbauarbeiten werden den Laborbetrieb für mindestens ein Jahr massiv beeinträchtigen. Die Ausbildung im Rahmen des IPGL-Kurses muss wenigstens ein Jahr im voraus geplant werden, um die zeitliche und inhaltliche Abstimmung des insgesamt 18monatigen Kurses mit den Partnerinstitutionen in den Niederlanden, Tschechien und den Heimatländern der KursteilnehmerInnen zu ermöglichen. Eine detaillierte Aktualisierung und Ergänzung des Mittelfristigen Forschungsprogramms 2007-2011 erscheint erst dann sinnvoll, wenn die entscheidenden Rahmenbedingungen bezüglich der Sanierung und des Ausbaus des Laborgebäudes klar sind. Die Bedingungen für die Nachbesetzung der frei werdenden Wissenschaftlerstellen wurden gegen Ende des Vorjahres durch den Beschluss des Präsidiums der ÖAW, die Planstellen der Institute und Forschungseinrichtungen nur mehr zu 50% unbefristet zu besetzen, nachhaltig verändert. Für das Institut für Limnologie bedeutet diese Regelung, dass die angestrebte Erschließung neuer Forschungsfelder im Hinblick auf eine allgemeinere ökologische und evolutionsbiologische Ausrichtung erschwert wird, wenn frei werdende Wissenschaftlerstellen nur mehr auf dem PostDoc-Niveau mit einer maximal 6jährigen Anstellungsperspektive besetzt werden können. Es muss sicher gestellt werden, dass die jüngeren KollegInnen auf diesen Qualifizierungsstellen optimale Arbeitsbedingungen vorfinden. **Umso wichtiger ist die Terminierung der Umbauarbeiten im laufenden Jahr.**

1. 6 Forschungsergebnisse 2006

1.6.1 Veröffentlichungen in begutachteten, internationalen Fachorganen

(Institutsmitarbeiter im Fettdruck, Projektmitarbeiter und Examenskandidaten unterstrichen;

- Publikationen in Journalen, deren 'Impact factor' 2005 >1 war)

- Boenigk, J.**, Pfandl, K., Garstecki, T., Novarino, G. & Chatzinotas, A. (2006a) Evidence for geographic isolation and signs of endemism within a protistan morphospecies. Appl. Environ. Microbiol. 72:5159-5164.
- Boenigk, J.**, Jost, S., Stoeck, T. & Garstecki, T. (2006b) Differential thermal adaptation of clonal strains of a protist morphospecies originating from different climatic zones. Environ. Microbiol. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01175.x
- Boenigk, J.**, Pfandl, K. & Hansen, P. (2006c) Exploring strategies for nanoflagellates living in a 'wet desert'. Aquat. Microb. Ecol. 44:71-83.
- Christiansen, G., **Kurmayer, R.**, Liu, Q. & Börner, T. (2006) Transposons inactivate the biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. Appl. Environ. Microbiol. 72: 117-123.
- Danielopol, D.L.**, Gibert, J. & Griebler, C. (2006c) Efforts of the European Commission between environmental scientists and policy-makers. ESPR – Environ. Sci. & Pollut. Res. 13: 138-139.
- Dokulil, M.T.**, Teubner, K. & Jagsch, A. (2006) Climate change affecting hypolimnetic water temperatures in deep alpine lakes. Verh. Internat. Verein. Limnol. 29: 1285-1288.
- Fesl, C., & **Humpesch, U.H.** (2006) Spatio-temporal variability of benthic macroinvertebrate community attributes and their relationships to environmental factors in a large river (Danube, Austria). Arch. Hydrobiol., Suppl. 158, Large Rivers 16: 329-350.
- Kaiblinger, C. & **Dokulil, M.T.** (2006) Application of Fast Repetition Rate Fluorometry to phytoplankton photosynthetic parameters in freshwaters. Photosynth. Res. 88: 19-30.
- Dokulil, M.T.**, Jagsch, A., George, G.D., Anneville, A., Jankowski, T., Wahl, B., Lenhart, B., Blenckner, T. & Teubner, K. (2006) Twenty years of spatially coherent deep-water warming in lakes across Europe related to the North Atlantic Oscillation. Limnol. Oceanogr. 51: 2787-2793.
- Dokulil, M.T.** (2006) Short and long term dynamics of nutrients, potamoplankton and primary productivity in an alpine river (Danube, Austria). Arch. Hydrobiol. Suppl. 158/4, Large Rivers 16: 473-493.
- Dokulil, M.T.**, Donabaum, K. & Pall, K. (2006) Alternative stable states in floodplain ecosystems. Ecohydrol. Hydrobiol. 6: 37-42.

- Gächter, E. & **Weisse, T.** (2006) Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. I. Temperature response. *Aquat. Microb. Ecol.* 45: 291-300.
- Foissner, W., Pichler, M., Al-Rahsheid, K. & **Weisse, T.** (2006) The unusual, Lepidosome-coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): encystment and genesis and release of the lepidosomes. *Acta Protozool.* 45: 323-338.
- **Hahn, M.W.** (2006) The microbial diversity of inland waters. *Curr. Opin. Biotech.* 17: 256-261.
- Helešić, J., **Leichtfried, M.**, Wagner, F., & Omesova, M. (2006) Investigations on gravel bars and the hyporheic zone in an alpine and two hercynian streams in Central Europe. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29: 1511-1515.
- Kornicker, L.S., **Danielopol, D.L.** & Humphreys, W.F. (2006) Description of the anchialine ostracode *Danielopolina* sp. cf. *d. kornickeri* from Christmas Island, Indian Ocean. *Crustaceana* 79: 77-88.
- M'Erimba, Ch.M., Mathooko, J.M., & **Leichtfried, M.** (2006) Variations in coarse particulate organic matter in relation to anthropogenic trampling on the banks of the Njoro River, Kenya. *Afr. J. Ecol.* 44: 1-5.
- Mikheev, V.N., **Wanzenböck, J.** & Pasternak, A.F. (2006) Effects of predator-induced visual and olfactory cues on 0+ perch (*Perca fluviatilis* L.) foraging behaviour. *Ecology of Freshwater Fish* 15: 111-117.
- Müller, H., Foissner, W. & **Weisse, T.** (2006) The role of soil in the life cycle of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): experiments with two clonal strains from the type locality, an astatic meadow pond. *Aquat. Microb. Ecol.* 42: 199-208.
- Pasternak, A.F., Mikheev, V.N. & **Wanzenböck, J.** (2006): How plankton copepods avoid fish predation: From individual responses to variations of the life cycle. *Journal of Ichthyology* 46 (Suppl. 2): 220-226.
- Persson, I., Jones, I., Sahlberg, J., **Dokulil, M.**, Hewitt, D., Leppäranta, M. & Blenckner, T. (2005). Modeled thermal response of three European lakes to a probable future climate. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29: 667-671. (erschienen 2006)
- Pfandl, K., & **Boenigk, J.** (2006) Stuck in the mud: Suspended sediments as a key issue for survival of bacterivorous protists. *Aquat Microb Ecol* 45: 89-99.
- Schauer, M., Jing, J., & **Hahn, M.W.** (2006) Recurrent seasonal variations in abundance and composition of filamentous SOL cluster bacteria (*Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*) in oligomesotrophic Lake Mondsee (Austria). *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4704-4712.
- **Schmidt, R.**, Kamenik C., Tessadri, R. & Koinig, K.A. (2006) Climatic changes from 12,000 to 4,000 years ago in the Austrian Central Alps tracked by sedimentological and biological proxies of a lake sediment core. *J. Paleolimnol.* 35: 491-505.

- **Schober, E. & Kurmayer, R.** (2006) Evaluation of different DNA sampling techniques for the application of the real-time PCR method for the quantification of cyanobacteria in water. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 412-417.
 - Šimek, K., Horňák, K., Jezbera, J., Nedoma, J., Vrba, J., Straškrábová, V., Macek, M., Dolan, J.R., & **Hahn, M.W.** (2006) Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ. Microbiol.* 8: 1613-1624.
 - Snell, T. W., Kubanek, J., Carter, W., Payne, A.B., Kim, J., Hicks, M. & **Stelzer C.P.** (2006) A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Mar. Biol.* 149: 763-773.
 - **Stelzer, C.P.** (2006) Changes in the competitive abilities of two planktonic rotifer species at different temperatures: an experimental test. *Freshwater Biol.* 51: 2187-2199.
 - **Stelzer, C.P.** & Snell, T.W. (2006) Specificity of the crowding response in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Limnol. Oceanogr.* 51: 125-130.
- Teubner, K., Tolotti, M., Greisberger, S., Morscheid, H., **Dokulil, M.T.** & Kucklantz, V. (2006) Steady state of phytoplankton and implications for climatic changes in a deep pre-alpine lake: epilimnetic versus metalimnetic assemblages. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29: 1688-1692.
- Timmermeyer, N. & **Stelzer, C.P.** (2006) Induction of sexual reproduction in *Synchaeta tremula* (Rotifera, Monogononta). *J. Plankton Res.* doi:10.1093/plankt/fbl052.
- Waidbacher, H., Liti, M.D., Fungomeli, M., Mbaluka, K.R., Munguti, M.J. & Straif, M. (2006) Influence of pond fertilization and feeding rate on growth performance, economic returns and water quality in a small-scale cage-cum-pond integrated system for production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquacult. Res.* 37: 594-600.
- **Wanzenböck, J.**, Mikheev, V.N. & Pasternak, A.F. (2006) Modification of 0+ perch foraging behaviour by indirect cues of predation risk. *Ecol. Freshw. Fish* 15: 118-124.
 - **Weisse, T.** (2006a) Freshwater ciliates as ecophysiological model organisms - lessons from *Daphnia*, major achievements, and future perspectives. *Arch. Hydrobiol.* 167: 371-402.
- Weisse, T.** (2006b) Biodiversity of freshwater microorganisms - achievements, problems, and perspectives. In: Gliwicz, Z. M., Mazurkiewicz-Boron, G. & Rouen, K. (eds.): *Advances in European Freshwater Sciences, 2005*. *Pol. J. Ecol.* 54: 633-652.
- **Weisse, T.** & Rammer, S. (2006) Pronounced ecophysiological clonal differences of two common freshwater ciliates, *Coleps spetai* (Prostomatida) and *Rimostrombidium lacustris* (Oligotrichida), challenge the morphospecies concept. *J. Plankton Res.* 28: 55-63.
 - **Weisse, T.** & **Stadler, P.** (2006) Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution. *Limnol. Oceanogr.* 51: 1708-1715.

- **Wu, Q.L. & Hahn, M.W.** (2006a) Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microb. Ecol.* 57: 67-79.
- **Wu, Q.L. & Hahn, M.W.** (2006b) High predictability of the seasonal dynamics of a species-like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake. *Environ. Microbiol.* 8: 1660-1666.
- **Wu, Q.L.**, Zwart, G., **Schauer, M.**, Kamst-van Agterveld, M.P. & **Hahn, M.W.**. (2006) Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5478-5485.
- Zick, D., Gassner, H., Filzmoser, P., **Wanzenböck, J.**, **Pamminger-Lahnsteiner, B.**, & Tischler, G. (2006) Changes in the fish species composition of all Austrian lakes >50 ha during the last 150 years. *Fisheries Management and Ecology* 13: 103-111.

Manuskripte in press/Publikationen 2007

- **Danielopol, D.L.**, Artheau, M. & Marmonier, P. (2007a) Site prioritisation for the protection of rare subterranean species – the cases of two ostracods from south-western France. *Freshwater Biol.* 49: (in press).
- Danielopol, D.L.**, Griebler, C., Gunatilaka, A., Hahn, H.J., Gibert, J., Mermillod-Blondin, F., Messana, G., Notenboom, J., & Sket, B. (2007b) Incorporation of groundwater ecology in environmental policy in Ph. Quevauviller (Ed.) *Groundwater Science and Policy*, Chapter 11, RSC (Royal Soc. of Chemistry), London.
- Gido, Z., Artheau, M., Colin, J.-P., **Danielopol, D.L.** & Marmonier, P. (2006) Description of the stygobiotic crustacean *Dolekiela europaea* ge.nov. sp.nov. (Ostracoda, Limnocytheridae) from Southern France. *Vie Milieu*, 56.
- **Hahn, M.W.** & Schauer, M. (2007) ‘*Candidatus Aquirestis calciphila*’ and ‘*Candidatus Haliscomenobacter calcifugiens*’, filamentous, planktonic bacteria inhabiting natural lakes. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*
- Minati, K.**, Cabral, M.C., Pipík, R., **Danielopol, D.L.**, Linhart, J. & Neubauer, W. (2007) Morphological variability among European populations of *Vestalenula cylindrica* (Straub) (Crustacea, Ostracoda). *Palaeogeogr. Palaeoclimat. Palaeoecol.* 80: (in press).
- Schmidt, R.** & Kamenik, C. (im Druck) Paläolimnologische Untersuchungen an Salzburger Bergseen. In: Jäger P., P. Schaber, D. Zick, *Limnologie ausgewählter Bergseen in Salzburg, Gewässerschutz* 12.
- **Schmidt, R.**, Kamenik, C. & Roth, M. (im Druck) Siliceous algae-based seasonal temperature inference and indicator pollen tracking ca. 4,000 years of climate/land use dependency in the southern Austrian Alps. *J. Paleolimnol.*
 - Schober, E., Werndl, M., Laakso, K., Korschineck, I., Sivonen, K. & **Kurmayer, R.** (2007) Interlaboratory comparison of Taq Nuclease Assays for the quantification of the toxic

cyanobacteria /Microcystis/ sp. J. Microbiol Meth., [doi:10.1016/j.mimet.2006.12.007](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.12.007),
(print version in press)

- Vannini, C., **Pöckl, M.**, Petroni, G., Wu, Q.L., Lang, E., Stackebrandt, E., Schrällhammer, M., Richardson, P.M. & **Hahn, M.W.** (2007) Endosymbiosis in statu nascendi: Close phylogenetic relationship between obligately endosymbiotic and obligately free-living *Polynucleobacter* strains (*Betaproteobacteria*). Environ. Microbiol. 9: 347-359.

1.6.2 Buchbeiträge

Janauer, G. & **Dokulil, M.T.**, 2006. Macrophytes and algae in running waters. In: G. Ziglio, M. Siligardi & G. Flaim (eds.), Biological monitoring of rivers. Application and perspectives, Wiley, Chichester, 89-109

1.6.3 Symposiumsbeiträge, Berichte, Buchbesprechungen, Abstracts, Sonstiges

Chorus, I. et al. (**Kurmayer, R.**, Schober, E. and 27 other co-authors) (2006) QLK4-CT-2002-02634 "Toxic and bioactive peptides in cyanobacteria", Final report, 103pp.

Danielopol, D.L. (2006) Middle Miocene ostracods from the Vienna Basin (Badenian/Sarmatian, Austria, by M. Gross (Book Review). *Crustaceana* 79: 1407.

Danielopol, D.L., Gunatilaka, A., Notenboom, J., Griebler, C., Gibert, J., Sket, B., Hahn, H.J., Messana, G., Lüders, T., Griffioen, J., Liebich, J. & Albrechtsen, H.-J. (2006a) Groundwater ecology as a necessary link to the EU Water Framework Directive. In Umweltbundesamt (Ed.) *European Groundwater Conference, 2006, Proceedings*, 94-99, Umweltbundesamt, Wien.

Danielopol, D.L., Drozdowski, G., Mindl, B., Neudorfer, W., Pospisil, P., Reiff, N., Schabetsberger, R. & Stichler, W. (2006b) Invertebrate animals, and microbial assemblages as useful indicators for evaluation of the sustainability and optimisation of an artificial groundwater-recharge system (Stallingerfeld, Deutsch-Wagram, Lower Austria). In K. Kovar, Z. Hrkal and J. Bruthans (Eds.) *International Conference on Hydrology and Ecology: the groundwater-ecology connection – Proceedings*, 149-156, Czech Assoc. Hydrogeologists, spec. Publ., Prague.

Dokulil, M.T. & Teubner, K. (2006) Bewertung der Phytoplanktonstruktur stehender Gewässer gemäß der EU-Wasserrahmenrichtlinie: Der modifizierte Brettum-Index. - Dt. Ges. Limnol. (DGL), Tagungsbericht 2005 (Karlsruhe), 356-360, Werder 2006.

Finster, M. (2006) Junge Fische im Hallstättersee - unter dem Themenschwerpunkt Ökosystem See in der Rubrik „Thema des Monats“ auf der Homepage der Akademie der Wissenschaften.

- Füreder, L. & **Leichtfried, M.** (2006) IRESA - Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application. – Abstract. Proceedings of MDG+5 Workshop in Vienna, Nov. 2005: KEF ÖAW, ISBN13: 978-3-7001-3770-2: p 53.
- Füreder, L., **Leichtfried, M.**, Amarasinghe, U.S. & Weliange, W.S. (2006) IRESA - Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application. - Progress Report: 1 – 10.
- Füreder, L., **Leichtfried, M.**, Amarasinghe, U.S. & Weliange, W.S. (2006) IRESA - Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application. – Abstract. SIL-Austria Treffen Innsbruck: 8.
- Greisberger, S. & Teubner, K. (2006) Abschätzung der saisonalen und vertikalen Verteilung des Phytoplanktons in einem tiefen Alpensee anhand von Pigmentmustern. – Dt. Ges. Limnol. (DGL), Tagungsbericht 2005 (Karlsruhe), 174-178, Werder 2006.
- Kaiblinger, C. & **Dokulil, M.T.** (2006) Saisonale Unterschiede der photosynthetischen Parameter des Phytoplanktons in Seen: Kurzzeitmessungen mit aktiver Fluoreszenz (FRRF-Technik). - Dt. Ges. Limnol. (DGL), Tagungsbericht 2005 (Karlsruhe), 179-182, Werder 2006.
- Kurmayer, R.** Das Gesundheitsrisiko durch Blaualgen. Web-Information der ÖAW, Thema des Monats, September 2006, http://www.oeaw.ac.at/home/thema/th_2.html
- Kurmayer, R.** Filmdokumentation ARTE, „Cyanobakterien als Naturkatastrophe ?“, Johannes Backes, Taglicht Media Film- und Fernsehproduktion, Köln, wird 2007 ausgestrahlt.
- Kurmayer, R.** (2006) Massenvorkommen von Blaualgen (Cyanobakterien) in Gewässern, 11 Seiten, Verband Österreichischer Schwimmteichbauer, Aichbergstr. 48, 4600 Wels.
- Kurmayer, R.**, Christiansen, G., Molitor, C. & Börner, T. (2006) Elucidating genetic and ecological factors influencing the diversity in the production of the toxic heptapeptide microcystin. 12th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Pau, France, August 27 – September 1st, Vortrag, Abstract.
- Kurmayer, R.**, **Christiansen, G.**, Schober, E. & Fastner, J. (2006) Conference on Peptides in Cyanobacteria. Occurrence, regulation, hazard analysis. International conference, EU project PEPCY, 9-10 May 2006, Berlin.
- Kurmayer, R.**, **Christiansen, G.**, Schober, E., Fastner, J. & Hemscheidt, T. (2006) Genetic diversity in the production of small bioactive peptides in Cyanobacteria. ASLO summer meeting, Victoria, BC, 4-9 June 2006.
- Leichtfried, M.**, Füreder, L., Amarasinghe, U.S. & Weliange, W.S. (2006) The IRESA (Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application) pilot study – structure and function of tropical rivers: preliminary results. – Abstract. Bull. of the N. Am. Benth. Soc. 23 (1): 347.
- Mayr, S. & **Wanzenböck, J.** (2006) Der Perlfisch (*Rutilus meidingeri* (Heckel, 1851)), ein Tiefwasserbewohner unserer Seen: Mythos oder Wahrheit? – Seine Habitatnutzung und Nahrungswahl im Mondsee. Österreichs Fischerei 59: 262-272.
- Molitor, C.**, **Christiansen, G.** & **Kurmayer, R.** (2006) Phylogenetic characterization of mutations affecting the synthesis of toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria. 11th International Symposium on Microbial Ecology, 20-25 August, Vienna, Poster.

- Molitor, C., Christiansen, G. & Kurmayer, R.** (2006) Phylogenetic characterization of mutations affecting the synthesis of toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria. SIL Tagung, Innsbruck, 23.-24. Oktober, Poster, Abstract.
- Naselli-Flores, L., Barone, R., Chorus, I. & **Kurmayer, R.** Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid Mediterranean climate: The enlargement of a problem. On "Cyanobacterial Water Blooms: effects, consequences and management", Brno, Czech Republic, 1-2 September 2006, Vortrag, Abstract.
- Zick, D., Gassner, H., **Wanzenböck, J.S**, Filzmoser, P., Pamminger-Lahnsteiner, B. & Tischler, G. (2006) Increased human population: Major driver of fish decline in lakes. European Commission, DG Environment News Alert Service, Issue 32.

1.6.4 Habilitationen

- Kurmayer, R. (2006). Genetic diversity of toxin production in cyanobacteria. Universität Wien, 238pp.

1.6.5 Dissertationen

- Gächter, E. (2006). Die Bedeutung von phänotypischer und genotypischer Variabilität beim Süßwasserciliaten *Meseres corlissi*. Uni. Salzburg, 105 S. (Weisse).

1.6.6 Diplomarbeiten

- Jost, S. (2006) Ökophysiologische und molekulare Charakterisierung heterotropher Nanoflagellaten des Spumella-Morphotyps. Diploma thesis. Kaiserslautern. (Boenigk, Ko-Betreuer)
- Molitor, C. (2006) Phylogenetische Charakterisierung von Mutationen im Gencluster zur Synthese des toxischen Heptapeptids Microcystin. Institut für Limnologie, Universität Innsbruck, 154 pp. (Kurmayer)
- Neubauer, W. „Measuring the difference of approximating B-splines curves with application to Ostracoda valve-outlines“, Univ- Salzburg, Inst. f. Mathematik, 72 pp. (Danielopol, Ko-Betreuer)
- Roth M. 2006. Rekonstruktion Holozäner Umweltveränderungen in einem Alpenen See mittels Diatomeen und Chrysophyceen (Oberer Landschitzsee, Niedere Tauern). Diplomarbeit an der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Salzburg und dem Institut für Limnologie, Österreichische Akademie der Wissenschaften, 72 pp. (Schmidt)

1.7 Wissenschaftliche Zusammenarbeit 2006

1.7.1 Zusammenarbeit mit in- und ausländischen Instituten

Name des Mitarbeiters	Partner (Name, Institution)	Projekt
Boenigk	Dr. G. Novarino (Natural History Museum, London, UK)	Morphologie und Taxonomie der Chrysomonaden
	Dr. A. Chatzinotas (EPFL, Lausanne, Schweiz)	Molekulare Diversität der Chrysomonaden
	Dr. P.J. Hansen (University of Copenhagen, Marine Biological Laboratory, Helsingør, Dänemark)	Überlebensstrategien von Flagellaten
	Dr. R.A. Andersen (Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, USA)	Diversität der Flagellaten
	Prof. Dr. H. Preisig (Universität Zürich, Schweiz)	Diversität der Flagellaten
	Dr. G. Cronberg (Institute of Ecology/Limnology, Lund, Schweden)	Diversität der Flagellaten
	Dr. C. Kamenik (Institut für Pflanzenwissenschaften, Universität Bern, Schweiz)	Diversität der Flagellaten
	Dr. C. Klemke-Jahn, Dr. L. Toti (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)	Secondary metabolites of flagellates
Danielopol	Mag. S. Iepure (Inst. Speologies „E. Racovitză“ Cluj, Rumänien)	Cryptocandona-Projekt
	Dr. T. Namiotko (Univ. Gdansk, Inst. f. Genetik, Polen)	ESF Projekt
	Dr. R. Pipík (Inst. Geology, Slovak Academy of sciences, Slovakische Rep.)	FWF-Projekt
	Dr. M. Artheau (Univ. Toulouse, Frankreich)	Vestalenula-Projekt
	Dr. Z. Gidó (Univ. Debrecen, Ungarn), Prof. P. Marmonier (Univ. Rennes, Frankreich)	PASCALIS-Projekt
	Prof. J. Gibert (Univ. Lyon, Frankreich), Prof. B. Sket (Univ.	GW-Policy Projekt

	Ljubljana, Slowenien), Dr. C. Griebler (Inst. f. Grundwasser Ökologie, Neuherberg, Deutschland), Dr. J. Notenboom (Netherlands Environmental Assessment Agency, Bilthoven, Niederlande), Dr. A. Gunatilaka (Abt. Ökotoxikologie, Medizinische Univ. Wien), Dr. G. Messana (Inst. for Ecosystem Studies, Florenz, Italien), Dr. H.J. Hahn (Univ. Koblenz-Landau, Arge Grundwasserökologie, Deutschland)	
	Dr. M.C. Cabral (Univ. Lisboa, Portugal)	Vestalenula-Projekt
	Prof. J. Linhart (Univ. Salzburg)	FWF Projekt
	Prof. A. Baltanás (Univ. Autonoma Madrid, Spanien), Dr. U. von Grafenstein (CNRS-CEA, Gif-sur-Yvette, Frankreich) Univ. Doz. A. Brauer (GFZ Potsdam Dr. N. Andersen (Leibniz Inst., Kiel, Deutschland)	ESF Projekt
	Prof. I. Tabacaru (Inst. Speologie "E. Racovitza", Cluj, Rumänien), Prof. L. S. Kornicker (Smithsonian Institution, Washington DC, USA), Dr. Humphreys (Western Australian Museum, Perth, Australien)	Crustacea Phylogeny
	Prof. M. Zuschin (Univ. Wien)	FWF Projekt
	Prof. W. Piller (Univ. Graz)	FWF Projekt
	Mag. B. Mindl (Univ. Innsbruck)	Marchfeldkanal Projekt
	Univ. Doz. M. Harzhauser. (Naturhistorisches Museum, Wien)	FWF Projekt
	Prof. Ph. Quevauviller (European Commission, DG Environment)	GW Policy& Communication
	Dr. M. Gross (Landesmuseum Joanneum, Graz)	FWF Projekt
Dokulil	HR. Dr. Jagsch, Dr. Gassner u.a. (BA für Wasserwirtschaft, Institut für Gewässerökologie, Fischereiwirtschaft und Seenkunde, Scharfling), Prof. Psenner, Dr. Thies (Institut für	EU-Projekte: CLIME

	Zoologie und Limnologie der Universität Innsbruck)	
Dokulil	Dr. Donabaum, Dr. Wolfram, Mag. Kabas (Donabaum & Wolfram OHG, Wien)	Alte Donau
Dokulil	Prof. Janauer (Department für Limnologie & Hydrobotanik, Universität Wien)	Neue Donau, Alte Donau, Studentenbetreuung
Dokulil	Prof. Chen, Prof. Bo, Prof Chen Yuwei (Nanjing Institute of Geography and Limnology, Academia Sinica, Nanjing, VR China)	Limnologische Untersuchung Tai Hu
Dokulil, Kaiblinger	Prof. Herzig (Biologische Station Illmitz)	Neusiedlersee, Fast Repetition Rate Fluorometry
Dokulil, Kaiblinger	Prof. Luigi Naselli Flores (Dipartimento di Scienze Botaniche, University of Palermo, Italien)	Fast Repetition Rate Fluorometry (FRRF) in sizilianischen Reservoiren
Hahn	Dr. Paul Richardson, Dr. David Bruce (Joint Genome Institute (JGI), US Department of Energy, Walnut Creek, CA, USA), Dr. Giulio Petroni, Dr. Claudia Vannini (Dipartimento di Etologia, Ecologia, Evoluzione, Università di Pisa, Pisa, Italy), Prof. Dr. Wolfgang Hess (Universität Freiburg, Deutschland), Prof. Dr. Eric Triplett (University of Florida, USA), Dr. Katherine McMahon (University of Wisconsin, USA)	Polynucleobacter Genome Project
Hahn	Prof. Lars Tranvik, Dr. Eva Lindström, Silke Langenheder (Department of Limnology, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Schweden)	Ökologie der Polynucleobacter Gruppe
Hahn	Prof. Erko Stackebrandt, Dr. Elke Lang (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland)	Taxonomische Charakterisierung von Stämmen der Polynucleobacter Gruppe
Hahn	Prof Antonio Camacho (Department of Microbiology and Ecology, Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, Spanien)	Bakterioplankton in antarktischen Seen

Hahn	Prof. Karel Simek (Hydrobiological Institute, Academy of Sciences CR, Ceske Budejovice, Tschechien)	Charakterisierung der Bakterioplanktondiversität in einem Reservoir
Hahn	Dr. Qinglong Wu (Nanjing Institute of Geography and Limnology, Academia Sinica, Nanjing, VR China)	Bakterioplankton in Seen der Tibetischen Hochebene
Kurmayer	Prof. Thomas Börner (Humboldt Universität Berlin, Institut für Biologie, Berlin, Deutschland)	Mikroevolution der Toxinsynthese bei Cyanobakterien (FWF- P18185)
Kurmayer	Dr. Ingrid Chorus (UBA, Division Environmental Health, Water, Soil, Air Hygiene and Ecology, Berlin, Deutschland)	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)
Kurmayer	Prof. Geoffrey A. Codd, Dr. Louise Morrison (Division of Environmental and Applied Biology, School of Life Sciences, University of Dundee, Schottland, UK)	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)
Kurmayer	Prof. Kirsten Christoffersen (University of Copenhagen, Freshwater Biological Laboratory, Hilleroed, Dänemark)	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)
Kurmayer	Dr. Nicole Tandeau de Marsac (Institut Pasteur, Paris, Frankreich)	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)
Kurmayer	Prof. Kaarina Sivonen (University of Helsinki, Helsinki, Finnland)	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)
Kurmayer	Dr. Petra Visser, Linda Tonk (Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Faculty of Science, Aquatic Microbial Microbiology, Amsterdam, Niederlande)	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)
Kurmayer	Dr. Thomas Rohrlack (Norwegian Institute for Water Research, NIVA Culture Collection of Algae, Oslo, Norwegen)	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)
Kurmayer	Dr. Martin Welker, Dr. Hans von Döhren (TU Berlin, Institut für Chemie, AG Biochemie &	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)

	molekulare Biologie, Berlin, Deutschland)	
Kurmayer	Dr. Dan Kramer (Cyano Biotech GmbH, Berlin, Deutschland)	Exploiting bioactive compounds in cyanobacteria
Kurmayer	Prof. Dr. Thomas Hemscheidt (Department of Chemistry, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, USA)	FWF, P18185
Leichtfried	Prof. Dr. Leo Füreder (Universität Innsbruck, Institut für Ökologie, Limnologische Abteilung)	IRESA, Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application
Leichtfried	Dr. Ch. Baschien (TU Berlin, Deutschland)	Aquatische Pilze in Fließgewässern temperierter und tropischer Zone
Leichtfried	Prof. Dr. U. Amarasinghe (University Kelaniya, Sri Lanka)	Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application
Leichtfried	Prof. Dr. F. Göldenboth (Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland)	Tropische Aquatische Ökologie
Leichtfried	Dr. V. Uvira, I. Palacky (University, Zoological Department, Olomouc, Tschechien)	Macrozoobenthos in Fließgewässerökosystemen
Schmidt	R. Böhm, W. Schöner (Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik (ZAMG) Wien)	ÖAW CLIM-ALP
	A. Cheburkyn, B. Shotyk (Universität Heidelberg, Deutschland)	ÖAW CLIM-ALP
	U. von Grafenstein (Frankreich), A. Brauer, N. Andersen, R. Erlenkeuler (Deutschland), C. Kamenik (Schweiz), D. Danielopol	Dec Lakes FWF, P18595-B17
	R. Klee (Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Deutschland)	FWF, P18595-B17
	A. Korhola (Universität Helsinki, Finnland)	DETECT – Academy of Finland, Developing a tool for assessing ecological reference conditions in the zone of the Baltic Sea.

	M. Rieradevall (Universität Barcelona, Spanien)	ÖAW CLIM-LAND
	R. Tessadri, K.A. Koinig, R. Psenner (Universität Innsbruck)	ÖAW CLIM-LAND
Wanzenböck	Dr. I. J. Winfield (Centre for Ecology and Hydrology, Windermere, England)	Reproduzierbarkeit von Echoloterhebungen
Wanzenböck	Dr. M. Godlewska, Prof. M. Zalewski, Prof. P. Frankiewicz, Dr. A. Swierczowski (International Centre for Ecology, Polish Academy of Sciences)	Echolotstudien an Brutfischen (ÖAD)
Wanzenböck	Dr. V. Mikheev, Dr. A. Pasternak (Severtsov Institute for Ecology and Evolution bzw. Shirshov Institute of Oceanology, Moscow; Russland)	Nahrungsaufnahme von Jungfischen unter Einfluss von Räubersignalen (ÖAD und ÖAW)
Wanzenböck, Pamminer-Lahnsteiner	Prof. Ch. Sturmbauer, Prof. S. Weiss (Universität Graz, Institut für Zoologie)	Ökologische und genetische Nischendifferenzierung von Coregonen
Wanzenböck, Pamminer-Lahnsteiner, Finster, Mayr	H. Gassner, A. Jagsch (Bundesamt für Wasserwirtschaft – Institut für Gewässerökologie, Fschereibiologie und Seenkunde, Scharfling)	Ökologische Bewertung von Seen Echolotuntersuchungen
Weisse	Prof. W. Foissner (Universität Salzburg)	Phänotypische und genotypische Diversität von Planktonciliaten (FWF-Projekt P16796-B06)
Weisse	Dr. Helga Müller (Konstanz, Deutschland)	Cystenbildung bei oligotrophen Ciliaten (FWF-Projekt P16796-B06)
Weisse	Dr. Michaela Strüder-Kypke, (University of Guelph, Department of Zoology, Guelph, Ontario, Kanada)	Genotypische Diversität und Phylogenie von Planktonciliaten (FWF-Projekt P16796-B06)
Weisse	Mag. Tanja Burgmert (Universität Köln, Institut für Botanik, Aquat. Ökologie)	Auswirkungen der globalen Klimaerwärmung auf planktische Lebensgemeinschaften
Winkler	Prof. J. Mathooko (Egerton University, Njoro, KEN) Prof. Y. Mgaya (University of Dar Es Salaam, TZ), Dr. N. Kitaka (Egerton University, KEN), Dr. D. Byamukama (Makerere University), Dr. L. Ndawula	Mombasa Workshop & East Africa Water Association (EAWA)

	<p>(National Fisheries Resource Research Institute, Jinja (FIRRI), UGA), Dr. D. Liti (Moi University), Dr. J. Gichuki (Kenya Marine & Fisheries Research Institute, Kisumu, KEN), Mr. R. Habteselassie (NFLARR, ETH), Mr. R. Kyambadde (Ministry of Water and Environment, UGA), Prof. W. Siebel (UMC-Potsdam University of Management and Communication, D), Fr. E. Stinnig (ÖAD Wien), Dr. B. Yehdeghe (Joanneum Research Forschungs-gesellschaft GmbH, Graz)</p>	
Winkler	<p>Dr. Z. Adamek (University of South Bohemia, CZ), Dr. T. Battin (WasserCluster Lunz, Universität Wien), Prof. P. Denny (UNESCO-IHE, NL), Mag. A. Eder (ÖAD Salzburg), Prof. K. Edwards (University of South Bohemia), Dr. J. Elster, Dr. J. Kvet, Dr. J. Dvorak & Dr. J. Husak (Tschechische Akademie der Wissenschaften, CZ), Dr. J. Erbler (Afro Asiatisches Institut Salzburg), Dr. A. Farnleitner (TU Wien), Dr. C. Fesl, Mag. I. Hödl, Dr. W. Reckendorfer, (Universität Wien), Prof. Dr. L. Füreder (Universität Innsbruck), DI B. Ginzler (Magistrat der Stadt Wien), Dr. Hitsch (Salzburger Energie AG), Mag. Ch. Hörweg (Naturhistorisches Museum Wien), Dr. G. Kavka (Bundesamt für Wasser-wirtschaft, Petzenkirchen), Prof. H. Keckeis (Universität Wien), Dr. R. Konecny (Umweltbundesamt, Wien), Dr. J. Lewis (Royal Holloway, Univ. London, GB), Dr. O. Linhart, Dr. J. Kouril (University of South Bohemia, CZ), Dr. E. Marti (CEAB-CSIC, E), Dr. N. Matsché, Dr. N. Kreuzinger, Mag. K. Ruzicka (TU-Wien), Dr. C. M. M'Erimba (Egerton University, KEN), Dr. R. Perfler (BOKU, Wien), Dr. J. Pokorný, Dr. D. Pithart, (Tschechische Akademie der Wissenschaften, CZ), Dr. C. Schabetsberger, Dr. C. Jersabek</p>	IPGL-Programm

	<p>(Universität Salzburg), Prof. M. Schagerl, Prof. F. Schiemer, Dr. M. Schabuss, Dr. G. Singer (Universität Wien), Dr. Jaromir Seda, Dr. P. Znachnor (University of South Bohemia, CZ.), Dr. K. Tockner (EAWAG, CH), Dr. H. van Bruggen (UNESCO-IHE, NL), Prof. H. Waidbacher, Dr. T. Hein, (BOKU Wien), Dr. G. Weigelhofer (Universität Wien, A), Prof. J. Mathooko, Dr. N. Kitaka, Dr. A. Magana, Dr. M. Gichaba, Dr. S.T. Kariuki, Dr. S. Omondi, Dr. J. Kipkemboi, Prof. J. Onyando (Egerton University, Njoro, KEN), Prof. K. Mavuti (University of Nairobi, Kenya), Dr. D. Byamukama (Makerere University, UGA), Dr. D. Liti (Moi University, KEN)</p>	
Winkler	<p>Prof. H. Waidbacher, Mag. M. Straif (BOKU Wien, A), Dr. D. Liti (Moi University), Mr. Benson (Thiga, Sagana Fish Farm), Mr. J. Munguti (Kenya Marine & Fisheries Research Institute, KEN), Mr. K. Desta (National Fisheries & Other Living Aquatic Resources Research Institute, Sebeta, ETH), Dr. W. W. Mwanja (Dept. Fisheries , Entebbe, UGA), Prof. L. Fiovaranti (University of Bologna, I), Prof. E. Wathuta, Dr. M. Njeri (Egerton University, KEN), Dr. R. Konecny (Umweltbundesamt, Wien, A)</p>	BOMOSA

1.7.2 Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen

Name des Mitarbeiters	Veranstaltung	Titel des Vortrages (V) Titel des Posters (P)
Boenigk, Pfandl (u.a.)	25. Jahrestagung der DGP, Berlin, Deutschland	Survival strategies of chryomonad flagellates: Predation and feeding. (P)
Boenigk, Jost (u.a.)	25. Jahrestagung der DGP, Berlin, Deutschland	Survival strategies of chryomonad flagellates: Temperature adaptation. (P)
Boenigk, Pfandl (u.a.)	25. Jahrestagung der DGP, Berlin, Deutschland	Survival strategies of chryomonad flagellates: Biogeography. (P)
Boenigk, Pfandl (u.a.)	25. Jahrestagung der DGP, Berlin, Deutschland	Survival strategies of chryomonad flagellates: Microdiversity. (P)
Boenigk	Annual meeting of the scandinavian section of Protozoologists, Helsingor, Dänemark	Protist microdiversity: Implications for the interpretation of protist ecology, biogeography and taxonomy. (Eingeladener Vortrag)
Boenigk	Gordon Research Conference on Marine Microbes, Biddeford, USA	Survival & predation strategies: Different levels of phylogenetic resolution uncover a cryptic diversity of strategies. (Eingeladener Vortrag)
Buttinger, Danielopol (et al.)	SIL-Austria Landestreffen, Innsbruck, 22.-24.10.	Small scale shifts in agitated palaeoenvironments of Lake pannon based on ostracod assemblages. (P)
Danielopol et al.	ESF LESC/Exploratory workshop "Effectiveness and gaps in the european legislation concerning subterranean fauna protection and the importance of setting up a european network of protected caves" (09-10.07., Cluj, Rumänien)	Protected subterranean areas in Europe defined by taxonomic and phylogenetic diversity criteria. – Examples of tools for scientific argumentation regarding the necessary implementation decisions. (V)
Danielopol, Tabacaru	18th International Symposium of Biospeology Thema „100 years Biospeology“ (10-15.07, Cluj)	The Herritage of Emil G. Racovitza. (V)
Danielopol et al.	European Groundwater	Groundwater ecology as a

	Conference 2006 (22.-23.06), Wien	necessary link to the EU Water Framework Directive. (V)
Danielopol et a.	International Conference on Hydrology and Ecology: the groundwater-ecology connection, Karlovy Vary, Tschechien, 11.-14.09.	Invertebrate animals, and microbial assemblages as useful indicators for evaluation of the sustainability and optimisation of an artificial groundwater- recharge system (Stallingerfeld, Deutsch- Wagram, Lower Austria). (V)
Danielopol, Namiotko et a.	European Geoscience Union, General Assembly, Wien, 02.- 07.06.	Late-Glacial and Holocene ostracod sequences from lacustrine sediments of lake Mondsee (Austria). (P)
Danielopol, Minati, Buttinger	SIL-Austria Landestreffen, Innsbruck, 22.-24.10.	Ancient Lakes-Ökologie und Evolution. Ein vielver- sprechendes Forschungsfeld innerhalb der aktuellen limnologischen Forschung. (V)
Dokulil	36. Konferenz der IAD (50 Jahre IAD), Klosterneuburg und Wien, 04.-08.09.	Comparative assessment of potamoplankton and primary productivity in the river Danube. (Eingeladener Vortrag)
Dokulil, Kaiblinger	European Large Lakes Symposium, Tartu, Estland, 06.-17.09.	Effects of eutrophication, oligotrophication and climate change on phytoplankton dynamics in a large shallow lake, Neusiedlersee, Austria: A review of long-term variability. (Eingeladener Vortrag)
Dokulil, Kaiblinger	SIL-Austria Landestreffen, Innsbruck, 22.-24.10.	Entwicklung der öster- reichischen Limnologie. (V)
Finster, Wanzenböck J.	SIL-Austria Landestreffen, Innsbruck, 22.-24.10.	Population dynamics of 0+ whitefish (<i>Coregonus</i> sp.) followed by active catching methods and acoustics. (P)
Gächter, Weisse	25. Wissenschaftl. Tagung der Deutschen Ges. für Protozoologie, Liebenwalde bei Berlin, D, 8.-11.3.2006	Adaptation and acclimation of <i>Meseres corlissi</i> (Ciliophora: Oligotrichea) - The role of temperature and soil. (P)
Hahn	ISME-11, International Symposium on Microbial Ecology, Wien, 20.-25.08.	Role of microdiversity in the ecology of freshwater bacteria: Polynucleobacter as

		a model group. (V)
Kaiblinger, Dokulil	European Large Lakes Symposium, Tartu, Estland, 06.-17.09.	Long-term primary productivity dynamics in a large shallow lake in Austria. (V)
Kurmayer	SIL-Austria Landestreffen, Innsbruck, 23.-24.10.	Phylogenetic characterization of mutations affecting the synthesis of toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria. (V)
Kurmayer	„Cyanobacterial Water Blooms: effects, consequences and management“, Brno, Tschechien, 01.-02.09.	Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid Mediterranean climate: The enlargement of a problem. (V)
Kurmayer	12th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Pau, Frankreich, 27.08.-01.09.	Elucidating genetic and ecological factors influencing the diversity in the production of the toxic heptapeptide microcystin. (V)
Kurmayer	International conference, EU project PEPCY, Berlin, Deutschland, 09.-10.05.	Conference on Peptides in Cyanobacteria. Occurrence, regulation, hazard analysis. (V)
Kurmayer	ASLO summer meeting, Victoria, BC, Kanda, 04.-09.06.	Genetic diversity in the production of small bioactive peptides in Cyanobacteria. (V)
Leichtfried	54th Annual Meeting of North American Benthological Society (NABS), Anchorage (USA), 04.-08.06	The IRESA (Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application) pilot study – structure and function of tropical rivers: preliminary results. (P)
Leichtfried	36th Int. Conference of the International Association for Danube Research (IAD) in Klosterneuburg und Wien, 04.-08.09.	
Leichtfried	SIL-Austria Landestreffen, Innsbruck, 22.-24.10.	IRESA - Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application. (P)
Leichtfried	„Bridging Research, Technology and Development: Sustainable Water Resource Management in Eastern Africa“ in Mombasa, Kenya, 04.-08.12.	

Mayr, Wanzenböck J.	SIL-Austria Landestreffen, Innsbruck, 22.-24.10.	The myth of a lake dwelling, deepwater cyprinid: The pearlfish (<i>Rutilus meidingeri</i> (Heckel 1851)) – its habitat use and food in Lake Mondsee, Austria. (V)
Minati	SIL-Austria Landestreffen, Innsbruck, 22.-24.10.	Fossile Ostracoden aus dem Lake Pannon im Bereich von Hannersdorf (Wiener Becken). (V)
Pfandl, Boenigk	25 Tagung der DGP in Berlin	Survival strategies of chryomonad flagellates: Suspended sediments. (P)
Pfandl, Boenigk	25 Tagung der DGP in Berlin	Survival strategies of chryomonad flagellates: Habitat specificity. (P)
Pichler, Danielpol, Roidmayr, Namiotko	SIL-Austria Landestreffen, Innsbruck, 22.-24.10.	Eine arktische Ostracodenart (Crustacea, Ostracoda) im spät Glacial und frühen Holozän Sediment des Mondsees. (P)
Tarao M., Hahn, Jezbera J.	ISME-11, International Symposium on Microbial Ecology, Wien, 20.-25.08.	Size-independent resistance of Actinobacteria to grazing by a nanoflagellate: Possible involvement of S-layer and effect of temperature on grazing resistance. (V)
Roth, Schmidt	20. Treffen der deutschsprachigen Diamatologen, Třeboň, Tschechien, 23.-26.03.	Paläolimnologische Auswertungen eines Holozänen Sedimentkerns in einem hochalpinen See (Oberer Landschitzsee, Niedere Tauern). (V)
Schmidt, Kamenik, Roth	HOLIVAR 2006, Open Science Meeting, UCL, London, England, 12.-15.06.	Seasonal air temperature anomalies in relation to 4,000 years of land use in the southern Austrian Alps. (P)
Wanzenböck, J. & Mayr	Symposium Netzwerk Natur, Universität Salzburg, 24.11.	FFH-Richtlinie und Natura 2000 Gebiete am Beispiel der Fische. (V)
Weisse, T., Stadler, P, Scheffel, U.	25. Wissenschaftl. Tagung der Deutschen Ges. für Protozoologie, Liebenwalde bei Berlin, D, 8.-11.3.2006	Impact of pH on growth and survival of freshwater ciliates (V)
Weisse	International Symposium on Microbial Ecology ISME -11, Vienna, Austria, August 20 -	

	25, 2006 (Mitglied des OK)	
Weisse	Perspectives in aquatic ecology, Plön, D, 30.9.06	
Weisse	3 rd AQUASHIFT workshop which Kiel , D, 14. – 16. 11.06 (Gutachter)	
Winkler	Bridging Research, Technology and Development: Sustainable Water Resource Management in Eastern Africa.	Workshopkoordinator
Weisse	Bridging Research, Technology and Development: Sustainable Water Resource Management in Eastern Africa, Mombasa, Kenya 4. – 8. 12.2006	Welcome address (V)

1.7.3 Vorträge von Mitarbeitern an anderen Institutionen

Name des Mitarbeiters	Gastinstitution	Titel des Vortrages
Finster	Universität Salzburg, 20.10.	The role of predation in pupulation dynamics of 0+ whitefish (<i>Coregonus</i> sp.).
Hahn	Universität Stuttgart, Biologisches Institut	Life History Evolution in Polynucleobacter Bacteria: From Free-Living Organisms to Obligate Endosymbionts of Ciliates.
Hahn	Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei	The Role of Microdiversity in Freshwater Bactrioplankton.
Kurmayer	University of Zürich, Institute for Plantbiology, 20 01.	Microevolution of toxin synthesis in cyanobacteria.
Kurmayer	University of Oslo, Department of Biology, Center for Ecological and Evolutionary Synthesis, 19.05.	Elucidating the genetic and ecological factors influencing the diversity in the production of the toxic heptapeptide microcystin.
Kurmayer	Verband Österreichischer Schwimmteichbauer, Wels	Massenvorkommen von Blaualgen (Cyanobakterien) in Gewässern.
Kurmayer	UBA Berlin, Bad Elster, 27.-28.11.	Assessment of the new genetic methods for detection of toxin-producing cyanobacteria.
Leichtfried	University of Kelaniya, Sri Lanka, 10.03.	Organic matter and potential microbial activity in sediments of Yan and Eswathu Oya, Sri Lanka.
Weisse	Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB), Berlin, D, 27.4.2006	Biodiversity of freshwater microorganisms - achievements, problems, and perspectives (eingeladen).
Weisse	Institut für Biochemie und Biologie, Univ. Potsdam, D, 28.4.2006	Laboruntersuchungen zum pH-Effekt auf planktische Ciliaten und vorläufige Freilanduntersuchungen an einem sehr sauren Tagebaurestsee in NÖ.

1.7.4 Kolloquiumsvorträge

Name des Gastes	Herkunftsinstitution	Titel und Datum des Vortrages
Falkner Gernot	Institut für Limnologie der ÖAW	Die mikrobielle Erfahrung von Phosphatfluktuationen im externen Milieu. 19.01.
Dieckman Ulf	Institute for Applied System Analysis, Laxenburg	Adaptive Speciation: From Pattern and Process. 20.04.
Vrba Jaroslav	Hydrobiological Institute, Biological Centre Academy of Sciences CR, České Budějovice, Tschechien	Constrains and limits of biological recovery from acid stress: What is the future of headwater ecosystems in the Bohemian Forest? 04.05.
Stan-Lotter Helga	Fachbereich Molekulare Biologie, Universität Salzburg	Viable haloarchaea from Permian salt sediments – and in outer space? 08.06.
Fischer Philipp	Limnologisches Institut, Universität Konstanz, Deutschland	On the ecology of burbot; a top-predator in European pre-alpine lakes and river systems. 22.06.
Von Elert Eric	Limnologisches Institut, Universität Konstanz, Deutschland	Food quality in Cyanobacteria. 29.06.
Schlötterer Christian	Institut für Ökologie, Universität Innsbruck	Microsatellites as a molecular tool to infer evolutionary processes and ecological dynamics in experimental <i>E. coli</i> populations. 30.10.
Börner Thomas	Institut für Biologie (Genetik), Humboldt Universität Berlin, Deutschland	Genetische Mechanismen zur Restrukturierung von Genomen bei Prokaryoten und Eukaryoten. 23.11.
Blom Judith	Limnologische Station, Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, Schweiz	Chemische Abwehrstrategien bei Cyanobakterien. 30.11.
Gächter Weisse Thomas	Elke Institut für Limnologie der ÖAW	Significance of local adaptation of <i>Meseres corlissi</i> , a globally occurring but rare freshwater ciliate. 14.12.

1.8 Wissenschaftlerraustausch 2005

1.8.1 Inlands- und Auslandsaufenthalte von Mitarbeitern

Name des Mitarbeiters	Gastinstitution und Aufenthaltsdauer	Finanzierung
Danielopol	Univ. Toulouse, Frankreich, 06-10.10.	Univ. Toulouse
Danielopol	Inst. Speology Cluj, Rumänien, 08.-15.07.	ESF & Rum. Akad/ÖAW
Danielopol	OTHU Lyon, Frankreich, 25.-26.01.	OTHU Lyon
Danielopol, Minati	Expedition Banat, 03.-09.09	FWF & Rum. Akad/ÖAW
Danielopol	Hydroeco 2006, 10.-15.09.	Marchfeldkanal & ÖAW
Dokulil, Kaiblinger	University of Tartu, Estland, Prof. Dr. Tiina Nöges, 06.-17.09.	ÖAW-Austausch
Dokulil, Kaiblinger	Dipartimento di Scienze Botaniche University of Palermo, Prof. Dr. Luigi Naselli Flores, 02.-15.11.	ÖAW-Austausch
Finster	Aufenthalt an der Universität Konstanz, Deutschland zur Aneignung von Methoden zur Altersbestimmung von Jungfischen anhand von Otolithen, 06.-08.02.	Institut
Hahn	Biology Center of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Hydrobiology. 05.-08.09.	Projekt (Prof. Karel Simek)
Hahn	Uganda, Betreuung, Feldforschung, 21.11.-02.12.	IPGL
Kurmayer	UBA, Berlin, 08.-11.05.	EUP0071, Institut
Kurmayer	ASLO Victoria, Alberta (Kanada), 04.-19.06.i	P18185, Institut
Kurmayer	UBA Berlin, Bad Elster, 27.-28. 11.	UBA, Institut
Leichtfried	University of Kelaniya, Sri Lanka, 20.02.-16.03.	Projekt IRESA, KEF – Commission for Development Studies at the Austrian Academy of Sciences
Leichtfried	Workshop, Egerton University, Mombasa, Kenia, , 02.12.-12.12.	privat

Pamminger-Lahnsteiner	Universität Graz, 26.-28.09., Genetische Analysen	FWF Projekt
Wanzenböck S.	Egerton University, Mombasa, Kenia, 28.11.-13.12., Workshopdurchführung „Bridging Research, Technology and Development“	FIR0105
Winkler	Kenya Marine & Fisheries Research Institute, Mombasa, Kenia, 05.08.-13.08., Workshopplanung „Bridging Research, Technology and Development“	FIR0105
Winkler	Egerton University, Njoro, Kenia, 23.09.-15.10., IPGL-Kursmodul Tropical Limnology	BAA00010
Winkler	Moi University, Machakos, Kenia, 03.11.-11.11., BOMOSA EU-Projekt kick-off Meeting	EUP0125
Winkler	Egerton University, Mombasa, Kenia, 28.11.-17.12., Workshopdurchführung „Bridging Research, Technology and Development“	FIR0105

1.8.2 Aufenthalte von Gastwissenschaftlern

Name des Gastes	Herkunftsinstitution, Aufenthaltsdauer	Finanzierung
Andersen R.A.	Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, USA, 13.-15.4.	FWF
Bachien Christiane	TU Berlin, Inst. für Ökomikrobiologie, 28.08.-02.09.	TU Berlin und privat
Battin Tom	Universität Wien, 02.05.-09.05.	BAA00010
Bertalot Horst Lange	Universität Frankfurt/Main, Deutschland, 03.-07.07.	
Burgmert Tanja	Universität Köln, Institut für Botanik, Aquat. Ökologie, 16.-20.1.06	DFG
Chatzinotas Antonis	UFZ Leipzig, Deutschland, 09.-14.04.	FWF
Cronberg Gertrud	Institute of Ecology/Limnology, Lund, Schweden, 13.-15.4. und 2.-16.10.	FWF ÖAW Austausch und FWF
Drozdowski Gabriele	Universität Salzburg, 06.-08.06. und 13.-14.06.	BAA00010
Fesl Christian	Universität Wien, 18.04.-21.04.	BAA00010

Gruber Martin	Universität Wien, 29.05.-02.06.	BAA00010
Hödl Iris	Universität Wien, 18.04.-21.04.	BAA00010
Iepure Sanda	Inst. Speology E. Racovitza, Cluj, Rumänien, 15.4.-14.5.	ÖAW
Jersabek Christian	Universität Salzburg, 06.06.-09.06.	BAA00010
Kamenik Christian	Institut für Pflanzenwissenschaften, Universität Bern, Bern, Schweiz, 13.-15.4. und 2.-5.10.	FWF selbstfinanziert
Keckeis Hubert	Universität Wien, 19.-21.06.	BAA00010
Kitaka Nzula	Egerton University, 30.03.-07.04.	FIR0105
Klemke-Jahn C.	Sanofi- Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland, 15.-16.11.	Sanofi-Aventis
Kreuzinger Norbert	Technische Universität Wien, 15.05.-19.05.	BAA00010
Lupini Giuliano	Rom, Italien, 25.09.2006-04.03.2007	Leonardo da Vinci Programm, EU
Marti Eeugenia	CEAN-CSIC, Barcelona, Spanien, 28.04.-01.05.	BAA00010
Minasyan Arevik	National Academy of Sciences of Armenia, 06.11.-07.04.2007	ÖAD
Pipik Radovan	Inst. Geology, Banska Bistrica, Slowakei, 17.10.-8.11.	ÖAW
Preisig Hans-Rudolf	Universität Zürich, Schweiz, 13.-15.04. und 11.-17.09.	FWF
Ruzicka Katharina	Technische Universität Wien, 17.-19.05.	BAA00010
Schabetsberger Robert	Universität Salzburg, 06.-09.06. und 14.-16.06.	
Schagerl Michael	Universität Wien, 02.-04.05. und 29.05.-02.06.	BAA00010
Singer Gabriel	Universität Wien, 18.-21.04.	BAA00010
Tarao Mitsunori	Institute of Symbiotic Science and Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan, 01.04.05-31.01.06	ÖAD
Weigelhofer Gabriele	Universität Wien, 24.-27.04.	BAA00010

1.9 Organisation von wissenschaftlichen Veranstaltungen

1.9.1 Tagungen und Workshops:

Danielopol	Hydroeco 2006, Karlovy Vary, Tschechien, Organisation des Programms und der Abstracts (11.-14.09)
Danielopol & Piller W.	2. Workshop Paläontologie Lake Pannnon: Ergebnisse der laufenden Forschungsprojekte, Univ. Graz
Leichtfried	36th Int. Conference of the International Association for Danube Research (IAD) in Klosterneuburg und Wien, 04.-08.09.
Wanzenböck S.	Bridging Research, Technology and Development: Sustainable Water Resource Management in Eastern Africa. Workshopmitarbeiterin (Workshopvorbereitung und -betreuung)
Weisse	11 th International Symposium on Microbial Ecology ISME -11, Wien, 20.-25. August 2006 (Mitglied des lokalen Organisationskommittees)
Winkler G.	Bridging Research, Technology and Development: Sustainable Water Resource Management in Eastern Africa. Workshopkoordinator (Workshopplanung & Workshopdurchführung)

LEHRE

1.9.2 Kurse und Praktika:

Dokulil 07.-30.04.	Interdisziplinäre ökologische Exkursion nach Libyen, gem. m. Waitzbauer, Albert, Hemetsberger
Dokulil 20.-21.09.	Integrative ökologische Grundübungen – Limnologischer Beitrag, Univ. Wien, gem. m. K. Teubner
Wanzenböck SS 2006	Populations- und Gemeinschaftsökologie, Kurs 4, Universität Salzburg
Wanzenböck SS 2006	Angewandte Ökologie, Kurs 1, Universität Salzburg
Winkler 09.01.	Universität Wien; VO-300113; Ökologie der Entwicklungsländer, Ökologie & Management von Binnengewässern in Entwicklungsländern: Herausforderung für Wissenschaft & Gesellschaft
Winkler 13.01.	Universität Wien; SE-300153; Seminar zur Ökologie der Entwicklungsländer, Ökologie und Management von Binnengewässern in Afrika.
Winkler 15.–19.05.	IPGL-Kursmodul ES8-L: Data analysis and final seminar on physico-chemical parameters of Lake Mondsee and Lake Krottensee. Probennahme und Datenanalyse.

Winkler 12.–20.06.	IPGL-Kursmodul ES9-L: Fish sampling, catch-data analysis and data presentation. Probennahme, Laboranalysen und Datenanalyse.
Winkler 27.06.	IPGL-Kursmodul ES8-L & ES9-L Final Seminar of Lake Ecology I & II (IPGL Kursprogramm). Moderation und Diskussionsleitung von Abschlussseminar Lake Ecology I & II.
Winkler 25.09.-13.10.	IPGL-Kursmodul ES13-Lb: Physico-chemical characterisation of Njoro River and Meroronyi River. Limnologie von Fischteichen. Vorlesung, Probennahme, Laborarbeit, Datenanalyse und Abschlussseminar (IPGL-Modul Tropical Limnology in Kenia).

1.9.3 Vorlesungen:

Dokulil SS 2006	Einführung Planktonökologie, gem. m. A. Herzig (VS), Univ. Wien
Dokulil SS 2006	Privatissimum für Diplomanden und Dissertanten, Fachbereich Limnologie
Dokulil WS 2006	Phänologie und Saisonalität limnischer Systeme
Dokulil WS 2006	Privatissimum für Diplomanden und Dissertanten, Fachbereich Limnologie
Hahn WS06/06	Evolution und Diversität, Vorlesungen mit Übungen, Universität Salzburg
Hahn WS06/06	Mikrobielle Ökologie, Vorlesung mit Übungen, Universität Salzburg
Wanzenböck WS 2005/2006	Fischökologie, VO, Universität Salzburg
Wanzenböck WS 2006/2007	Fischökologie, VO, Universität Salzburg
Weisse SS 2006	Einführung in die Angewandte Limnologie, Universität Salzburg (2 SWSt) (VO)
Weisse WS 2006/07	Evolution und Diversität, Kurs 2, Universität Salzburg (2 SWSt) (VU)
Weisse WS 2006/07	Einführung in die Angewandte Limnologie, Universität Salzburg (1 SWSt) (VO)

International Postgraduate Training Course in Limnology:

Boenigk, Hahn	Mikrobielle Ökologie
Dokulil	Seenlimnologie (VS)
Kurmayer	Toxic cyanobacteria in water. (23.-24.06)
Leichtfried	Ecology of Streams and Rivers. (Koordination, Praktika, Vorträge, 18.04.-05.05.)
Wanzenböck, Pamminger- Lahnsteiner, Maier, Mayr	Seenökologie Teil: Fischökologie (12.-16.06.)

1.9.4 Examenskandidat(inn)en und Praktikant(inn)en am Institut

Name	Herkunftsinstitut, Dauer, Ausbildungsziel, Betreuer	Finanzierung
Auinger Barbara	Universität Salzburg, Dissertation ganzjährig (Boenigk)	FWF
Buttinger Robert	Universität Wien, Institut für Paläontologie, Diplomarbeit (Danielopol, Doz. Zuschin)	FWF 17738 B03
Finster Martin	Fachbereich Organismische Biologie, Universität Salzburg, Dissertation ganzjährig (Wanzenböck)	ÖAW DOC Stipendium
Gächter Elke	Universität Salzburg, Dissertation bis Dezember (Weisse)	FWF
Huber Kerstin	Universität Wien, Dissertation ab Mai (Schmidt)	FWF
Huber Maria	Fachbereich Organismische Biologie, Universität Salzburg, 3 Monate, Bakkalaureatsarbeit (Wanzenböck)	keine
Iepure Sanda	Universität Cluj, Rumänien, Dissertation (Danielopol)	
Kaddumukasa Martha	Makerere Universität, Master, ab September (Hahn)	IPGL
Kaiblinger Christina	Universität Wien, Dissertation bis April (Dokulil)	CLIME, Institut
Kramberger-Kaplan Gerwin	Universität Salzburg, Studiengang Biologie, Genetik, 01.-08.09. (Kurmayer)	FWF P18185
Mayr Stefan	Fachbereich Organismische Biologie,	keine

	Universität Salzburg, Diplomarbeit ganzjährig (Wanzenböck)	
Minati Klaus	Universität Graz, Institut für Paläontologie, Dissertation, ganzjährig, (Danielopol, Prof. Piller)	FWF17738 B03
Molitor Carole	Universität Innsbruck, Diplomarbeit (Kurmayer)	FWF P 18185
Moser Michael	Universität Salzburg, Diplomarbeit (Weisse)	ÖAW
Mostegl Nina Marlene	Fachbereich Organismische Biologie, Universität Salzburg, 3 Monate, Bakkalaureatsarbeit (Wanzenböck)	keine
Neubauer Walter	Universität Salzburg, Institut für Mathematik, Diplomarbeit (Danielopol, Prof. Linhart)	FWF 17738 B03
Okello William	Universität Wien, Dissertation ab Juni (Dokulil, Kurmayer)	ÖAD
Ostermaier Veronika	Universität München, Diplomarbeit ab Juli (Kurmayer)	FWF P18185
Pamminger-Lahnsteiner Barbara	Fachbereich Organismische Biologie, Universität Salzburg, Dissertation ganzjährig (Wanzenböck)	FWF, Institut
Pfandl Karin	Universität Innsbruck, Dissertation ganzjährig (Boenigk)	FWF
Roth Monika	Universität Salzburg, Diplomarbeit bis Oktober (Schmidt)	Institut
Scheuerl Thomas	Universität Salzburg, Bakkalaureat/ Master, Jänner bis April (Hahn)	FWF
Schober Eva	Universität Wien, Dissertation, ganzjährig (Kurmayer)	
Stadler Katrin	Universität Salzburg, Studiengang Biologie, Genetik, 01.-31.07. (Kurmayer)	eigenfinanziert
Weliange Wasantha Sena	University of Kelaniya, Institute for Zoology, Sri Lanka, Dissertation, ganzjährig, (Leichtfried, Füreder Univ. Innsbruck)	ÖAD, Austrian Exchange Service, Agency for International Cooperation in Education and Research
Wieser Barbara	Universität Wien, Institut für organische Chemie, Studiengang Chemie, 18.-22.09. (Kurmayer)	eigenfinanziert

International Postgraduate Training Course in Limnology (IPGL)

ANDIANDU, Joackin	Fisheries Resources Department, P.O.Box 1, Arua, UGANDA, 07.04 – 24.09, IPGL–Course.	ADA
BENARD, Jacqueline	Kenya Wildlife Service (KWS), Research Dept. P.O.Box 40241, Nairobi, KENYA, 07.04 – 24.09, IPGL– Course.	ADA
HAILE, L. Aschalew	Ethiopian Institute for Agricultural Research, NFLAARC, P.O.Box 64, Sebeta, ETHIOPIA, 07.04 – 24.09, IPGL–Course.	ADA
KADDUMUKASA, A. Martha	Makerere University, Dept. of Zoology, PO Box 7062, Kampala, UGANDA, 07.04 – 24.09, IPGL–Course.	ADA
OSUMO, M. Wilfred	Kenya Marine & Fisheries Research Institute (KMFRI), P.O.Box 1881, Kisumu, KENYA, 07.04 – 24.09, IPGL– Course.	ADA
PENAGOS-GARCIA, Guillermo	Universidad de Antiquia, Postcode 1226, Medellin, COLOMBIA, 07.04 – 24.09, IPGL–Course.	EU (Alban)
REYES FORERO, S. Paola	Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR) Santa Maria, COLOMBIA, 07.04 – 24.09, IPGL– Course	ADA
YEMER, G. Goraw	Amhara Regional Agricultural Research Institute Research (ARARI), P.O. Box 794, Bahirdar, ETHIOPIA, 07.04 – 24.09.	ADA
AANYU, Margaret	National Fisheries Resources Research Institute (NAFIRRI), P.O. Box 343, Jinja UGANDA, 25.09.- 13.10., Tropical Limnology.	ADA
CHEPKEMBOI, K. Labatt	Egerton University, Dept of Biological Sciences, P.O. Box 536, Egerton, KENYA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology	ADA
DAUD, E. Julius	Univ. of Dar es Salaam, Dar es Salaam, Faculty of Aquatic Sciences, P.O. Box 35064, TANZANIA, 25.09.- 13.10., Tropical Limnology.	ADA
HABTEWOLD, Agonafir Dereje	Federal Environmental, Protection Authority, P.O. Box 12760, Addis Ababa, ETHIOPIA, 25.09.-13.10.,	ADA

	Tropical Limnology.	
KAKULI, Yuyunda Viana	University of Juba, College of Education, P.O. Box 321/1 Khartoum, SUDAN, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
KIBONA, R. U. Seleka	Ministry of Water, Rufiji Basin Water Office, P.O. Box 1798, Iringa, TANZANIA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
MGANA, F. Huruma	Tanzania Fisheries Research Institute (TAFIRI), P.O. Box 90, Kigoma, TANZANIA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
MIRERA, O. David	Egerton University & Kwetu Training Centre, P.O. Box 685, Mtwapa, KENYA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
MWESIGYE, Innocent	Makerere University, Institute of Environment & Natural Resources (MUIENR), P.O. Box 7062, Kampala, UGANDA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
NABUYANDA, M. Misery	The Copperbelt University, School of Technology, Chemical Engineering Dept., P.O. Box 21692, Kitwe, ZAMBIA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
OMWERI, O. Justus	Egerton University, Dept. of Environmental Sciences, P.O. Box 536, Egerton, KENYA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
SITOKI, M. Lewis Sitoki	Kenya Marine & Fisheries Research Institute (KMFRI), P.O.Box 1881, Kisumu, KENYA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
SITOTAW, M. Baye	Debu University, Awassa College of Agriculture, P.O.Box 05, Awassa, ETHIOPIA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
SOOKA Christine	Wakiso District Council, Fisheries Dept., Kampala, UGANDA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA
YEMER, G. Goraw	Amhara Regional Agricultural Research Institute Research (ARARI), P.O. Box 794, Bahirdar, ETHIOPIA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	ADA

YOMBA, S. Wilson	Urambo District Council, District Fisheries Dept, P.O.Box 37, Urambo, TANZANIA, 25.09.-13.10., Tropical Limnology.	DANIDA
ALONSO VIZCAINO, Eva	Mediterraneo de Gestion Urbanistica y Medio Ambiente, S.A. C/Atarazanas, CP 29001, Malaga, SPAIN, 23.7. – 10.8., Wetland & Floodplain Ecology.	Self funding
Yun, Ho An	Korea Water Resources Corporation, Yeonchuk, Daedeok District, Daejeon City, KOREA, 23.7. – 10.8., Wetland & Floodplain Ecology.	Self funding
HAILE, L. Aschalew	Ethiopian Institute for Agricultural Research, NFLAARC, P.O.Box 64, Sebeta, ETHIOPIA, 01.10.2006 - 27.04.2007, MSc Thesis.	ADA
KADDUMUKASA, A. Martha	Makerere University, Dept. of Zoology, PO Box 7062, Kampala, UGANDA, 01.10.2006 - 27.04.2007, MSc Thesis.	ADA
SHARAFF, Fathima F.C.	Institute for Fundamental Studies, Hantana Road, Kandy, SRI LANKA, 01.01.-28.02., MSc Thesis.	UNESCO-IHE
MTURI, M. James	Ministry of Water, Dept of Environmental Monitoring & Protection, P.O. Box 55658, Dar es Salaam, TANZANIA, 01.10.2006 - 27.04.2007, MSc Thesis.	ADA
YEMER, G. Goraw	Amhara Regional Agricultural Research Institute Research (ARARI), P.O. Box 794, Bahirdar, ETHIOPIA, 01.10.2006 - 27.04.2007, MSc Thesis.	ADA

1.10 Personalstand 2006

Name	Funktion	Anstellungsverhältnis	Finanzierung	Beschäftigungsausmaß (in % Vollbesch.)	Beschäftigungsdauer (in Monaten), (a) = ausgeschieden
AUINGER Barbara	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWF 18315	75	11
BOENIGK Jens	Dr., Ass.	AKA		100	
BRANDT Ulrike	wiss. techn.	AKA		100	11
CHRISTIANSEN Guntram	Dr., Ass.	AKA	FWF18185	100	
DANIELOPOL Adriana	Mag., wiss. techn.	AKA		85	
DANIELOPOL Dan Luca	Prof. Dr., Ass.	AKA		100	
DOKULIL Martin	Prof. Dr., Ass.	AKA		100	
EISL Liselotte	wiss. techn.	AKA		100	
FALKNER Gernot	Prof. Dr., Ass.	AKA		100	12 (a)
FALKNER Renate	Dr., wiss. Ang.	AKA	FWF6237	100	4 (a)
FINSTER Martin	Mag., wiss. Ang.	AKA	ÖAW9206	55	
GRADL Ingrid	Sekretärin	AKA		100	
GÄCHTER Elke	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWF6796	14	11 (a)
HAHN Martin	Dr., Ass.	AKA		100	
HÖLLERER Hannes	Techniker	AKA		100	
HUBER Kerstin	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWF 18595	75	8
HUMPESCH Uwe	ORat, Prof. Dr., Ass.	B		100	
KAIBLINGER Christina	Mag., wiss. Ang.	AKA		70	3 (a)
KNOBLECHNER Josef	wiss. techn.	AKA	FWF17738	100	
KNOLL Johann	wiss. techn.	AKA		50	
KURMAYER Rainer	Dr., Ass.	AKA		100	
LEICHTFRIED Maria	ORat Dr., Ass	B		100	
MAIER Karl	wiss. techn.	AKA		100	
MAYR Stefan	wiss. techn.	AKA		25	11,5
MAYRHOFER Kurt	Techniker	AKA		100	
MINATI Klaus	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWF17738	75	
NAMIOTKO Tadeusz	Dr., wiss. Ang.	AKA	FWFI35B06	100	3 (a)
PAMMINGER-LAHNSTEINER Barbara	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWFL229B12	70	3
PEUKERT Birgit	Mag., wiss. techn.	AKA	FWF6796	50	11 (a)

PFANDL Karin	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWF5940	70	
PICHLER Maria	Mag., wiss. Ang.	AKA AKA	FWF6796 Ordinarium	100 100	1 11
PLOYER Harald	wiss. techn.	AKA		100	
ROIDMAYR Gertraud	wiss. techn.	AKA	FWFI35B06	100	
ROTH Monika	Wiss. Ang.	AKA		5	4 (a)
SCHEFFEL Ulrike	Dipl.-Biol., wiss.Ang.	AKA	FWF 6796	75	
SCHMIDT Johanna	wiss. techn.	AKA	FWF5709 (9 Mo) Institut (3 Mo)	100 100	
SCHMIDT Jutta	wiss. techn.	AKA	FWF 18595	50	11
SCHMIDT Roland	Prof. Dr., Ass., stellv. Dir.	AKA		100	
STADLER Peter	Techniker	AKA		100	
STEINKOGLER Hildegard	Reinigung	AKA		100	
STELZER Claus-Peter	Dr., wiss. Ang.	AKA		100	4
TEUBNER Katrin	Dr., wiss. Ang.	AKA	EUP 0069 CLIME	100	1 (a)
TURK Nadja	Mag., Kursassist.	AKA	ADA	15	5,5 (a)
WANZENBÖCK Josef	Doz. Dr., Ass.	AKA		100	
WANZENBÖCK Sabine	Dr., Kurs- sekretariat	AKA	ADA	70	
WEISSE Thomas	Prof. Dr., Direktor	AKA		100	
WERNDL Michael	Mag., wiss. techn.	AKA	FWF18185	100	
WIEDLROITHER Anneliese	wiss. techn.	AKA	FWF18315 Ordinarium	75 25	
WINKLER Gerold	Mag., Kursleiter	AKA	ADA	100	
WU Qinglong	Dr., wiss. Ang.	AKA	FWF 15655	100	1 (a)

1.11 Aktualisierung / Vorschau auf die weitere Entwicklung im laufenden Jahr 2007 und Planungen für die Jahre bis 2012

1.11.1 Personell

Der Planstellenbestand des Instituts betrug 2006 unverändert 24 Posten, die gesamte Mitarbeiterzahl etwa das Doppelte (s. Kap. 1.10). Zwei langjährige wissenschaftliche Mitarbeiter sind Ende des Jahres pensioniert (Dr. Gernot Falkner) bzw. vom Dienst frei gestellt (Dr. Uwe Humpesch) worden. Als Nachfolger von G. Falkner konnte Dr. Claus-Peter Stelzer vorzeitig auf der PostDoc-Stelle des Instituts im Herbst 2006 eingestellt werden. Zum Ende des Berichtszeitraumes umfasste der Personalstand des Institutes 13 wissenschaftliche, 22 technische bzw. administrative Mitarbeiter(innen) sowie 11 Examenskandidat(inn)en. Hievon wurden ein promovierter wissenschaftlicher, 7 technisch-administrative Mitarbeiter(innen) und 7 Dissertant(inn)en über Drittmittelprojekte finanziert. Hinzu kamen die Student(inn)en und Dozent(inn)en des IPGL-Kurses sowie zahlreiche wissenschaftliche Gäste, freie Projektmitarbeiter(innen) und externe Examenskandidat(inn)en an verschiedenen Universitäten, die im Berichtszeitraum in wechselnder Anzahl in Mondsee tätig waren.

In dem Zeitraum bis zum Jahre 2012 scheiden vier weitere Wissenschaftler (einschließlich des Dienstfrei-gestellten Beamten U. Humpesch) durch Pensionierung aus. Das Institut ist bestrebt, die bereits im Mittelfristigen Forschungsprogramm 2006-2010 angesprochene Erweiterung seiner Aktivitäten im Hinblick auf eine allgemeinere ökologische und evolutionstheoretische Ausrichtung durch entsprechende Nachbesetzungen zu erzielen, wobei jedoch die limnologische Kernkompetenz des Instituts erhalten bleiben soll. Evolutionstheorie, Populationsgenetik und Bioinformatik sind drei mögliche Fachrichtungen, die die bestehende Expertise des Instituts sinnvoll ergänzen könnten. Bei der Nachbesetzung der Stellen wird die fachliche Qualität und die zu erwartenden Forschungsaktivitäten eines Bewerbers gegenüber seinem spezifischen Fachgebiet vorrangig berücksichtigt werden. Es wird jedoch schwer sein, bei dem bestehenden Gehaltsgefüge und der zeitlichen Limitierung der meisten frei werden Stellen auf maximal 6 Jahre international konkurrenzfähige BewerberInnen anstellen zu können. **Die unverändert bestehende Planungsunsicherheit, nicht nur im Hinblick auf den laufenden Haushalt und notwendige Investitionen, sondern insbesondere bezüglich Zeitablauf und Umfang der Gebäudesanierung, erschwert die Suche nach geeigneten Bewerbern ungemein.**

Die erfreuliche Erhöhung der Anzahl der MitarbeiterInnen durch Projektangestellte einerseits und die in den letzten Jahren beständig zunehmende Übernahme zusätzlicher

administrativer Aufgaben (z.B. durch das Verwaltungsprogramm „Akademis“) durch das Institut andererseits erfordern eine Erhöhung der Anzahl administrativer Stellen in den nächsten Jahren.

1.11.2 Räumlich

Die Raumknappheit, die sich aus einer de facto Verdoppelung der MitarbeiterInnenzahl in den letzten Jahren bei einer unveränderten Infrastruktur des Instituts ergibt, ist hinlänglich bekannt (s. Jahresbericht 2005). Es gilt unverändert das im Jahresbericht 2005 gezogene Fazit: „Eine detaillierte Vorschau bis zum Jahre 2011 ist derzeit angesichts der in jeder Hinsicht fehlenden Planungssicherheit unmöglich.“

1.11.3 Budget

Das Institut wird mit dem vorläufigen Ordinario in Höhe von 1.624 Mio € und einem Drittmittelanteil von 1.06 Mio € (s. Kap. 3, Budgetblätter) seine für das laufende Jahr geplanten Forschungsarbeiten in vollem Umfang durchführen können. Auch für das Jahr 2008 ist ein hoher Drittmittelanteil gesichert. Darüber hinaus können derzeit keine konkrete Angaben gemacht werden, wobei jedoch angesichts der in den letzten Jahren weit überdurchschnittlich hohen Bewilligungsquote von Drittmittelanträgen der Mitarbeiter des Instituts Anlass zu Optimismus besteht.

2. ERLÄUTERUNGEN ZUR FINANZIERUNG 2006–2012

2.1 Erläuterungen zum Rechnungsabschluss 2006

Der vorläufige Rechnungsabschluss war mit 1.501 Mio € ca. 0.12 Mio € niedriger als der BVA 2006. Die Einsparungen ergeben sich vorwiegend durch den teils freiwilligen, teils durch den Präsidiumsbeschluss vom 16. November 2006 erzwungenen Verzicht auf größere Investitionen.

Der Drittmittelanteil betrug einschließlich der nicht über die ÖAW abgerechneten Mittel (v.a. innerhalb der FWF-Projekte) im vergangenen Jahr ca. 1 Mio €.

2.2 Erläuterungen zum Budgetvoranschlag 2007

Der Budgetvoranschlag basiert auf einem gegenüber dem Vorjahr unveränderten Ordinario in Höhe von 1.624 Mio € und einem moderaten Rückgriff auf die Verwahrungen. Eine Erhöhung der insgesamt geplanten Ausgaben auf 1.716 Mio € ergibt sich vor allem durch die dringend notwendigen Investitionen, d.h. dem allmählichen Abbau des Investitionsstaus der vergangenen Jahre, und aus der allgemeinen Zunahme durch den Inflationsausgleich. Die Drittmiteleinnahmen werden voraussichtlich wieder ca. 1 Mio € betragen.

2.3 Erläuterungen zum Budgetantrag 2008-2012

Für die Folgejahre wurde das Ordinario unter der Annahme einer jährlichen dreiprozentigen Erhöhung fortgeschrieben. Das Ordinario deckt nicht die voraussichtlich benötigten Mittel ab. Bis zum Jahre 2011 kann der Ausgleich durch den Rückgriff auf die Verwahrungen erfolgen. Spätestens zum Jahre 2012 erscheint eine Erhöhung des Ordinario über den Inflationsausgleich hinaus aus heutiger Sicht notwendig.

3. ANHANG: BUDGETBLÄTTER 2006–2012

4. Jahresbericht 2005

**ÖSTERREICHISCHE
AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN**

JAHRESBERICHT 2005

INSTITUT FÜR LIMNOLOGIE

BERICHTSZEITRAUM:

1.1.2005- 31.12.2005

LEITER DER BERICHTENDEN
FORSCHUNGSEINRICHTUNG:

Prof. Dr. Thomas WEISSE

ANSCHRIFT:

MONDSEESTR. 9, 5310 MONDSEE

INHALTSVERZEICHNIS

1	ALLGEMEINE ENTWICKLUNG	4
1.1	Während des Berichtjahres 2005	4
1.1.1	Personell	5
1.1.2	Räumlich	5
1.1.3	Budgetär	6
1.2	Aktualisierung / Vorschau auf die weitere Entwicklung im laufenden Jahr 2006 und Planungen für die Jahre 2007 – 2011	6
1.2.1	Personell	6
1.2.2	Räumlich	7
1.2.3	Budgetär	7
2	WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT	8
2.1	Zusammenfassung des wissenschaftlichen Berichts 2005	8
2.2	Summary of the Scientific Annual Report	10
2.3	Bericht 2005	11
2.4	Bewertung Übereinstimmung / Abweichung vom Mittelfristigen Forschungsprogramm	54
2.5	Vorschau auf die weitere wissenschaftliche Tätigkeit 2006 – 2011	55
2.6	Personalstand 2005	56
2.7	Publikationen 2005	59
2.7.1	Veröffentlichungen	59
2.7.2	Dissertationen	64
2.7.3	Diplomarbeiten	65
2.8	Wissenschaftliche Zusammenarbeit 2005	66
2.8.1	Zusammenarbeit mit in- und ausländischen Instituten	66
2.8.2	Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen	73
2.8.3	Vorträge von Mitarbeitern an anderen Institutionen	78
2.8.4	Vorträge von Gästen	80
2.9	Wissenschaftleraustausch 2005	81
2.9.1	Inlands- und Auslandsaufenthalte von Mitarbeitern	81
2.9.2	Aufenthalte von Gastwissenschaftlern	82
2.10	Ausbildung und Schulung 2005	85
3	ERLÄUTERUNGEN ZUR FINANZIERUNG 2005–2011	96
3.1	Erläuterungen zum Rechnungsabschluss 2005	96
3.2	Erläuterungen zum Budgetvoranschlag 2006	96
3.3	Aktualisierung des / Erläuterungen zum Budgetantrag 2007-2011	96

Schwerpunktthema:

Untersuchung der Entstehung und Erhaltung der Diversität und Komplexität auf der Ebene des Individuums, der Population, der Art und des Ökosystems

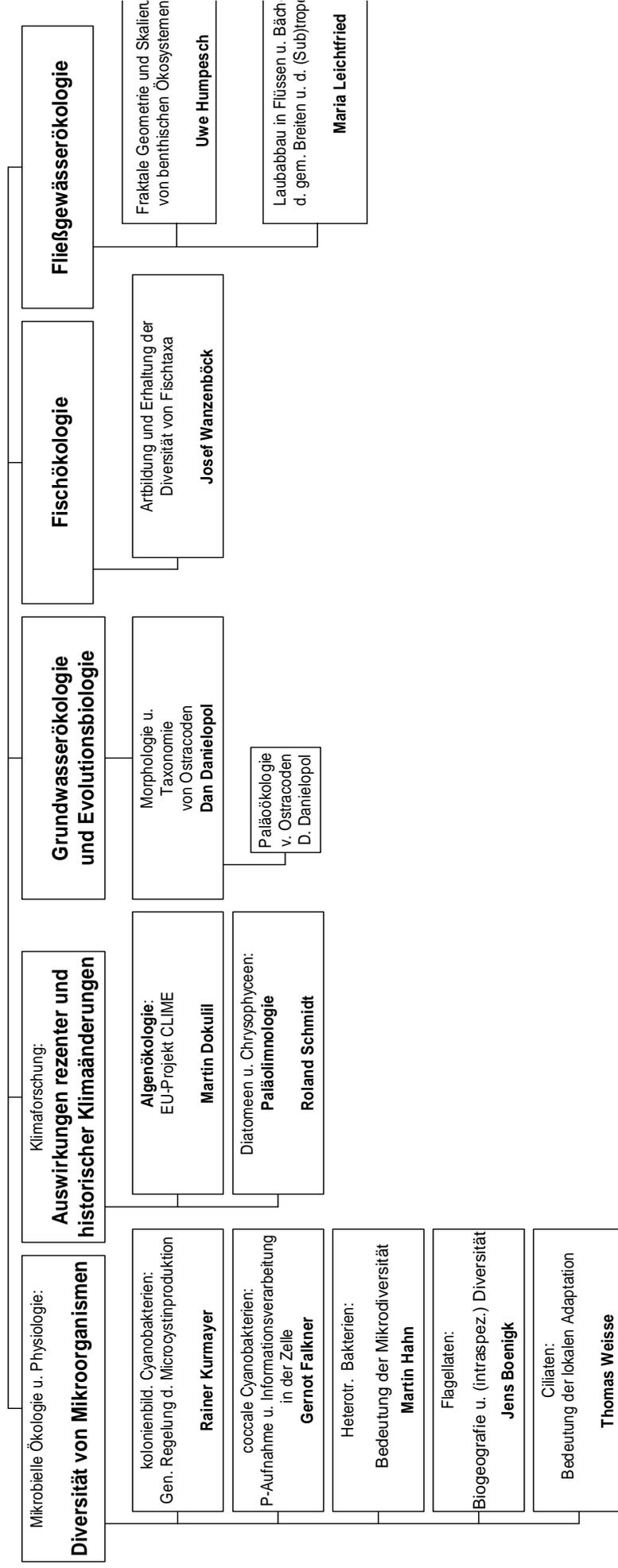


Abb. 1. Organigramm der wissenschaftlichen Forschung mit den einzelnen Arbeitsgebieten und den jeweiligen verantwortlichen Wissenschaftlern

1 ALLGEMEINE ENTWICKLUNG

1.1 Während des Berichtjahres 2005

Das Institut für Limnologie konnte seine Forschungsarbeiten im Jahre 2005 trotz der budgetären Unsicherheit seitens des Ordinarium in einem bisher unerreichten Umfang fortführen. Verantwortlich dafür war der hohe Anteil an lukrierten Drittmitteln, der im Berichtszeitraum mit >40% des Gesamthaushalts ein Rekordniveau erreicht hat (s. Kap. 3 und Budgetblätter im Anhang). Gegen Ende des Berichtjahres wurden 2 EU-, 1 ESF- und 8 FWF-Projekte am Institut durchgeführt (s.a. Kap. 2.1). Ein Genomprojekt (*Polynucleobacter*-Genom-Projekt) wurde vom US Joint Genome Institute als erstes Projekt unter österreichischer Federführung gegen starke internationale Konkurrenz zur Förderung angenommen und bereits begonnen. Zehn der 11 auf Planstellen angestellten Wissenschaftler des Instituts haben im Jahre 2005 ein eigenes, international begutachtetes Forschungsprojekt geleitet oder die Bewilligung erhalten. Fast alle dieser Projekte beziehen sich inhaltlich direkt auf den gegenwärtigen Institutsschwerpunkt (Abb. 1). Das Institutsgebäude in Mondsee hat nunmehr seine Kapazitätsgrenze erreicht bzw. bezüglich der Labor- und Büroausstattung bereits in Teilen überschritten. Seit 1997, dem Jahr vor dem Dienstantritt des jetzigen gf. Direktors, hat sich der Personalstand in Mondsee von 18 Mitarbeiter(inne)n auf gegenwärtig über 40 (s. Kap. 2.6) mehr als verdoppelt. Hinzu kommen zeitweise bis zu 15 Absolvent(inn)en des IPGL-Kurses. Für sechs Mitarbeiter(innen) mussten Arbeitsplätze im Dachgeschoss eingerichtet werden, das nach wie vor nicht isoliert ist. Drei kleinere Büroräume im Dachgeschoss erfüllen nicht die Anforderungen an die Mindestraumhöhe, ebenso fehlt nach wie vor ein Brandschutzplan. Diese Mängel sollen im Zuge des geplanten Ausbaus des Gebäudes in Mondsee beseitigt werden. Alle hierfür notwendigen Vorarbeiten wurden von der Institutsleitung in enger Kooperation mit dem Baureferat der ÖAW (Arch. DI H. Schuch) im Berichtszeitraum geleistet. Die Bauverhandlung fand am 28. Februar in Mondsee statt, die wenigen Einsprüche konnten wenig später abgewiesen werden. Die Sanierungsbedürftigkeit des Institutsgebäudes hat sich mit dem Auftreten von mehreren feuchten Wänden im Erdgeschoss gegen Ende des abgelaufenen Jahres verstärkt (Abb. 2, s. Kap. 1.1.2). Das Fehlen konkreter Zusagen bezüglich der Gebäudesanierung und -erweiterung kann sich für die Zukunft des Instituts für Limnologie und seiner jüngeren Mitarbeiter, die ihre Karriere mittelfristig planen wollen, als fatal erweisen.

1.1.1 Personell

Der Planstellenbestand des Instituts war 2005 mit 24 Posten gegenüber dem Ende des Vorjahres unverändert. Zwei technische Mitarbeiter(innen) sind Ende des Jahres auf eigenen Wunsch ausgeschieden, die Stellen konnten anfangs des laufenden Jahres wieder besetzt werden. Zum Ende des Berichtszeitraumes umfasste der Personalstand des Institutes 15 wissenschaftliche, 20 technische bzw. administrative Mitarbeiter(innen) sowie 11 Examenskandidat(inn)en. Hievon wurden 4 promovierte wissenschaftliche, 7 technisch-administrative Mitarbeiter(innen) und 7 Dissertant(inn)en über Drittmittelprojekte finanziert. Hinzu kamen die Student(inn)en und Dozent(inn)en des IPGL-Kurses sowie zahlreiche wissenschaftliche Gäste, freie Projektmitarbeiter(innen) und externe Examenskandidat(inn)en an verschiedenen Universitäten, die im Berichtszeitraum in wechselnder Anzahl in Mondsee tätig waren.

1.1.2 Räumlich

Wie oben ausgeführt, hat das Institutsgebäude seine Kapazitätsgrenze bezüglich Labor- und Büroausstattung, aber auch der Anzahl der Parkplätze im Berichtszeitraum erreicht bzw. überschritten. Unabhängig vom Ausbau ist das 25 Jahre alte Gebäude dringend sanierungsbedürftig (Abb. 2). Das bisherige Chemielabor wurde für einen Arbeitsbereich der mikrobiellen Ökologie (Doz. Dr. J. Boenigk) umgewidmet und die Laborausstattung mit Instituts- und Drittmitteln ergänzt. Der Kursraum dient seither gleichzeitig als Chemielabor. Die über 20 Jahre alte Institutsküche wurde ersetzt und durch den Werkstattmeister (H. Höllerer) kostengünstig neu gestaltet.



Abb. 2. Feuchtigkeitsschäden Im Erdgeschoss

1.1.3 Budgetär

Ca. 75% der Mittel des Ordinariums (insgesamt 1.54 Mio € im Jahr 2005) waren für Personalkosten festgelegt, weitere ca. 6 % wurden für den Gebäudebetrieb i. w. S. (Energie- und Wasserkosten, Müllabfuhr, Datenleitungen, Gebäudeerhalt etc.) benötigt. Die wissenschaftliche Forschung des Instituts wurde daher zum weit überwiegenden Teil durch lukrierte Drittmittel finanziert. Das Gesamtbudget (ohne lebende Subventionen) betrug im Berichtsjahr einschließlich aller Drittmittel (s. Anh.) ca. 2.6 Mio €, wobei >40% auf Drittmittel entfielen.

1.2 Aktualisierung / Vorschau auf die weitere Entwicklung im laufenden Jahr 2006 und Planungen für die Jahre 2007 – 2011

Im laufenden und im kommenden Jahr werden die Forschungsarbeiten im Rahmen der zahlreichen FWF- und EU/ESF-Projekten sowie des IPGL-Kurses wie geplant durchgeführt werden können. Die Pläne für die wissenschaftliche Arbeit der näheren Zukunft werden im Kap. 2.3 bei den jeweiligen Arbeitsbereichen dargestellt. Eine detaillierte zusammenfassende Vorschau auf die nächsten beiden Jahre wird für den Tätigkeitsbericht der Akademie der Wissenschaften Ende März d. J. vorgelegt werden. Die bereits für das vergangene Jahr geplante, auf Grund der ungeklärten budgetären, räumlichen und personellen Weiterentwicklung des Instituts verschobene Diskussion des mittelfristigen Forschungsprogrammes soll wieder aufgenommen werden, sobald sich die Zukunftsperspektiven annähernd realistisch abschätzen lassen. In dieser Diskussion ist auch die Situation der Limnologie in Österreich und innerhalb der EU zu berücksichtigen, die sich gegenwärtig in einer Phase der Neuorientierung befindet. Eine detaillierte Vorschau bis zum Jahre 2011 ist derzeit angesichts der in jeder Hinsicht fehlenden Planungssicherheit unmöglich.

1.2.1 Personell

Vier Wissenschaftler, d. h. mehr als ein Drittel des derzeitigen wissenschaftlichen Stammpersonals, werden voraussichtlich bis Ende 2008 pensioniert werden. Eine Nachbesetzung dieser Stellen mit jungen, ähnlich produktiven Wissenschaftlern wie die derzeitige Gruppe der jüngeren Projektleiter, eröffnet die Möglichkeit der inhaltlichen Erweiterung und teilweisen Neuausrichtung des Instituts, wie sie vom gegenwärtigen gf. Direktor gewünscht wird. Der bisher vernachlässigte Arbeitsbereich Zooplanktonökologie

soll die über 30 Jahre intensiv untersuchte Algenökologie ablösen und die Vernetzung zwischen der Mikrobiellen Ökologie und der Fischökologie verstärken. Eine der frei werden Stellen soll mit einem eher theoretisch orientierten Wissenschaftler, z. B. aus der Populationsgenetik oder Evolutionsbiologie besetzt werden, der die vielfältigen experimentellen Arbeiten unterstützen soll. Die Bauphase sollte bis Ende 2007 abgeschlossen werden, um die notwendigen Gebäudeadaptierungen für eine zukunftsorientierte, experimentelle Forschung zu gewährleisten. Neueinstellungen von experimentell arbeitenden Wissenschaftlern sind während der Bauphase sinnlos. Ohne eine entsprechende räumliche Erweiterung kann das Institut keine adäquaten Perspektiven bieten, und es wird nicht gelingen, wie in den letzten Jahren hoch qualifizierte, international konkurrenzfähige Wissenschaftler nach Mondsee zu holen.

1.2.2 Räumlich

s. o.

1.2.3 Budgetär

Die Neueinrichtung bzw. Adaptierung von Laborräumen und die Ergänzung der apparativen Ausstattung im Zuge von Nachbesetzungen werden Kosten in Höhe von durchschnittlich ca. 70 000 € pro Stelle verursachen. Geringe Einsparungen werden sich durch leicht verringerte Personalkosten ergeben, da das Gehaltsniveau der jüngeren Wissenschaftler geringer als das ihrer ausscheidenden Kollegen sein wird. Die beiden als 'lebende Subventionen' geführten Beamtenstellen, die gegenwärtig nicht im Institutsbudget aufscheinen, sollten mittelfristig als ÖAW-Planstellen in den Institutshaushalt überführt werden. Das Institut hat schon jetzt einen Nachholbedarf an Investitionsmitteln, da in den letzten beiden Jahren keine Investitionsmittel zusätzlich zum Ordinarium zur Verfügung standen und zahlreiche Geräte, die der Grundausstattung zuzurechnen sind, nicht über Drittmittel eingeworben werden können, jedoch für die erfolgreiche Durchführung der Projekte Voraussetzung sind. In der Summe benötigt das Institut eine ca. 3%ige jährliche Nettosteigerung der Mittel des Ordinariums, wenn das in den letzten Jahren erreichte wissenschaftliche Niveau gehalten und sogar weiter angehoben werden soll.

Eingedenk der Tatsache, dass die ÖAW das Jahr 2005 ohne ein ordentlich verabschiedetes Budget bestreiten musste und in der gegenwärtigen finanziellen Unsicherheit, ist eine detaillierte Planung für den Zeitraum nach 2008 unmöglich.

2 WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

2.1 Zusammenfassung des wissenschaftlichen Berichts 2005

Das Institut setzte seine Grundlagen- und angewandte Forschung innerhalb der Ökophysiologie und Evolutionsökologie aquatischer Organismen und Gemeinschaften im Rahmen des fünfjährigen Forschungsschwerpunktes (<http://www.oeaw.ac.at/limno/research.htm>) fort. Innerhalb dieses Schwerpunktes wird vorrangig der Ursprung und der Erhalt der Diversität auf verschiedenen Ebenen untersucht, die von Molekülen (Genen und Proteinen) über Organismen und Populationen bis hin zu Organismen-Gemeinschaften reichen. Diese Forschung wird auf mehreren limnologischen Teilgebieten betrieben, die die Mikrobielle Ökologie i. w. S., die Fischökologie, Paläolimnologie, Fließgewässerökologie und Grundwasserforschung umfassen. Die Integration der Teilgebiete wurde weiter verstärkt, z. B. durch die Organisation eines fachübergreifenden, auf den Klimawandel der Vergangenheit bezogenen Workshops zur Paläoökologie, durch gemeinsame Publikationen, der Einrichtung einer für alle graduierten Studenten offenen Seminarreihe sowie durch das Einreichen koordinierter bzw. gemeinsamer Forschungsanträge.

Mehrere Forschungsprojekte, wie das große EU-Projekt CLIME, wurden 2005 beendet, drei neue FWF-Projekte begonnen. Zum Ende des Berichtszeitraums wurden am Institut 8 FWF-, 2 EU- Projekte und ein ESF-Projekt durchgeführt. Zwei weitere FWF-Projekte wurden 2005 genehmigt, aber erst im laufenden Jahr begonnen. Das '*Polynucleobacter*-Genom-Projekt' wurde vom US Joint Genome Institute gegen starke internationale Konkurrenz zur Förderung angenommen. Der Anteil der Drittmittel-finanzierten Projekte betrug >40% des gesamten Institutshaushalts. Die Betonung der meisten Projekte lag auf der Grundlagenforschung. Die angewandte Limnologie wurde in zwei nationalen Projekten betrieben. Neu begonnen wurde die Kooperation mit einem Unternehmen zur wirtschaftlichen Verwendung bioaktiver Naturstoffe.

Zahlreiche (30) Seminarvorträge wurden in Mondsee von Gästen und Institutsmitarbeitern gehalten. Die Forschungsergebnisse wurden auf ca. 30 internationalen Fachkongressen vorgestellt. Weiters wurden >30 Arbeiten in begutachteten internationalen Fachzeitschriften und Fachbüchern mit überwiegend hohem 'Impact factor' (IF) veröffentlicht (Abb. 3 und 4). Im Durchschnitt publizierte jeder Wissenschaftler des Instituts 2005 fast 3 begutachtete Arbeiten, und >40% der Publikationen erschienen in Fachzeitschriften mit einem IF >2.

Mehr als 40 Gastforscher und Studenten aus 29 Ländern nahmen aktiv an der Institutsarbeit teil. Eine Habilitation, drei Dissertationen und 11 Diplom- bzw. Mastersarbeiten wurden 2005 erfolgreich abgeschlossen. Die habilitierten Mitarbeiter waren an drei österreichischen Universitäten in der Lehre tätig. Der Internationale Post-Graduierten Trainingskurs in Limnologie (IPGL) verstärkte seine internationale Aktivitäten und lukrierte weitere Drittmittel. Erstmals wurde das Kursmodul 'Tropical Limnology' in Kenia durchgeführt. Weiters wurden mehrere Kurzzeitmodule neu angeboten. Insgesamt wurden 43 Studenten und Experten aus verschiedenen afrikanischen und asiatischen Ländern innerhalb des IPGL-Kurses betreut (nähere Information unter <http://www.ipgl.at>).

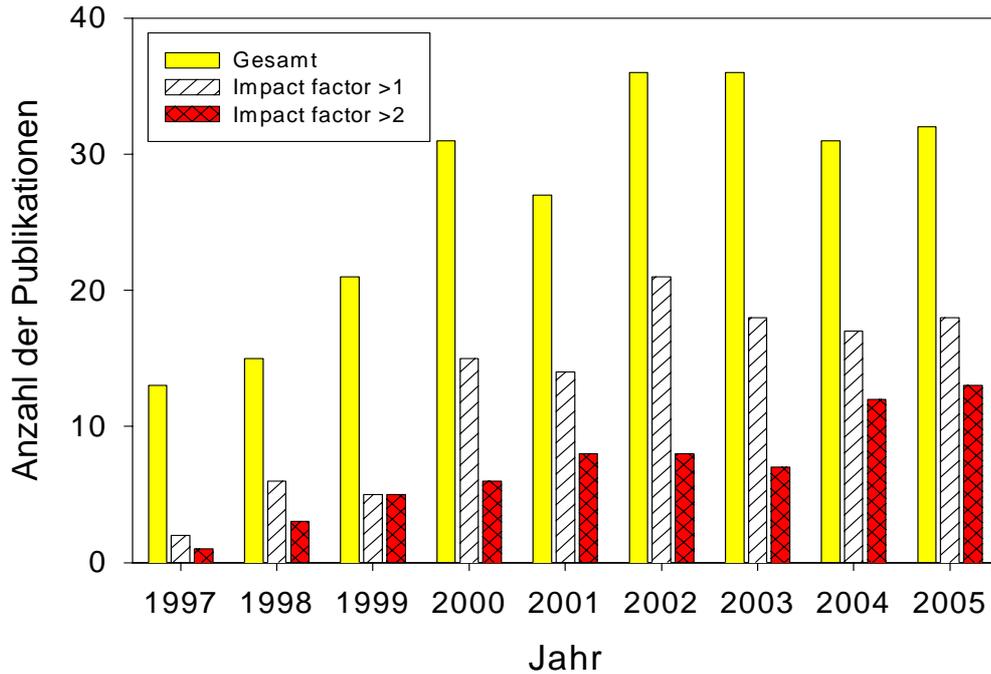


Abb. 3. Gesamtzahl der Publikationen der Abt. Mondsee (bis 2002) bzw. des Instituts für Limnologie (ab 2003) in begutachteten Zeitschriften (1997-2005) sowie Anzahl der Veröffentlichungen, die in Zeitschriften mit einem 'Impact factor' von >1 bzw. >2 erschienen (gemäß 'Journal Citation Reports® Science Edition').

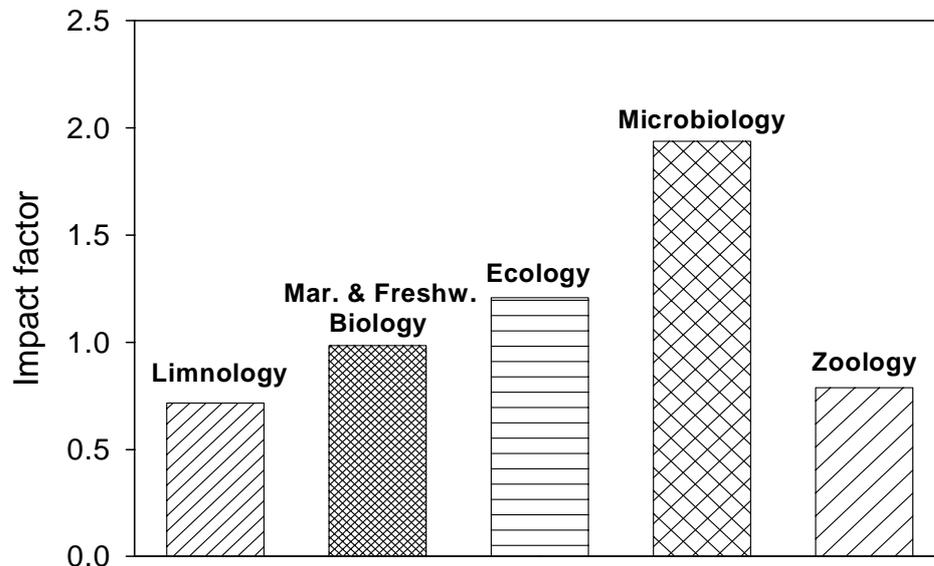


Abb. 4. Durchschnittliche Impactfaktoren (Med IF) der internationalen Fachzeitschriften in der Limnologie und benachbarten Fachkategorien im Jahre 2004 (Quelle: 'Journal Citation Reports® Science Edition').

2.2 Summary of the Scientific Annual Report

The Institute continued its basic and applied research into the ecophysiology and evolutionary ecology of aquatic organisms and communities within the current five years' (2001-2005) research programme (<http://www.oeaw.ac.at/limno/research.htm>). Within this framework, the focus is on investigating the origin and maintenance of diversity at various levels, ranging from molecules (genes and proteins) to organisms, populations and communities. This research is performed in various limnological subdisciplines, including microbial ecology in a broad sense, fisheries ecology, palaeolimnology, river ecology and groundwater research. The integration of the subdisciplines was further enhanced, e.g. by organizing an interdisciplinary paleoecology workshop on climate change in the past, by joint publications, a seminar series open for all for graduate students, and submission of coordinated or joint research proposals.

Several projects, such as the large EU project CLIME, were finished in 2005, three new projects funded by the Austrian Science Fund (FWF) were started. Eight FWF-, two EU-projects and one ESF-project were in progress at the end of the year. Two more FWF-projects, which were approved in 2005, have begun in the current year. The '*Polynucleobacter* Genome Project' was approved by the US Joint Genome Institute against strong international competition. The proportion of extramural funds reached >40% of the total budget. The emphasis of most projects was on basic research. Applied limnology was the focus of two national projects. A cooperation project with an enterprise on the commercial use of bioactive natural products was started.

Numerous (30) seminar talks were given at Mondsee, both by guest speakers and members of the scientific staff. Research results were further presented at >30 international meetings and published by >30 papers in peer-reviewed international journals and books. Most of the papers were published in journals with high impact factors (IF, Abb. 3 und 4). Each of the Institute's scientists published, on average, approximately 3 reviewed papers in 2005, and >40% of the publications appeared in journals with IF >2.

Over 40 guests and students from 29 countries participated actively in the institute's research. One habilitation thesis, three Ph.D. and 11 diploma/masters theses were successfully completed in 2005. Teaching was conducted by senior scientists and research associates at 3 different Austrian universities. The International **Post-Graduate** Course in Limnology increased its international ties and attracted further extramural funds. The course module 'Tropical Limnology' was conducted in Kenya for the first time. Similarly, several short time courses were offered for the first time. Altogether, 43 graduate students and junior experts from various African and Asian countries were supervised within the IPGL activities (see <http://www.ipgl.at>).

A. Diversität, Ökophysiologie und Populationsdynamik von Planktonorganismen

A1. Planktische Algenökologie

Das letzte Jahr des EU-Projekts CLIME (<http://www.water.hut.fi/clime>) sowie der Abschluss des BMLFUW-Projekts wurden dazu genutzt, die erarbeiteten Ergebnisse bei Tagungen, diversen Veranstaltungen vorzustellen und in Publikationen zu veröffentlichen (**M. Dokulil**, mit K. Teubner, A. Danielopol, A. Stracke und Examenskandidat(inn)en). Vier eingeladene Vorträge bei Tagungen sind hier anzumerken. Beim Sommermeeting der American Society for Limnology and Oceanography (ASLO) in Santiago de Compostela, Spanien wurde gemeinsam mit Fachkollegen ein Symposium über Auswirkungen von Klimaänderungen organisiert und durchgeführt. Dabei wurden Auswirkungen der Veränderungen des Klimas auf Seen und ihre Einzugsgebiete dargestellt. Von Mitarbeitern des CLIME Projektes wurden Modelle zu den wesentlichen physikalischen und biologischen Komponenten sowie Voraussagen über Auswirkungen von Klimaszenarien vorgestellt. Beim Abschlussmeeting wurde als ein Endprodukt des CLIME-Projektes ein ‚Expertensystem für Entscheidungen von Klimaauswirkungen‘ vorgestellt, welches im nächsten Jahr öffentlich zugänglich sein wird. Für die EU-Kommission wurde ein Szenario künftiger Klimaauswirkungen auf Gewässer in Europa erarbeitet und publiziert.

Von 10.-14.10.2005 wurde ein Arbeitstreffen zur Vorbereitung des Abschluss-Meetings des EU-Projektes CLIME in Scharfling am Mondsee organisiert. Mitarbeiter des CLIME-Projektes haben am SIG-Workshop ‚Regionalisierung‘ in Estland sowie am Jahres- und Abschlussmeeting in Innsbruck teilgenommen. Die während des Projektes erhobenen Daten werden derzeit, sofern nicht bereits publiziert, zur Veröffentlichung vorbereitet. Ein Buch, welches die Ergebnisse des Klimaprojektes CLIME zusammenfassen wird, soll 2006 in der Reihe ‚Aquatic Ecology‘ des Springer Verlags erscheinen.

Untersuchungen zur physiologischen Steuerung der Photosynthese des Phytoplanktons wurden am Neusiedlersee begonnen (Dokulil & Kaiblinger). Während einer einwöchigen Messkampagne wurden Momentanwerte der Photosynthese mittels Fluoreszenz (Fast^{track}) kontinuierlich über mehrere Tage im offenen See und im Schilfgürtel erfasst.

Als Folge der Studienreise nach China im Jahr 2004 wurde im April eine Einladung zusammen mit Kollegen der Universität Wien an die Jinan University, Guangzhou sowie an das Nanjing Institute for Limnology & Geography, Nanjing, wahrgenommen.

Vorschau 2006 und Planung für 2007

Durch das Auslaufen zweier Projekte (CLIME, BMLFUW) sind die finanziellen Mittel der Algengruppe nun stark eingeschränkt. Weiters vermindert der mit dem Ende der Projekte verbundene Abgang zweier Mitarbeiterinnen (K. Teubner, S. Greisberger) die Arbeitskapazität auf die Hälfte. Kompensiert werden soll dies durch ein Anfang des laufenden Jahres beim FWF eingereichtes zweijähriges Projekt, in dem Photosyntheseraten als Funktion physikalischer Eigenschaften von Seen untersucht werden sollen. In diesem Projekt soll die momentane Anpassung und Effizienz von Planktongemeinschaften direkt im Gewässer mittels Fluoreszenz (FRRF) in unterschiedlichen Gewässertypen erfasst werden. Sofern das Projekt, in dem je eine Post-Doc-, Diplomanden- und technische Teilzeitkraft-Stelle eingeplant sind, genehmigt wird, sind auch Messungen photosynthetischer Parameter an Algenkulturen und Freilandmaterial im Labor geplant, sowie kurzfristige Messkampagnen bei bestimmten Wetterverhältnissen, Nachtmessungen und Analysen metalimnetischer Cyanobakterien-Populationen (Zusammenarbeit mit R. Kurmayer).

Vordringlich muss auch die Publikation des in den letzten Jahren angefallenen Datenmaterials sein. Dazu gehört neben der Veröffentlichung der im WRRL Projekt erarbeiteten Ergebnisse und Verfahren, besonders die Mitarbeit im Organisationskomitee der European Large Lakes Tagung 2006 in Estland. Bei dieser Tagung werden in Zusammenarbeit mit Kollegen anderer Institutionen vier zusammenfassende, einander ergänzende Vorträge über den Neusiedlersee gehalten werden. Die in Arbeit befindlichen Monographie über die Alte Donau, die in der Reihe ‚Aquatic Ecology‘ beim Verlag Kluwer-Springer erscheinen wird, muss bis Mitte 2006 abgeschlossen und editiert sein. Davor sollte bereits das Kapitel ‚Climate Impacts in Central Europe‘ für das oben erwähnte CLIME-Buch fertig gestellt sein.

Die Planung für das Jahr 2007 wird stark davon abhängen, ob das FWF-Projekt bewilligt wird oder nicht. Im ersten Fall wird dieses Jahr wesentlich von Messkampagnen geprägt sein, für die die Infrastruktur des Instituts, vor allem Boot, Auto und diverse Messgeräte, von wesentlicher Bedeutung ist. Im zweiten Fall ist volles Gewicht auf die Aufarbeitung und Veröffentlichung vorhandener Daten zu legen. Geplant sind mehrere Beiträge für den nächsten internationalen Limnologenkongress (SIL 2007) in Kanada.

A2. Phosphataufnahme und Informationsverarbeitung über die sich ändernde Phosphatzufuhr von Cyanobakterien

Bei der Interaktion von Algen mit ihrer Umgebung finden komplexe Informationsverarbeitungsprozesse statt, die wir experimentell und theoretisch behandelt haben (**G. Falkner**, mit R. Falkner, J. Schmidt und Kooperationspartner). Auf der experimentellen Schiene wurde die Anpassung der Blaualgen an sich ändernde Phosphatzufuhr untersucht, weil sich bei diesem Vorgang besonders gut die bei einer Informationsverarbeitung auftretenden Phänomene analysieren lassen. Die experimentellen Studien wurden mit der filamentösen Art *Anabaena variabilis* und der einzelligen Art *Anacystis nidulans* vorgenommen.

Die Informationsverarbeitung über die sich ändernde Phosphatzufuhr basiert auf einem dialektischen Zusammenspiel der Phosphataufnahmeaktivität der gesamten Population (oder Community im Freiland) mit den energetischen Eigenschaften des Phosphataufnahmesystems der einzelnen Zelle. Dabei werden Fluktuationen in der externen Phosphatkonzentration in einzelne Pulse zerlegt, bei denen nur während kurzzeitiger Erhöhungen der externen Phosphatkonzentration über einen Schwellenwert Phosphat aufgenommen wird. In den Perioden, in denen die externe Konzentration unter diesen Schwellenwert absinkt, kommt die Aufnahme zum Erliegen. Eine Informationsverarbeitung findet statt, wenn jede einzelne Zelle sich an die Konzentrationsänderungen anpasst, die aus der Aufnahmeaktivität der gesamten Community resultiert. Die Alge „erinnert“ sich dann an die in der Vergangenheit „erfahrenen“ Pulsmuster und stellt nicht nur ihr Aufnahmesystem, sondern auch ihr Wachstum auf die jeweiligen Muster ein (bei dieser Interpretation gehen wir davon aus, dass die „Erfahrung“ einer Umweltänderung mit der physiologischen Anpassung an diese Änderung einhergeht). Demnach konstituiert eine Alge sich in dem Maß auch selbst, in dem sie ein Bild der von ihr „erfahrenen“ Umweltänderungen (hier Nährstofffluktuationen) „konstruiert“ (dieses Bild weicht naturgemäß sehr stark von dem von Limnologen erfahrenen „Phosphatchemismus“ ab, wie schon ein kurzer Blick in die Lehrbücher dieses Metiers zeigt). Auf diese Weise wird eine Brücke zwischen der „Umwelterfahrung“ und einer organismischen Selbstorganisation geschlagen, und zwar so, dass das „Selbst“ der Erfahrung zum Ausgangspunkt einer theoretischen Analyse werden kann (siehe weiter unten).

Konkret beschäftigten wir uns im vergangenen Jahr weiterhin mit der zentralen Frage, wie die Pulsmuster in Beziehung zur Wachstumsvorgeschichte stehen müssen, damit es

überhaupt zu einer Informationsverarbeitung kommen kann. (Bei allen diesen Untersuchungen wurden ein und derselben Population immer die gleiche Phosphatmenge in unterschiedlichen Pulsmustern verabreicht). Frühere Untersuchungen hatten ja gezeigt, dass Pulse verschiedener Höhe (z.B. ein Puls á 10 μM im Vergleich mit 10 Pulsen á 1 μM) zu einem deutlich verschiedenen Anpassungsverhalten des Phosphataufnahmesystems führen. Hier konnte die Ausbildung verschiedener physiologischer Zustände einfach damit erklärt werden, dass während einer kurzzeitigen Exposition an eine erhöhte externe Konzentration verschieden hohe cytoplasmatische Phosphatkonzentrationen eingestellt werden, an die sich dann die ATP-Synthase unterschiedlich anpasst. Dies erfolgt durch entsprechende Einstellung der H^+/ATP Stöchiometrie und führt naturgemäß zu verschieden hohen cytoplasmatischen Phosphatspiegeln, die durch die jeweils entstandenen adaptiven Eigenschaften der ATP-Synthase selbst-referenziell aufrecht erhalten werden.

Die im vorigen Jahr durchgeführten Studien mit *Anabaena* und *Anacystis* haben jedoch gezeigt, dass Blaualgen in der Lage sind, zwischen zwei verschiedenen Mustern zu unterscheiden, in denen die Pulse gleich hoch, aber in verschiedener Reihenfolge „erfahren“ werden. Diese neuen Befunde ließen sich nicht mehr mit dem oben erwähnten Modell einer Informationsspeicherung erklären. Sie könnten aber dadurch zustande kommen, dass bei der Anpassung an sich ändernde Phosphatkonzentrationen eine intrazelluläre „Kommunikation“ von Energie-konvertierenden Subsystemen stattfindet, in deren Verlauf sich die Algenzelle auf unterschiedliche Weise differenziert.

Derzeit arbeiten wir an einer Überprüfung dieser Hypothese mit einem von Kristjan Plaetzer und uns entwickelten Matlab-programm, mit dem die bei Anpassungsvorgängen auftretenden Phänomene auf der Basis der Netzwerk-Thermodynamik simuliert werden. Zu diesem Zweck musste allerdings unser Modell der mikrobiellen Informationsverarbeitung erweitert werden (Plaetzer, K., Thomas, S. R., Falkner, R. & Falkner, G. 2005). Die Erweiterung war deshalb nötig geworden, weil sich die oben angeführten neuen Beobachtungen mit der bisherigen Version nicht mehr befriedigend analysieren ließen. In der neuen Version kommunizieren die Subsysteme während der Simulation des Aufnahmeprozesses über die Ergebnisse ihrer eigenen Simulation. Bei diesem Vorgang verändern sie sich und modifizieren den Aufnahmeprozess. Eine Analogie mit dem experimentell gefundenen Aufnahmeverhalten gibt so indirekt Hinweise auf eine etwaige Kommunikation einer intrazellulären Community von energiekonvertierenden Subsystemen.

Mit Hilfe dieses neuen Modells können wir nun die von uns im Verlauf des letzten Vierteljahrhunderts gemachten experimentellen Beobachtungen über die komplexen Manifestationen des Phosphataufnahmesystems auf der Basis einer neuen Systemtheorie interpretieren. Diese Theorie, die sich mit der Beziehung selbst-referenzieller Systeme zu ihrer Umwelt befasst, ist ursprünglich von den Neurobiologen Maturana und Varela konzipiert worden. Sie wurde dann von dem Soziologen Luhmann zu einer „Supertheorie“ mit universalistischen Ansprüchen ausgebaut, wobei auch Elemente der Whitehead'schen Philosophie der Organismen berücksichtigt wurden. Bekanntlich beschäftigt sich diese Theorie mit Vorgängen, die im Inneren eines Systems auftreten, wenn dieses *seine* Umwelt beobachtet. Demnach bewirkt jede Erfahrung einer Umweltänderung eine spezifische Differenzierung des Systems in Elemente, die ihrerseits als Subsysteme innerhalb des größeren Systems operieren und sich dabei differenzieren. Die Differenzierung geht so vor sich, dass bei der Beobachtung der Umwelt durch ein System die Community der Elemente Informationen über das Verhältnis System/Umwelt kommuniziert und in der Folge die Relation zwischen den Elementen verändert wird. Die von uns bearbeiteten Kommunikationsvorgänge des zellulären Systems, die auf einer ontologischen Differenz adaptiver Ereignisse beruhen, entsprechen in charakteristischen Eigenschaften der Kommunikation selbst-referenzieller Systeme über ihre Umwelt. Diese Analogie erlaubt, die neuen Ansätze über das Verhältnis System/Umwelt in die Pflanzenphysiologie einzubringen und auf diese Weise die Grundlage für eine moderne „organismische Biologie“ zu schaffen, in der die Erfahrung der Umwelt ständig von neuem die Organismen konstituiert. Es ist geplant, die Ergebnisse unserer Arbeit und deren erkenntnistheoretische Implikationen auf der im Juli 2006 in Salzburg stattfindenden „International Whitehead Conference“ vorzustellen, die sich mit der Entwicklung einer neuen Philosophie der Organismen beschäftigt (siehe <http://www.sbg.ac.at/whiteheadconference>).

An einer Synthese der oben dargestellten systemtheoretischen Vorstellungen mit den von D. Danielopol entwickelten Ideen über die Interaktion von Grundwasserorganismen mit ihrer Umgebung (s. Kap. 2.3 D) wird gearbeitet.

A3. Ökophysiologie und Diversität von Picocyanobakterien

Die Untersuchungen der ökophysiologischen Diversität genetisch nahe verwandter Stämme einzelliger Picocyanobakterien des Süßwassers (T. Weisse, M. Moser & P. Stadler) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. C. Callieri (CNR, Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, in Pallanza/Verbania, Italien) sowie mit Mag. J. Jezberová (Hydrobiologisches Institut der Tschechischen Akademie der Wissenschaften in Budweis) fortgesetzt (Callieri et al. 2005) und eine diesbezügliche Diplomarbeit abgeschlossen (M. Moser). Fressversuche (Grazingexperimente) wurden mit *Poterochromonas* sp. als Modellorganismus für einen selektiv fressenden Flagellaten und dem unselektiv filtrierenden Ciliaten *Vorticella similis* in Mondsee durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen stamm- und gruppenspezifische Unterschiede sowohl seitens der Picocyanobakterien als auch ihrer Fressfeinde. Der Flagellat bevorzugte in Selektionsexperimenten, in denen verschiedene potenzielle Futterorganismen in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen gleichzeitig angeboten und durchflusscytometrisch gemessen wurden, die Phycocyanin(PC)-reichen Stämme sowohl gegenüber den Phycoerythrin(PE)-reichen Stämmen als auch gegenüber heterotrophen Bakterien. Der Ciliat zeigte hohe Fress- und Wachstumsraten mit zwei PC-reichen Stämmen aus dem Bodensee und dem Mondsee, während 4 weitere, tschechische PC-reiche Stämme nicht gefressen wurden. Weiters beeinflusste die Adaptation an unterschiedliche Lichtbedingungen nicht nur die Primärproduktion und den Pigmentgehalt der Cyanobakterien, sondern auch die Fressraten des mixotrophen Flagellaten *Poterochromonas* sp.. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die bisher von uns verwendeten genetischen Marker (16S rRNA, cpcBA-IGS; Crosbie et al. 2003a, 2003b) die große ökophysiologische Diversität der Picocyanobakterien der Süßwasserseen nicht ausreichend widerspiegeln.

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

Das Projekt soll mit der Veröffentlichung der im Vorjahr erzielten Ergebnisse abgeschlossen werden.

A4. Genetische Diversität der Toxinproduktion bei Cyanobakterien

Pflanzliche Mikroorganismen verblüffen durch ihre Vielfalt in der Produktion an kleineren bioaktiven Peptiden, z.B. Microcystin, Anabaenopeptin, Aeruginosin (sog. Cyanopeptide). Die Forschung in diesem Arbeitsbereich hat das übergeordnete Ziel, die Evolution dieser komplexen Synthesewege sowie die ökologischen Einflüsse auf diese Vielfalt zu verstehen. Dieses Verständnis ist für die menschliche Nutzung von Wasser aus Oberflächengewässern notwendig, jedoch sind die Mechanismen, die zur Modifikation bzw. Restrukturierung bestehender Synthesewege führen, nahezu unbekannt. Durch die Verknüpfung von genetischer Forschung mit ökologischer Forschung sollen evolutionäre Mechanismen sowohl auf molekularer Ebene als auch auf der Ebene von aquatischen Ökosystemen herausgearbeitet werden. Dieser Schwerpunkt wurde im Zuge von drei über Drittmittel finanzierten Forschungsprojekten (FWF, EU, CyanoBiotech GmbH), sowie einer Diplomarbeit des IPGL Kurses (Quian Liu) weitergeführt (R. Kurmayer, mit G. Christiansen, J. Schmidt, M. Werndl, G. Roidmayr und Examenskandidatinnen).

In Berichtsjahr wurden

- (1) Fortschritte hinsichtlich der Unterscheidung von adaptiver Selektion vs. neutraler oder (purifying selection) Selektion auf einzelne Gene der Synthetase des toxischen Peptids Microcystin erzielt sowie Rekombinationsereignisse erstmals quantifiziert (FWF-P18185);
- (2) Die genotypische Zusammensetzung von Populationen des rot pigmentierten und filamentösen Cyanobakteriums *Planktothrix rubescens* in acht Seen der Alpen erfasst (FWF-P18185);
- (3) Die Verbreitung von bioaktiven Cyanopeptiden in Populationen von *P. rubescens* in Europa bestimmt (EU-Netzwerk "PEPCY").
- (4) Die Verbreitung von Aeruginosin-, Anabaenopeptin-, und Microcystingenotypen in zwei Populationen von *P. agardhii* und *P. rubescens* quantifiziert (EU-Netzwerk "PEPCY").
- (5) Stämme des Cyanobakteriums *Planktothrix* auf die wirtschaftliche Nutzung von bioaktiven Naturstoffen überprüft (CyanoBiotech GmbH)

1) Microevolution der Synthese des toxischen Peptids Microcystin

Im Zuge des FWF-Projekts P18185 werden phylogenetische Analysen eingesetzt, um Mechanismen der Evolution der Gene der Microcystin-Synthese herauszuarbeiten. Das Verhältnis von nicht-synonymen zu synonymen Substitutionsraten (d_N/d_S) in proteinkodierenden Genen ist allgemein ein effektives Mittel, um natürliche Selektion in ihrer

Wirkung zu beschreiben und eventuelle Funktionsänderungen zu erkennen (Mark Ridley 2004: Evolution. Blackwell). Synonyme Substitutionen werden aufgrund des degenerierten genetischen Codes nicht in Proteine übersetzt, nicht-synonyme Substitutionen resultieren hingegen in einer veränderten Aminosäuresequenz von Proteinen. Substitutionen von $d_N > d_S$ werden als Zeichen positiven Selektionsdrucks im Zuge einer Adaptationsphase, jene von $d_N = d_S$ als Zeichen neutraler Evolution und jene von $d_N < d_S$ als Zeichen von negativer "purifying" Selektion (bei unveränderter Funktion) gewertet. Diese Raten können für einzelne Verwandtschaftslinien am besten unter Verwendung der Maximum Likelihood Methode berechnet werden, welche die zur Berechnung eines phylogenetischen Stammbaums nötigen Parameter (Substitutionsrate, Transversionsrate) so optimiert, dass die erklärte Wahrscheinlichkeit maximal wird (Ziheng Yang 1997, PAML, Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood, Computer Applications in Biosciences 13:555).

Die phylogenetische Analyse von 25 Genotypen einer Domäne des *mcyB* Gens der Microcystin Synthetase zeigt, dass nur einzelne Genotypen erhöhte d_N/d_S Raten aufweisen. Die sequenzierte Domäne (1451bp) ist für die Aktivierung der variablen Aminosäuren Arginin (Arg), Homotyrosin (Hty) und Leucin (Leu) im Zuge der Microcystin-Synthese an der Position 2 des Microcystinmoleküls verantwortlich (Kurmayer et al. 2005). Innerhalb der 49 untersuchten Stämme wurde ein einziger Genotyp (B, 11 Stämme) gefunden, der Microcystine ohne Arg, dafür aber mit Hty und Leu produziert und gleichzeitig eine Rate von $d_N > d_S$ zeigt (Abb. 5). Ein zweiter Genotyp (C, 2 Stämme) produziert Microcystin, das nur Arginin enthält. Alle anderen Genotypen zeigen $d_N \leq d_S$, d. h., dass nicht-synonyme Substitutionen in der Regel entweder neutral sind oder selektiv unterdrückt werden.

Im letzten Jahresbericht wurde bereits von Rekombinationen ganzer Enzymdomänen und daraus resultierenden Veränderungen in der Microcystin-Synthese berichtet (Kurmayer et al. 2005, Microbiology 151:1525). In diesem Jahr konnte die Zahl von Rekombinationsereignissen innerhalb der untersuchten 25 Genotypen für eine Domäne des *mcyB* Gens (siehe Abb. 5) mit Hilfe eigens dafür entwickelter Rechenprogramme quantifiziert werden (S.A. Sawyer, GENECONV, A computer package for the statistical detection of gene conversion. Department of Mathematics, Washington University in St. Louis). Innerhalb dieser Enzymdomäne des *mcyB* Gens (1451 bp) wurden >120 putative Rekombinationsereignisse (121-1379 bp) festgestellt, und zwar sowohl innerhalb einzelner Arten (*Planktothrix rubescens*) als auch zwischen den Arten (*P. agardhii*). Dies erklärt, warum beide Arten bezüglich dieser Domäne idente Genotypen besitzen (z.B. Abb. 5).

Die hohe Häufigkeit von Rekombinationen zeigt, dass der Microcystin-Synthetase-Gencluster, der sich insgesamt aus 9-10 Genen zusammensetzt, eher eine mosaikartige Struktur als eine einheitliche Vererbungslinie hat und auch relativ kleine DNA Fragmente (< 1000 bp) regelmässig intraspezifisch ausgetauscht werden.

In diesem Jahr wurde auch die Publikation über bis dato unbekannte „Transposons“ (springende Gene) abgeschlossen, die ihre Position spontan innerhalb des Erbguts einer Zelle verändern und dadurch genetische Veränderungen auslösen können (Christiansen et al. 2006, Applied and Environmental Microbiology 72:117). Diese Transposons, die im Gencluster der Microcystin-Synthase sitzen, können in Gewässerproben regelmäßig über Jahre hinweg nachgewiesen werden. Von derartigen Transposons ist zum Beispiel bekannt, dass sie Antibiotikaresistenzen horizontal innerhalb von pathogenen Bakterien transportieren und so die rasche Resistenzbildung von Krankheitserregern gegen Medikamente ermöglichen. Es ist möglich, dass diese Transposasen ebenfalls zu einer relativ raschen Evolution der Microcystin-Synthese unter sich verändernden Umweltbedingungen beitragen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass derartige multifunktionale Enzyme, die neben Cyanobakterien auch in Bakterien und Pilzen sehr häufig sind und zu den größten Enzymen in der Zelle zählen, einer kontinuierlichen Modifikation unterliegen und die Microcystin-Synthetase sicher zu den am stärksten evolvierenden Genclustern bei Bakterien zählt.

2) Microcystinsynthese in isolierten Populationen von Cyanobakterien

Allgemein erfordert neutrale Evolution die genetische Isolation von Genotypen, zum Beispiel durch geographische Barrieren. Nun ist die Frage der geographisch bedingten Isolierung bei Prokaryoten heftig umstritten, weil die Wissenschaft schon lange davon ausging, dass es bei Prokaryoten aufgrund ihrer Kleinheit keine effektiven Verbreitungshindernisse gibt. Gegen diese Annahme spricht, dass neue strukturelle Varianten von Microcystin nur bei Stämmen von *Planktothrix* aus bestimmten Gewässern beobachtet wurden (Abb. 6).

Um die Zeiträume von auftretender geographischer Isolation genauer zu untersuchen wurden einzelne Genotypen mit Hilfe von sogenannten Restriktionsenzymen direkt in Gewässerproben aus acht Seen der Alpenregion quantifiziert. Solche Enzyme schneiden spezifisch an palindromen DNA-Sequenzen und können so einzelne Allele erkennen. Dazu wurden von Gewässerproben aus den Jahren 2001-2005 sogenannte „Gen-Bibliotheken“ angelegt und diese mit Hilfe von Restriktionsenzymen quantitativ auf das Vorkommen von bestimmten Genotypen untersucht. Tatsächlich unterscheiden sich räumlich getrennte Populationen des Cyanobakteriums *P. rubescens* über Jahre hinweg qualitativ und quantitativ in ihrer Genotypenzusammensetzung. Zum Beispiel konnten in den Jahren 2001 und 2002 im Schwarzensee ausschliesslich Genotypen des Typs VI+II nachgewiesen werden, die Microcystin-Varianten mit Homotyrosin und Leucin produzieren, während in allen anderen Gewässern Genotypen des Typs I+I auftraten, die Microcystinvarianten mit Arginin synthetisieren (Abb. 7). Diese Ergebnisse zeigen, dass Isolation von Cyanobakterien selbst zwischen Gewässern auftritt, die nur wenige Kilometer voneinander entfernt sind und eine derartige Isolation möglicherweise zur Entstehung neuer Strukturvarianten beiträgt.

3) Verbreitung bioaktiver Peptide in Populationen von *Planktothrix rubescens* in Europa

In der gemäßigten Zone der nördlichen Hemisphäre zählen Cyanobakterien der Gattungen *Planktothrix* und *Microcystis* zu jenen Algen, die bei der Trinkwasseraufbereitung und Freizeitnutzung die größten Probleme und Kosten verursachen. In den letzten Jahren wurde bekannt, dass Cyanobakterien zusätzliche sekundäre Naturstoffe produzieren, die ebenfalls eine hohe Bioaktivität aufweisen (sogenannte Cyanopeptide). Die Häufigkeit dieser Cyanopeptide in europäischen Gewässern ist gänzlich unbekannt. Es ist daher ein Ziel des laufenden EU-Netzwerks "PEPCY" (<http://www.pepcy.de/>) hierzu Informationen zu liefern und diese in Form von allgemein zugänglichen Datenbanken über das Umweltbundesamt in Berlin verfügbar zu machen. Dieses Arbeitspaket wird von Mondsee aus koordiniert. Dazu wurden nach der bereits im Jahr 2004 publizierten Methode (Kurmayer et al., Environm. Microbiol. 6:831, siehe Jahrsbericht 2003) eine große Zahl (mind. 100) von Einzelfilamenten der Art *P. rubescens* aus europäischen Gewässern (Österreich, Deutschland, Schweiz, Italien,

Populationen deutlich im Auftreten einzelner Peptide und einzelne Filamente können statistisch signifikant durch den Einsatz multivariater Analyseverfahren (Diskriminanzanalyse, Statistica v7.1) aufgrund ihrer Peptidzusammensetzung ihrem „Heimat“-Gewässer zugeordnet werden. Zum Beispiel trennen die Peptide Anabaenopeptin K (m/z 917), Anabaenopeptin G (m/z 910) und Cl-Aeruginosin 126B (m/z 749) deutlich die Filamente aus dem Miedwie See (PL), dem Hallwiler See und dem Zürichsee (CH) von allen anderen Filamenten ab (Welker und Kurmayer in Vorbereitung). Diese Ergebnisse würden eine genetisch divergierende Entwicklung zwischen voneinander räumlich getrennten Populationen implizieren und bedeuten, dass geographische Unterschiede in der Synthese bioaktiver Peptide bei einzelnen Arten messbar sind und wichtige Anhaltspunkte für die zeitliche und durch Umweltveränderungen beeinflusste Entstehung neuer toxischer Genotypen liefern.

4) Verbreitung von Anabaenopetin-, Aeruginosin- und Microcystin-Genotypen in Populationen von *Planktothrix* spp.

Durch Isolation einzelner DNA-Fragmente von Peptidsynthetasen und entsprechende Mutagenese (sog. Knockout-Experimente) bzw. der genetischen Manipulation einzelner Enzymdomänen (Sielaff et al. 2006: Idrugs 9, pp. 119-127) konnten neben der Microcystin-Synthase auch die Peptidsynthetasen für Aeruginosin und Anabaenopeptin in *Planktothrix* identifiziert werden (Abb. 8, Guntram Christiansen). Im Zuge der Dissertation von Eva Schober wurden für das EU-Netzwerk PEPCY die Häufigkeiten dieser Genotypen in Populationen von *Planktothrix* mittels quantitativer PCR-Technik erstmals bestimmt (die quant. PCR-Technik wurde bereits im Jahresbericht 2003 beschrieben). Die Jahresmittelwerte aus 2003 und 2004 zeigen, dass die Häufigkeiten der Microcystin- und Aeruginosin-Genotypen bei *P. rubescens* im Mondsee bei 81 ± 4 % (1 SE) bzw. 40 ± 3 % liegen und diese statistisch signifikant höher sind als die entsprechenden Häufigkeiten bei *P. agardhii* im Wannsee, Berlin (42.3 ± 5.5 % für Microcystin, 32.8 ± 5 % für Aeruginosin). Dagegen ist der Anteil der Anabaenopeptin-Genotypen im Mondsee ($92 \pm 9\%$) und im Wannsee ($97 \pm 12\%$) sehr ähnlich. Diese Ergebnisse zeigen, dass Populationen von *P. agardhii* und *P. rubescens* durch den Anteil einzelner Peptid-Genotypen charakterisiert werden können.

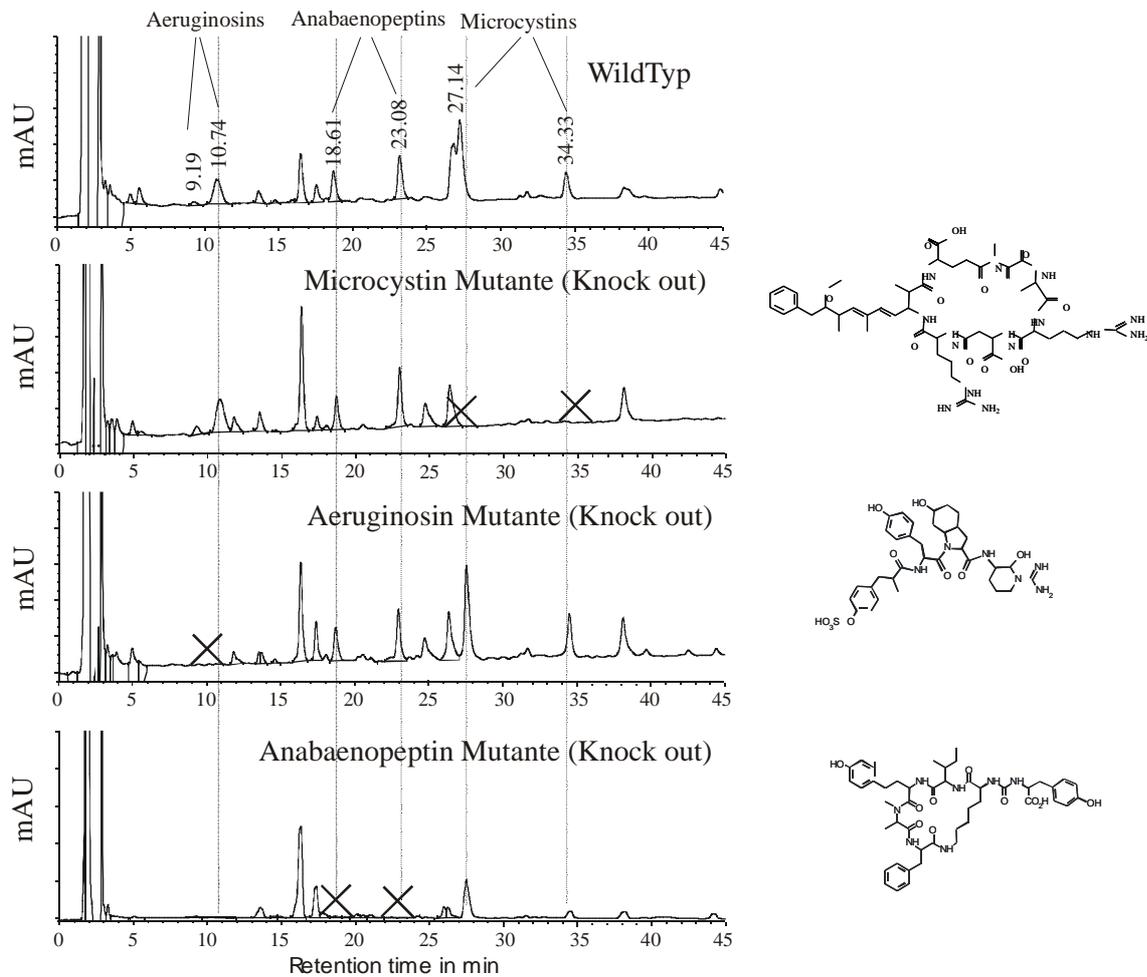


Abb. 8. Quantifizierung von Peptiden im Stamm CYA126-8 (*Planktothrix agardhii*) mittels Säulen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie. Aus diesem Stamm wurden drei Peptidsynthetasen isoliert und diese mittels homologer Rekombination und Einsatz einer Chloramphenicol-Resistenz-Kassette gentechnisch manipuliert und ausgeschaltet (G. Christiansen). MAU= milli Absorbance Units (dimensionslos Einheiten).

5) Wirtschaftliche Nutzung von bioaktiven Naturstoffen

In dieser Pilotstudie wurden 100 am Institut aus Gewässern der Alpen isolierte und kultivierte Stämme von *Planktothrix* spp. mit chromatographischen und massenspektrometrischen Verfahren untersucht und diese Stämme hinsichtlich ihrer Peptide charakterisiert. Einzelne Stämme wurden im Zweihundert-Liter-Maßstab durch die Firma CyanoBiotech (<http://www.cyano-biotech.com/>) kultiviert und aus 100g Trockenmasse bis zu 240 mg Substanz einzelner pharmakologisch interessanter Peptide geerntet. Trotz Problemen, die bei Massenkultivierung durch wiederholte Kontaminationen auftreten, sind die produzierten Stoffmengen mit den Mengen anderer Cyanobakterien vergleichbar und *Planktothrix* könnte als Naturstoffproduzent eingesetzt werden (Sielaff et

al. 2006). Einzelne Stämme wurden aufgrund ihrer Peptidzusammensetzung intensiv kultiviert und aufgereinigte Peptide für pharmakologische Tests bereitgestellt.

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

Das EU-Netzwerk "PEPCY" (Toxische und bioaktive Peptide in Cyanobakterien) wird im Juni 2006 beendet. Vom 9-11 Mai 2006 wird eine Schlusskonferenz zur praktischen Umsetzung der Ergebnisse am Umweltbundesamt (Dr. Ingrid Chorus) in Berlin stattfinden, wo Mondsee aufgrund der Leitung des Arbeitspakets „Regulation und Monitoring des Auftretens von Cyanopeptiden in Gewässern“ mit der Beteiligung von 10 europäischen Arbeitsgruppen eine tragende Rolle zukommt. Die Dissertation von Eva Schober (Univ. Wien) zum Vorkommen und der saisonalen Stabilität von Peptid-Genotypen mit Hilfe der quantitativen PCR-Technik soll fertiggestellt werden.

Die praktische Arbeit der nächsten beiden Jahre wird im wesentlichen durch das FWF-Projekt P18185 „Mikroevolution der Toxinsynthese bei Cyanobakterien“ (Laufzeit Juli 2005 – Oktober 2007) bestimmt (R. Kurmayer, G. Christiansen, M. Werndl, C. Molitor, V. Obermayer). Dieses Projekt umfasst einerseits phylogenetische Analysen zur Rolle von Transposons bzw. zum Abbau inaktiver und nicht mehr benötigter Erbanlagen und deren zeitliche Einordnung. Außerdem soll die Rolle von springenden Genen bzw. dem Abbau von inaktiven Genen untersucht werden (Diplomarbeit Carole Molitor, Univ. Innsbruck). Andererseits erfolgen seit Herbst 2005 die regelmäßige Beprobung von Zuflüssen zur Verbreitung von Genotypen sowie die Untersuchung von mehr als zehn Seen der Alpenregion hinsichtlich der Häufigkeit von Mutationen und anderen Rekombinationsereignissen (Michael Werndl, Technische Assistenz). Die Mutationen werden wiederum mit Hilfe quantitativer PCR-Technik analysiert und statistisch bezüglich verschiedener Umweltfaktoren analysiert (Diplomarbeit Veronika Obermayer, Univ. München). Die Translation der *mcy* Gene soll durch den immunologischen Nachweis der für die Microcystin-Synthese verantwortlichen Enzyme untersucht werden (Guntram Christiansen, Post-Doc).

Weiters sollen ein bereits genehmigtes ÖAAD Doktorats-Stipendium mit einer Laufzeit von drei Jahren zum Thema "Molecular and chemical characterisation of cyanobacteria in Ugandan freshwaters" (William Okello, Univ. Wien) im März sowie eine Diplomarbeit im Zuge des IPGL- Kurses (Guillermo Leon Penagos Garcia) im September beginnen.

A5. Untersuchungen zur Ökologie planktischer Süßwasserbakterien

Die Forschungsarbeiten über die Ökologie der Süßwasserbakterien (**M. Hahn**, mit M. Pöckl, Q. Wu und M. Tarao) widmeten sich im Berichtsjahr im wesentlichen drei Schwerpunkten: (1) Die Arbeiten zur ökologischen Bedeutung der Mikrodiversität bei pelagischen Süßwasserbakterien, und insbesondere bei *Polynucleobacter* Bakterien wurden fortgesetzt, (2) ein Genomprojekt wurde akquiriert und initiiert, und (3) intensive Untersuchungen zum Fraßschutz bei pelagischen Actinobakterien wurden durchgeführt. Alle drei Forschungsschwerpunkte wurden in internationaler Zusammenarbeit und größtenteils im Rahmen von Drittmittelprojekten durchgeführt.

1) Ökologische Bedeutung der Mikrodiversität bei Bakterien

Als Modellorganismen für die Untersuchung der ökologischen Bedeutung der Mikrodiversität („intraspezifische“ Diversität) bei pelagischen Bakterien des Süßwassers wurde die *Polynucleobacter*-Gruppe ausgewählt. Diese monophyletische zu den *Betaproteobacteria* gehörende Bakteriengruppe zeichnet sich durch eine kosmopolitische Verbreitung (auf allen Kontinenten und in allen Klimazonen) sowie durch das Auftreten mit vergleichsweise großen Abundanzen im Plankton von Seen und großen Flüssen aus. Die *Polynucleobacter*-Gruppe kann in vier artähnliche Untergruppen (Subcluster A bis D) untergliedert werden (Hahn, 2003), und nur in einer dieser Untergruppen findet sich mit *Polynucleobacter necessarius* eine beschriebene Art. Diese Art wurde für einen obligaten Endosymbionten des benthischen Ciliaten *Euplotes aediculatus* errichtet. Seit einigen Jahren liegen vage Hinweise auf die Existenz von freilebenden Vertretern der *Polynucleobacter*-Gruppe vor, die nun von uns mittels fluoreszierender in situ Hybridisierung (FISH) bestätigt werden konnten (Hahn et al. 2005). Vertreter dieser ökologisch wichtigen Bakteriengruppe konnten von uns vor wenigen Jahren erstmals kultiviert werden (Hahn 2003), was eine wichtige Voraussetzung für die weitere Erforschung dieser Bakteriengruppe war.

Die im Jahre 2003 begonnene Entwicklung von molekularen Werkzeugen zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von *Polynucleobacter*-Gemeinschaften wurde im Berichtszeitraum weitgehend abgeschlossen. Insbesondere die Entwicklung von Cluster- und Subcluster-spezifischen FISH-Sonden ermöglichte tiefe Einblicke in das Vorkommen und die Diversität von *Polynucleobacter*-Gemeinschaften. In einem ersten Schritt wurde die Struktur und Dynamik der *Polynucleobacter*-Gemeinschaften in drei ökologisch äußerst unterschiedlichen Habitaten über Zeiträume von jeweils einem Jahr verfolgt (Abb. 9).

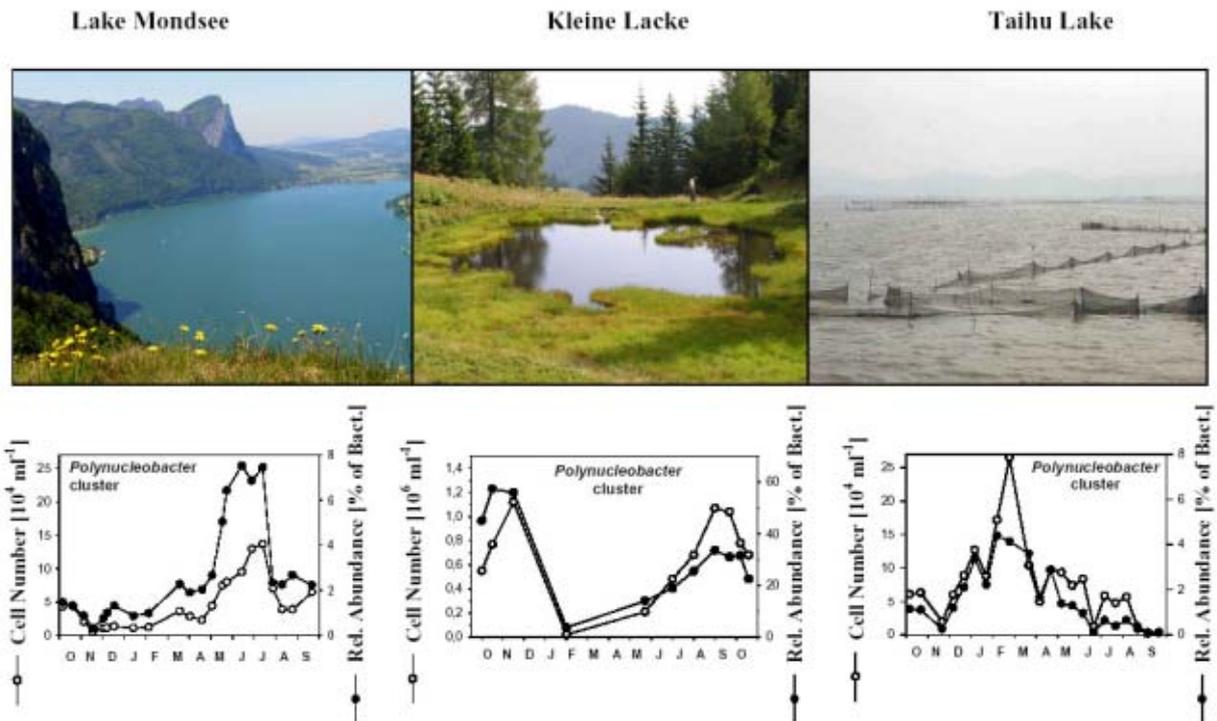


Abb. 9. Dynamik der *Polynucleobacter*-Gemeinschaften in einem oligo-mesotrophen See (Mondsee), einem dystrophen Weiher (Kleine Lacke) und in einem hypertrophen Teil des im subtropischen China gelegenen Lake Taihu (aus Hahn et al., 2005 und Wu and Hahn, in press).

Für diese Untersuchungen wurde der tiefe, oligo-mesotrophe Mondsee, ein kleiner dystropher Weiher (Kleine Lacke) in den Alpen (1300 m.ü.d.M) und der subtropische, flache, eu- bis hypertrophe Lake Taihu in China ausgewählt. Die drei Gewässer unterscheiden sich in einer großen Zahl von ökologisch wichtigen Charakteristika. Die wichtigsten Unterschiede finden sich in der Größe, in der Trophie, im pH-Wert, im Vorhandensein und der Dauer der Eisbedeckung und im Gehalt an Huminstoffen. In der Spitze trugen *Polynucleobacter*-Bakterien in diesen Gewässern 60% (Kleine Lacke), 8% (Mondsee) und 4% (Lake Taihu) zur Gesamtbakterienzellzahl bei (Abb. 9). Auffällig war, dass die stärkste Entwicklung der *Polynucleobacter*-Bakterien in den drei Gewässern zu völlig unterschiedlichen Jahreszeiten stattfand (Abb. 9). Im Mondsee konnte die Wiederholung des in Abb. 9 dargestellten saisonalen Musters in drei aufeinanderfolgenden Jahren (2001-2003) beobachtet werden (siehe Jahresbericht 2004) und auch für die Kleine Lacke konnten Hinweise auf die Wiederholung der herbstlichen *Polynucleobacter* Blüte gefunden werden (Abb. 9 und nicht publizierte Daten). Durch die Anwendung der Subcluster-spezifischen FISH-Sonden konnte gezeigt werden, dass die drei untersuchten Habitate sich auch in der Struktur der *Polynucleobacter* Gemeinschaften

stark unterschieden (Abb. 10). So konnten in den beiden Seen drei der vier *Polynucleobacter* Subcluster nachgewiesen werden (Abb. 10; Wu und Hahn, in press), in dem untersuchten dystrophen Teich konnte jedoch nur das Subcluster C nachgewiesen werden (Abb. 1; Hahn et al., 2005).

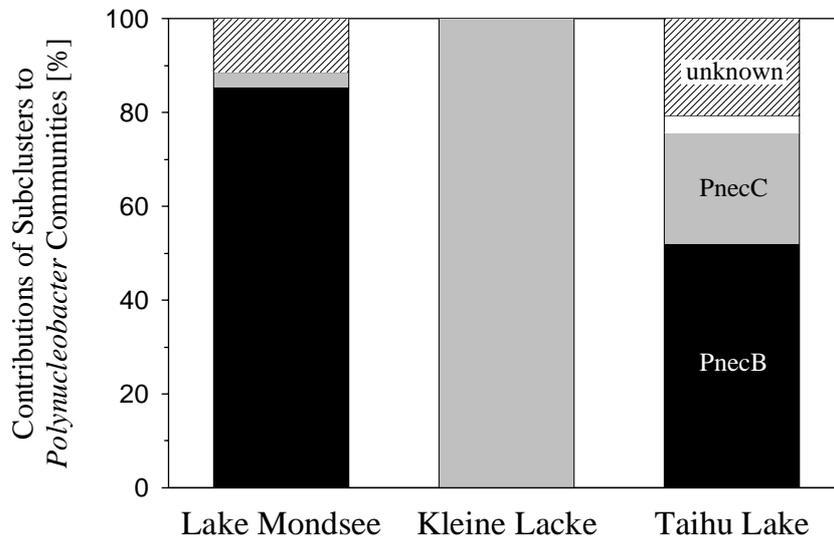


Abb. 10. Struktur der *Polynucleobacter*-Gemeinschaften in drei untersuchten Habitaten. Dargestellt ist die durchschnittliche, Subcluster-spezifische Zusammensetzung der drei über einen Zeitraum von einem Jahr untersuchten *Polynucleobacter*-Gemeinschaften. PnecB=Subcluster B; PnecC= Subcluster C, PnecD= Subcluster D. (aus Wu and Hahn, in press)

Die Mikrodiversität der Subcluster-C-Population in der Kleinen Lacke wurde mit Kultivierungs-unabhängigen und mit Kultivierungsmethoden (Hahn et al., 2004) untersucht. Zum einen wurden die 16S rRNA Gene und die 16S-23S ITS der *Polynucleobacter*-Bakterien mittels Subcluster-C-spezifischer PCR-Primern amplifiziert, kloniert und sequenziert. Andererseits wurden *Polynucleobacter*-Bakterien kultiviert und nachfolgend durch Sequenzierung des 16S rRNA Gens und der ITS charakterisiert und durch genetische Fingerabdrücke (RAPD und anderer Verfahren) typisiert. Es zeigte sich, dass die gesamte *Polynucleobacter*-Gemeinschaft zum Zeitpunkt der Untersuchung nur durch drei ribosomale Genotypen (Genotyp 1 bis 3) gebildet wurde (Abb. 11). Sowohl in der mit kultivierungsunabhängigen Methoden angelegten Genbibliothek sowie in der angelegten Stammsammlung konnten nur diese drei ribosomalen Genotypen nachgewiesen werden (Hahn et al. 2005). Die Genotypisierung der kultivierten Stämme mittels fünf verschiedener Verfahren (genetische Fingerabdrücke) erlaubte keine weitere Differenzierung der Stämme desselben ribosomalen Genotyps. Dies deutet darauf hin,

dass die untersuchte *Polynucleobacter*-Gemeinschaft der Kleinen Lacke hauptsächlich oder ausschließlich von drei Stämmen (Klonen) gebildet wurde. Die quantitative Analyse der Genbibliothek deutet darauf hin, dass ca. 84% der *Polynucleobacter*-Gemeinschaft und ca. 50% der gesamten Bakterioplanktongemeinschaft der Kleinen Lacke (Abb. 12) durch nur einen Stamm (Genotyp 1, Abb. 11) gestellt wurde. Warum dieser Stamm zum Zeitpunkt der Untersuchung das untersuchte Habitat so außerordentlich dominierte ist noch unverständlich.

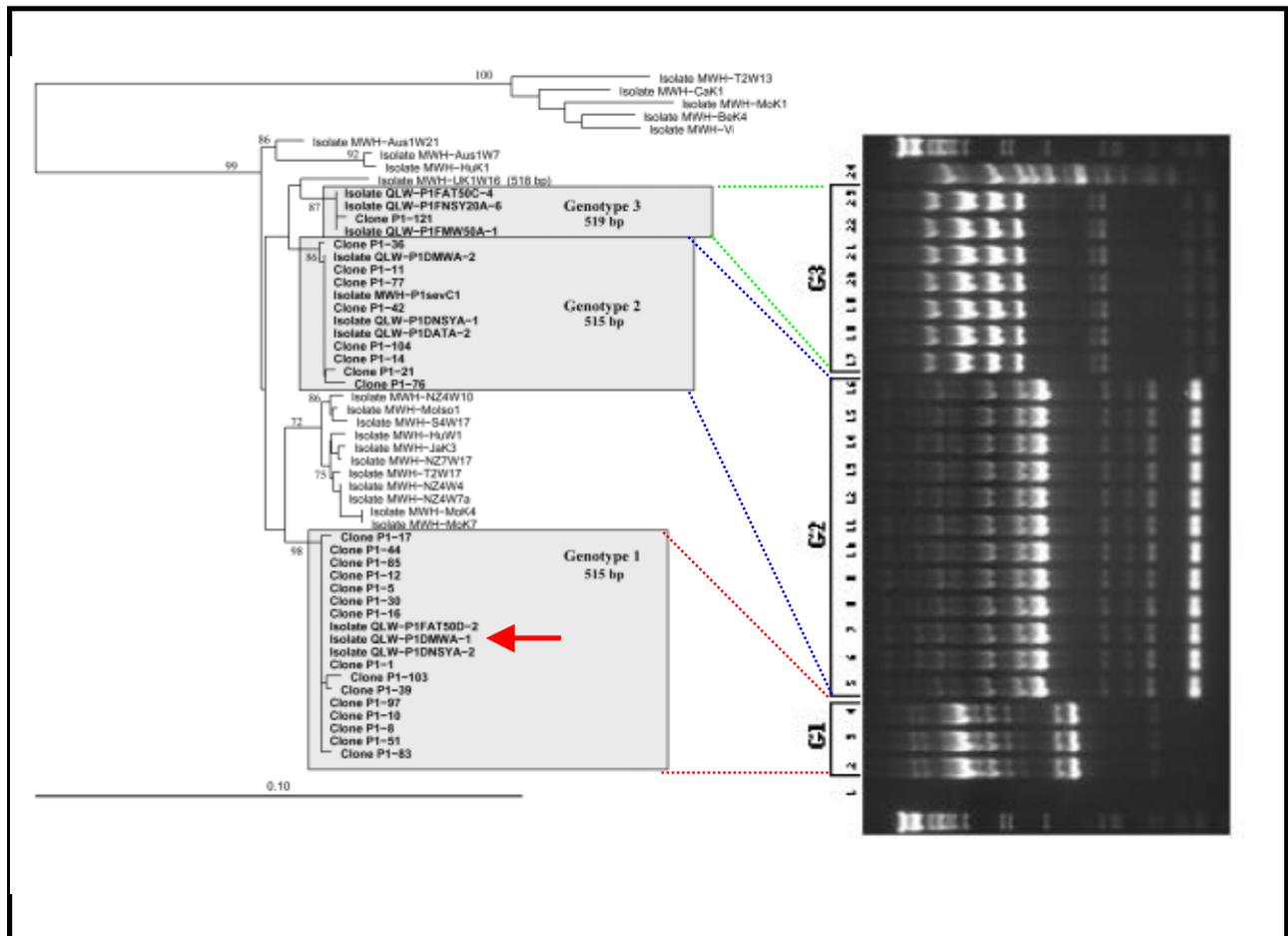


Abb. 11. Mikrodiversität der *Polynucleobacter* Subcluster C Population in der dystrophen Kleinen Lacke. Links ist die ribosomale Diversität (16S-23S ITS-Sequenzen) dargestellt. Die drei detektierten ribosomalen Genotypen (Genotypen 1 bis 3) sind durch graue Boxen dargestellt. Die innerhalb der Boxen vorhandenen Sequenzpolymorphismen bei den klonierten Sequenzen sind auf PCR-Artefakte zurück zuführen (siehe Hahn et al., 2005). Rechts sind die genetischen Fingerabdrücke (Methode: RAPD) der kultivierten Vertreter der drei ribosomalen Genotypen dargestellt. (Aus Hahn et al., 2005).

Interessanterweise ist dieser ribosomale Genotyp bisher nur aus der Kleinen Lacke bekannt. Die weit über 100 *Polynucleobacter*-Stämme, die bisher von uns aus anderen Gewässern isoliert wurden, gehören anderen Genotypen an.

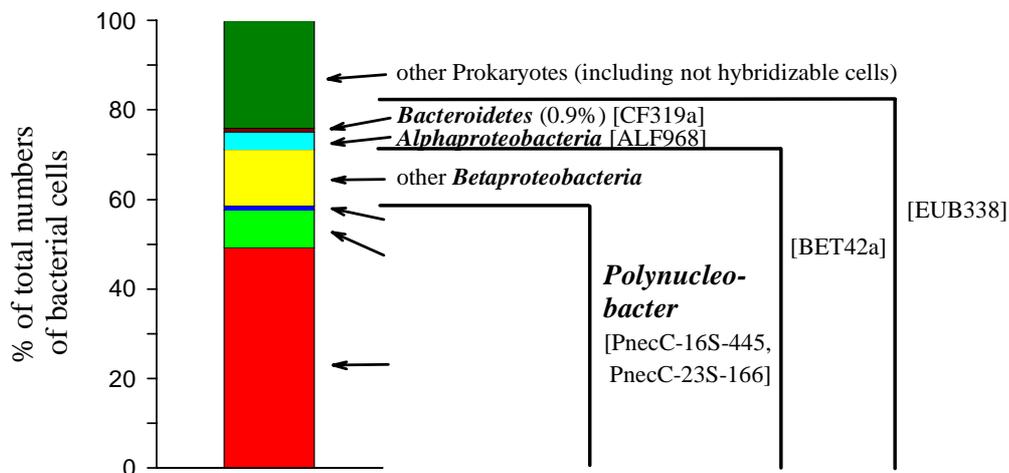


Abb. 12. Struktur der *Polynucleobacter* Subcluster C (PnecC) - Population in der dystrophen Kleinen Lacke. Die Populationsstruktur wurde durch die quantitative Analyse der angelegten Genbibliothek rekonstruiert. Die übrigen Daten wurden mittels fluoreszierender in situ Hybridisierung (FISH) mit Oligonucleotidsonden erhoben. Die Bezeichnungen in Klammern sind die Namen der jeweiligen Sonden. (Aus Hahn et al. 2005)

Im Berichtszeitraum wurde auch mit der Untersuchung der *Polynucleobacter*-Diversität in Seen der Antarktis (Zusammenarbeit mit Prof. Antonio Camacho) begonnen. Weiterhin wurde der Einfluss der Salinität von Binnengewässern auf die Struktur und Diversität der Bakterioplanktongemeinschaften anhand eines Salinitätsgradienten in Seen des Tibetischen Hochplateaus untersucht (Zusammenarbeit mit Dr. Qinglong Wu). Im Rahmen dieser Untersuchung konnte auch nachgewiesen werden, dass *Polynucleobacter*-Bakterien Süßwasserseen auf über 4000 Metern ü.d.M. besiedeln.

2) *Polynucleobacter* Genom-Projekt

Mit dem Ziel tiefere Einblicke in die Diversität und ökologische Funktion von *Polynucleobacter*-Bakterien zu erhalten, wurde im Februar 2005 dem amerikanischen Joint Genome Institute (JGI), einer zum US-Energieministerium gehörenden Forschungseinrichtung, ein Genomprojekt vorgeschlagen. Der von einem internationalen Konsortium (USA, Deutschland und Italien) unter der Leitung von Martin Hahn eingereichte Forschungsantrag stand in Konkurrenz mit über 100 anderen Anträgen und

wurde von einer Expertenkommission begutachtet. Zum ersten Mal wurde vom Joint Genome Institute ein unter der Führung einer österreichischen Institution gestellter Projektantrag angenommen. Das Projekt umfasst die Sequenzierung der Genome eines freilebenden (Abb. 11, roter Pfeil) und eines endosymbiontischen *Polynucleobacter*-Stammes. Mit der Sequenzierung des freilebenden Stammes wird erstmalig das Genom eines Vertreters einer ökologisch wichtigen Gruppe von Süßwasserbakterien entschlüsselt.

Mit der Gewinnung der zu sequenzierenden DNA des freilebenden und des endosymbiontischen Stammes wurde bereits im Sommer 2005 begonnen. Die DNA des freilebenden Stammes wurde zwischenzeitlich an JGI geliefert, und die Vorbereitungen zur Genomsequenzierung konnten von JGI bis zum Ende des Berichtszeitraumes fast abgeschlossen werden. Mit dem Vorliegen der ersten Genomdaten des freilebenden Stammes ist bis Sommer 2006 zu rechnen. Die sehr aufwändige Gewinnung der DNA des endosymbiontischen Stammes war zum Ende des Berichtszeitraumes noch in vollem Gange. Derzeit ist noch nicht abzusehen bis zu welchem Zeitpunkt die notwendige DNA-Menge von der Gruppe um Dr. Giulio Petroni (Universität Pisa, Italien) gesammelt werden kann. Nach Vorliegen der gesamten Genomdaten soll die Auswertung hauptsächlich am Institut für Limnologie in Mondsee durchgeführt werden.

3) Fraßschutzmechanismen bei Actinobakterien des Luna2-Clusters

Im Rahmen eines zehnmonatigen Gastforschungsaufenthaltes von Prof. Mitsunori Tarao (Tokyo University of Agriculture and Technology; Japan) wurden Untersuchungen zum Fraßschutz bei planktischen Actinobakterien des Luna2-Clusters durchgeführt. Zu einem früheren Zeitpunkt konnte von uns nachgewiesen werden, dass ein Stamm dieser Verwandtschaftsgruppe eine Fraßresistenz gegen einen bakterivoren Flagellaten aufwies (Hahn et al. 2003). Im Berichtszeitraum konnten wir zeigen, dass sich diese Fraßresistenz auch bei anderen Luna2-Stämmen findet und wahrscheinlich für die gesamte Gruppe charakteristisch ist. Weiters konnte ein phänotypisches Merkmal identifiziert werden, das mit großer Wahrscheinlichkeit die beobachtete Fraßresistenz verursacht (Tarao & Hahn, in prep.). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Fraßresistenzen oberhalb kritischer Temperaturen verloren gehen. Derzeit wird überprüft, ob dieser temperaturabhängige Verlust der Fraßresistenz mit den jeweiligen Temperaturadaptionen der jeweiligen Stämme (Hahn & Pöckl 2005) im Zusammenhang stehen.

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

In den kommenden Berichtsperioden wird das *Polynucleobacter* Genom-Projekt den Schwerpunkt der Forschungen in dem Arbeitsbereich Bakterienökologie bilden. Darüber hinaus werden die Forschungsarbeiten zur ökologischen Bedeutung der Mikrodiversität bei Süßwasserbakterien fortgesetzt.

A6. Ökologie und Diversität von Süßwasser- Flagellaten

Das Berichtsjahr wurde wesentlich von der Formulierung neuer Forschungsanträge bestimmt. Zwei Projekte wurden beim FWF beantragt und bewilligt (J. Boenigk). Ein weiterer FWF Antrag sowie ein gemeinsamer Antrag an die Alpenkommission (Boenigk & Schmidt) werden gegenwärtig begutachtet. Im Berichtszeitraum hat der Projektleiter weiters sein Habilitationsverfahren an der Universität Innsbruck erfolgreich abgeschlossen (venia legendi für Ökologie und Protozoologie).

Die Untersuchung des Vorjahres zu Räuber-Beute-Interaktionen zwischen Prokaryoten und einzelligen Eukaryoten wurden fortgeführt (**J. Boenigk**, mit K. Pfandl, L. Eisl, A. Wiedroither und Gästen) . Neben Mechanismen der Nahrungsselektion standen Aspekte der (Mikro-)diversität Biogeographie farbloser Mikroalgen im Vordergrund der Forschung. Die experimentelle Arbeit im Berichtszeitraum gliederte sich in vier Schwerpunkte:

1) Prinzipien und Mechanismen der Nahrungsselektion und Ernährungsstrategie:

Die Untersuchungen der Größenselektion wurden weitergeführt. Im Mittelpunkt standen dabei Effekte der Beute- und Räubergröße. Es wurden die Überlebensstrategien bakterivorer Flagellaten an Modellorganismen untersucht. Die relative Bedeutung unterschiedlicher Bakterien für die Ernährung dieser Flagellaten konnte dabei in Kooperation mit Dr. P.J. Hansen aufgeklärt werden.

2) Ökologie suspendierter Sedimente:

Die im Rahmen des FWF-Projektes P15940 „Interaktionen zwischen Protisten und suspendiertem Sediment“ durchgeführten Experimente zur Bedeutung suspendierter Feinsedimente wurden weitergeführt. Die Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit gelöster Substanzen wurden publiziert (Boenigk et al. 2005b; Pfandl et al. in prep). Die Ergebnisse zeigen, dass Oberflächeneigenschaften suspendierter Sedimente eine Schlüssel-

bedeutung für die Interaktionen zwischen Nanoplankton und gelösten Substanzen haben. Obwohl suspendierte Sedimentpartikel ingestiert werden, ist diese Aufnahmeroute für gelöste Substanzen von untergeordneter Bedeutung.

Die Arbeiten zur funktionellen und numerischen Antwort heterotropher Chrysoomonaden auf suspendierte Sedimente im Rahmen der Doktorarbeit von Frau K. Pfandl wurden weitergeführt und stehen nun vor der Publikation. Die Ergebnisse deuten auf eine enorme Bedeutung suspendierter Feinsedimente für die Fraßinteraktionen zwischen Flagellaten und Bakterien hin. Die Partikelgröße konnte hier als Kernparameter festgemacht werden.

3) Intraspezifische Variabilität und Biogeographie der heterotrophen Ochomonadaceae:

Die Stammsammlung wurde durch weitere Isolate erweitert. Untersuchungen zur morphologischen und molekularen Variabilität heterotropher Chrysoomonaden wurden weitergeführt: Die im Vorjahr begonnene Analyse der 18S rRNA Gensequenzen wurde in Kooperation mit Dr. A. Chatzinotas (Leipzig, Deutschland) abgeschlossen. Weiterhin wurden ökophysiologische Screeningexperimente durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchte morphologisch ähnliche Gruppe hochdivers ist und keine einheitliche Verwandtschaftsgruppe bildet. Die molekularen Daten (SSU rRNA) geben gewisse Hinweise bezüglich der ökophysiologischen Anpassung, reichen aber für eine Charakterisierung des Ökotyps nicht aus. Die Auswertung des umfangreichen Datensatzes soll im laufenden Jahr erfolgen.

In Kooperation mit Dr. T. Stoeck (Kaiserslautern, Deutschland) wurde eine Analyse weiterer phylogenetisch wichtiger Sequenzabschnitte in Angriff genommen. Die molekularen Daten werden zur Zeit von Herrn S. Jost in einer Diplomarbeit erhoben und sollen in Verknüpfung mit den ökophysiologischen Daten eine Aussage hinsichtlich der Eignung unterschiedlicher phylogenetischer Marker für ökologische Zwecke erlauben.

4) Mikrodiversität und mikrobielle Ökologie der Wasser-Land-Schnittstelle:

Zur Überprüfung der bisherigen Ergebnisse zur Intraspezifischen Variabilität wurde das Ökoton Fuschlsee - Fuschler Ache - Mondsee mit den umliegenden Bodenhabitaten erneut intensiv beprobt. Die Proben des Vorjahres werden derzeit im Rahmen der Dissertation von Frau Mag. K. Pfandl ausgewertet.

Vorschau für 2006

- Die oben angesprochenen Projekte sollen ausgewertet und publiziert werden

- im Rahmen der beiden neu bewilligten FWF Projekte sollen von Frühjahr bis Herbst 2006 Proben aus verschiedenen Hochgebirgs- und Voralpenseen genommen werden. Die Proben sollen für die weitere (molekulare und morphologische) Bearbeitung aufbereitet werden. Eine Analyse dieser Daten ist nicht vor 2007 zu erwarten
- in Kooperation mit Sanofi-Aventis soll ein Kryoprotokoll für Flagellaten entwickelt sowie erste Stämme hinsichtlich der Sekundärmetabolite analysiert werden

A7. Untersuchungen zur Bedeutung, Entstehung und Erhaltung der Diversität planktischer Ciliaten

Die **Ciliaten** wurden weiterhin **als Modellorganismen** für die experimentelle Bearbeitung allgemeiner ökophysiologischer und evolutionsökologischer Fragestellungen eingesetzt (**T. Weisse**, mit E. Gächter, U. Scheffel & P. Stadler). Die Untersuchung des oligotrichen Ciliaten *Meseres corlissi* wurde im Rahmen eines FWF-Projektes fortgesetzt. Die wesentlichen Ziele dieses interdisziplinären, internationalen Forschungsprojektes sind es, die genotypische und phänotypische Variation zwischen den z. T. extrem unterschiedlichen Habitaten zu vergleichen und die klonale Variabilität an einem Standort relativ zur Variabilität zwischen den Standorten zu messen. Dabei soll die gegenwärtig international favorisierte (Null-) Hypothese überprüft werden, dass weit verbreitete Ciliaten sich genetisch und ökologisch nicht unterscheiden, d. h. lokale Adaptationen zu vernachlässigen sind.

Im Berichtszeitraum wurden mehrere österreichische *Meseres*-Stämme von zwei Standorten in Salzburg und bei Kefermarkt (Mühlviertel) neu isoliert und in den am Projekt beteiligten Laboren morphologisch (W. Foissner, Salzburg), molekulargenetisch (Strüder-Kypke, Guelph, Ontario) und ökophysiologisch (Weisse, Gächter & Scheffel in Mondsee, H. Müller in Konstanz) untersucht. Die Dauerstadien (Zysten) dieses Ciliaten weisen einige Besonderheiten in ihrer Ultrastruktur und Biochemie auf, die bisher von oligotrichen Arten unbekannt waren und wichtige Hinweise auf die phylogenetische Verwandtschaft innerhalb dieser Gruppe geben können (Foissner 2005, Foissner et al. 2005). Alle bisher untersuchten Stämme sind hinsichtlich ihrer 18S rDNA ident und unterschieden sich auch in den als variabler angenommenen ITS1- und ITS2-Genregionen nur minimal. Dennoch sind das Temperaturverhalten (Dissertation E. Gächter) sowie die Mechanismen der Enzystierung und Exzystierung zwischen dem zuvor untersuchten tropischen Stamm (Weisse 2004) und den österreichischen Stämmen sehr verschieden. Während die

Zystenbildung bei dem tropischen Stamm von der Temperatur gesteuert wird, ist dieser Faktor bei den österreichischen Stämmen unbedeutend. Diese benötigen für maximales Populationswachstum, Enzystierung, Exzystierung und längeres Überleben der Zysten die Zugabe von Erdextrakt oder sterilisierter Erde ('soil factor', Müller et al. 2006). Diese Ergebnisse bestärken unsere bisherigen Befunde, dass innerhalb der Ciliaten eine enorme physiologische Diversität innerhalb eines nach morphologischen und molekulargenetischen Kriterien als eine Art bezeichneten Taxons besteht.

Eine intensive Suche nach weiteren *Meseres*-Populationen an mehreren, von früheren Untersuchungen bekannten Standorten in Namibia verlief negativ. Zum Jahresende konnte jedoch ein weiterer *Meseres*-Stamm aus Bodenproben, die aus einer Überschwemmungsregion in SO-China von Prof. W. Foissner entnommen worden waren, isoliert werden, der gegenwärtig in Mondsee und Salzburg untersucht wird.

Im Rahmen des '*Meseres*-Projektes' waren bereits im Vorjahr Untersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes auf die Wachstumsraten verschiedener Isolate durchgeführt worden. Eine Literaturstudie ergab, dass die Bedeutung des pH-Wertes als ökologischer Faktor für frei lebende Ciliaten weitgehend unbekannt ist. Deshalb wurden diese Laborexperimente im Berichtszeitraum mit 3 nahe verwandten Arten der Gattung *Urotricha* fortgesetzt (Weisse & Stadler, Manusk. einger.). Eine der untersuchten Arten, *U. castalia*, reagierte sehr sensitiv auf pH-Änderungen und tolerierte nur einen relativ geringen pH-Bereich (pH 6.5-8.2). Der pH-Wert kann daher die Verbreitung dieser Art in vielen Oberflächengewässern einschränken. Die kleinen und weit verbreiteten Arten *U. furcata* und *U. farcta* tolerierten hingegen einen weiten pH-Bereich (pH 4.1-9.5 für *U. farcta*). In allen Fällen war die pH-Toleranz positiv mit der in früheren Experimenten ermittelten Temperaturtoleranz dieser Arten positiv korreliert. Bei den pH-toleranten Arten haben die in den Salzkammergutseen und anderen oligo- mesotrophen Seen typischen saisonalen Schwankungen des pH-Wertes im Vergleich zu den Umweltfaktoren Temperatur, Nahrungsangebot und Fraßdruck durch Rotatorien nur einen geringen Einfluss (s. Abb. 13).

Der Stand der Forschung zur mikrobiellen Diversität in aquatischen Ökosystemen wurde in einem Plenarvortrag auf dem 4th Symposium for European Freshwater Sciences (SEFS 4) in Krakau vorgestellt und anschließend in einem Review-Artikel zusammen gefasst (Weisse 2006)

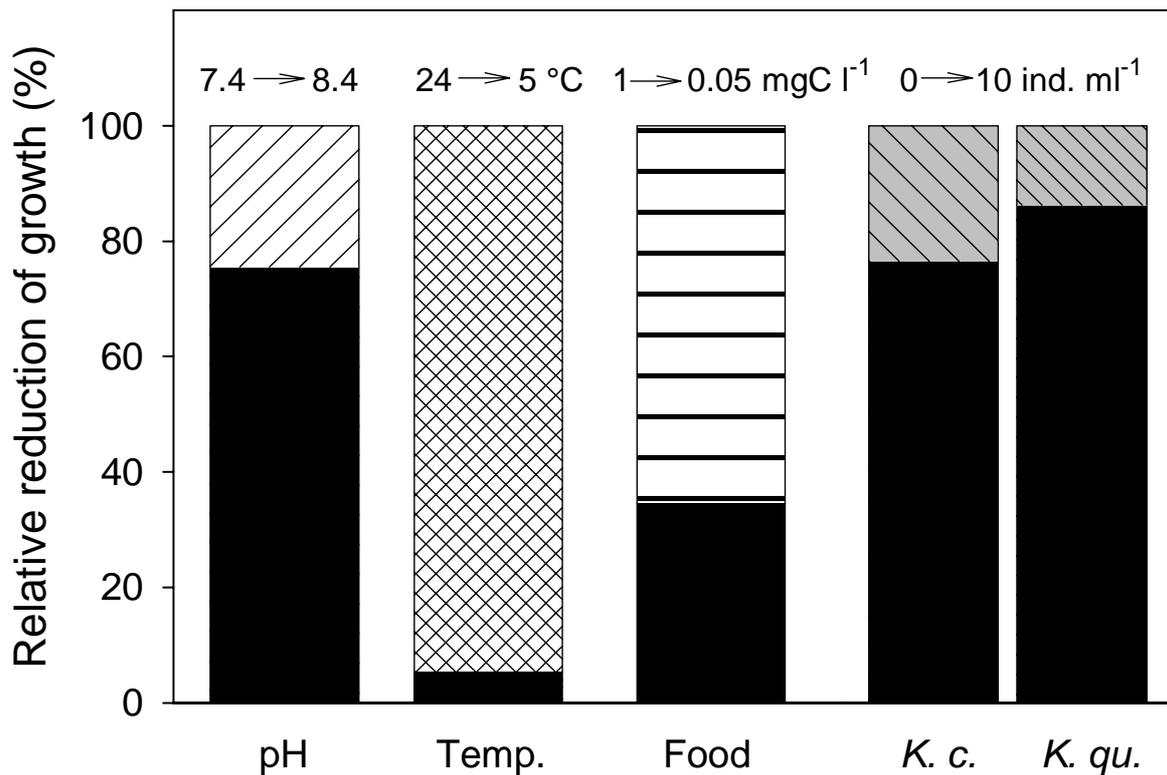


Abb. 13. Der relative Einfluss wesentlicher Umweltfaktoren auf die Wachstumsraten des Ciliaten *Urotricha farcta/furcata*. Oberhalb der Balken ist der jeweilige typische Schwankungsbereich in unseren Seen eingetragen; ein Anstieg des pH-Wertes von 7.4 auf 8.4 führt z. B. zu einer ca. 25%igen Verringerung, eine Abnahme der Temperatur von 24 auf 5 °C zu einer drastischen Reduktion der Wachstumsraten. Die beiden rechten Balken geben den Einfluss des Fraßdruckes durch Rädertierchen (Rotatorien) wieder (*K.c.*=*Keratella cochlearis*, *K.qu.*=*K. quadrata*).

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

Fortsetzung der ökophysiologischen Untersuchungen an *Meseres*- Populationen von unterschiedlichen Standorten, Screening weiterer möglicher Standorte, Etablierung neuer klonaler Kulturen, Untersuchung klonaler Unterschiede auf physiologischer, morphologischer und genetischer Ebene. Veröffentlichung der Ergebnisse auf internationalen Tagungen und in einschlägigen Fachzeitschriften.

Vorbereitung eines Folgeprojektes zur Untersuchung ubiquitärer oligotricher Ciliaten, das als Teilprojekt in dem geplanten FWF-Schwerpunktprojekt eingerichtet werden soll. Vorbereitung und Koordination des Gesamtprojektes (T. Weisse).

B. Fischökologie

Die wissenschaftliche Tätigkeit des Arbeitsbereichs Fischökologie (**J. Wanzenböck**, mit K. Maier, B. Pamminer-Lahnsteiner, M. Finster und weiteren Examenskandidat(inn)en und Gästen) konzentrierte sich 2005 auf das Feld „Entstehung (Artbildung) und Erhaltung der Diversität von Fischtaxa: Zusammenhang zwischen ökologischer Nischendifferenzierung und genetischer Differenzierung heimischer Coregonenformen“, wie dies in den vorangegangenen Jahresberichten angekündigt worden war (siehe Vorschau im JB 2004). Dieses Thema wird in Kooperation mit Kollegen der Universität Graz (Prof. Steven Weiss und Prof. Christian Sturmbauer) bearbeitet. Es wurde ein Antrag beim FWF im Rahmen des Programmes „Translational Research“ mit dem Titel „Conservation of natural biological resources in Austria: Identification of indigenous whitefish species and extent of potential hybridization with a Baltic species“ ausgearbeitet und Ende März 2005 eingereicht. In der Folge wurde der Antrag im Oktober 2005 bewilligt (FWF Projekt Nr. L229-B12, Umfang: € 299.769,31), und das Projekt begann per 1. Jänner 2006 mit einer Laufzeit von 3 Jahren. Gleichzeitig fanden zahlreiche Vorarbeiten für das Projekt statt: So wurden die Untersuchungen von Mag. Barbara Pamminer-Lahnsteiner (die im genannten FWF Projekt eine Dissertationstelle bekleidet) zur genetischen Differenzierung der Coregonenlarven im Traun- und Hallstättersee fortgesetzt. Diese Arbeiten entstanden aus einer Vorstudie, die von der "Kommission für interdisziplinäre ökologische Studien (KIÖS)" der ÖAW (Validierung der ökologischen Nischendifferenzierung unterschiedlicher Coregonenformen im Larvenstadium durch Integration molekulargenetischer Analysen) finanziert wurde. Die genetischen Analysen der frisch geschlüpften Larven wurden mit einem spezifisch entwickelten RFLP-Protokoll an einer großen Zahl von Individuen durchgeführt und vorläufig abgeschlossen. Die Ergebnisse wurden bei der IX. Internationalen Konferenz zur Biologie und dem Management von Coregonen in Olsztyn, Polen präsentiert. Es zeigt sich eine starke genetische Strukturierung der frisch geschlüpften Coregonenlarven an beiden Seen. So sind alle Larven, die am Beginn der Schlupfperiode im nördlichen Teil des Traunsees zu finden sind, zu 100% einem Haplotyp zuzuordnen, während die später schlüpfenden Larven über alle Probenstellen am Traunsee verteilt waren und zu unterschiedlichen Anteilen auch einem zweiten Haplotyp zugeordnet werden konnten. Am Hallstättersee waren alle Larven, die aus dem Zufluss in den See driften, einem Haplotyp zuzuordnen, während ein zweiter Haplotyp nur im nördlichen und östlichen Teil des Sees gefunden wurde. Diese Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese, wonach die im Jänner geschlüpften Larven des Traunsees einer ursprünglichen Coregonenform entsprechen, wie auch die aus dem Zufluss

eingeschwemmten Larven des Hallstättersees. Larven, die möglicherweise der eingesetzten Maräne zugeordnet werden können, treten zu anderen Zeiten bzw. an anderen Orten in Erscheinung. Weitere genetische Untersuchungen im begonnenen FWF Projekt sollen diese Hypothesen prüfen. Das erwähnte KIÖS-Projekt wurde im Berichtszeitraum abgeschlossen und ein Endbericht der Kommission übermittelt.

Auch die seit mehreren Jahren laufenden Echolotuntersuchungen brachten interessante Ergebnisse, die im Berichtszeitraum ebenfalls auf der IX. Internationalen Konferenz zur Biologie und dem Management von Coregonen in Olsztyn, Polen, vorgestellt wurden. Es zeigte sich, dass die räumlichen Verteilungsmuster der Fische in Seen (Traunsee und Zellersee) über viele Monate und sogar Jahre hinweg überraschend stabil sind (Abb. 14). Weitere Studien zur Erforschung der Ursachen dieser stabilen räumlichen Verteilungsmuster sollen in den kommenden Jahren erfolgen.

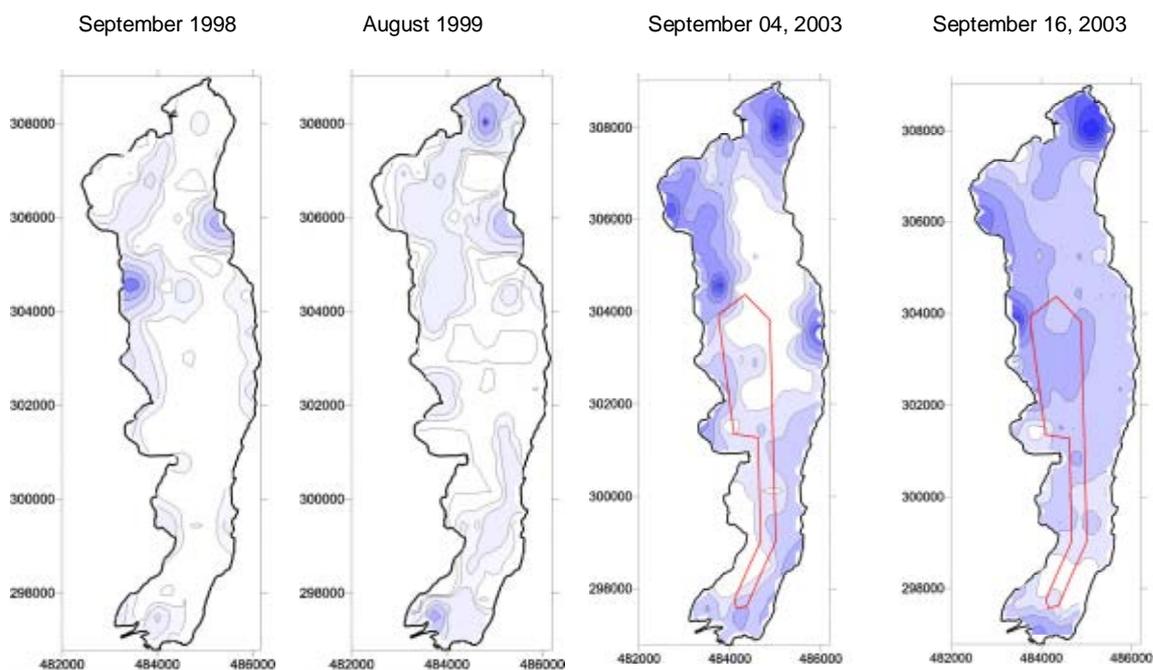


Abb. 14. Räumliche Verteilungsmuster der Fische im Traunsee über mehrere Jahre basierend auf Echolotaufzeichnungen. Es zeigen sich stabile Konzentrationen der Fische im Süden nahe der Mündung der Traun, sowie im Norden nahe dem Ausrinn des Sees, und in den nordwestlichen Flachwasserzonen. Die Aufnahmen im Jahr 2003 wurden vor und nach einem Powerboot Rennen am Traunsee gemacht, die rote Linie zeigt die Streckenführung des Bootsrennen.

Einen weiteren Höhepunkt innerhalb der Arbeitsgruppe stellt die Zuerkennung eines ÖAW-DOC Stipendiums an Mag. Martin Finster dar. Er entwickelte im Berichtszeitraum ein Dissertationsprojekt zum Thema „The role of predation in population dynamics of 0+

whitefish (*Coregonus lavaretus*)“. Der Antrag wurde im Mai 2005 eingereicht und im Oktober des Jahres bewilligt. Das Stipendium hat einen Umfang von € 42.800,- und läuft über 2 Jahre. Das Dissertationsprojekt begann im Dezember 2005 mit der Durchführung methodischer Tests (Schleppnetztechnik), um die im Frühjahr 2006 beginnenden Freilandarbeiten vorzubereiten. Ziel des Projektes ist es, die Populationsdynamik der Coregonen-Jungfische im gesamten ersten Lebensjahr, vom Larvalstadium bis zum Jungfischstadium im Herbst des Jahres, zu quantifizieren. Für das Larvalstadium stehen bewährte Methoden (Schubnetz) aus früheren Entwicklungsarbeiten zur Verfügung. Für das anschließende Juvenilstadium sollen neue Schleppnetzmethoden entwickelt und mit Echolotmethoden kalibriert werden. Darüber hinaus soll auch der Einfluss von Raubfischen auf die Populationsdynamik der larvalen und juvenilen Coregonen bearbeitet werden.

Auch die Diplomarbeit von Herrn Stefan Mayr über die Habitatnutzung des Perlfisches – eine europaweit gefährdete Art, die nur in einigen Salzkammergutseen Österreichs vorkommt – nahm einen wichtigen Platz in den Aktivitäten des Jahres 2005 ein. Es wurden monatlich Litoralhabitate, Profundalhabitate und Epipelagialhabitate mit Kiemennetzen beprobt um die bevorzugten Aufenthaltsorte der Perlfische herauszufinden. Es zeigte sich, dass der Perlfisch, im Gegensatz zu allen bisherigen Literaturangaben die ihn als Bewohner großer Seetiefen darstellen, als echte Litoralform angesehen werden muss.

Die Kooperationsprojekte mit russischen und polnischen Wissenschaftlern liefen auch im Berichtszeitraum weiter. Die verhaltensökologischen Arbeiten der russischen Gastwissenschaftler wurden bei einer internationalen Konferenz in Borok, Russland präsentiert. Der Besuch bei der internationalen Coregonenkonferenz in Polen wurde auch dazu benutzt mit den polnischen Kooperationspartnern die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Echolotuntersuchungen voranzutreiben.

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

Dem Forschungsfeld zur Frage des Zusammenhanges zwischen ökologischer Nischendifferenzierung und genetischer Differenzierung heimischer Coregonenformen wird auch 2006 eine zentrale Rolle innerhalb des Arbeitsbereichs zukommen. Im Dezember 2005 wurden Laichfische aus Norddeutschland (Nationalpark „Unteres Odertal“) nach Mondsee geholt und es wurden experimentelle Kreuzungen mit

flusslaichenden Coregonen des Hallstättersees produziert. Dieses Experiment in dem die Überlebensraten der Embryonen und später auch das Überleben und Wachstum der frühen Entwicklungsstadien untersucht wird, läuft zur Zeit und wird auch bis Mitte 2006 zu verfolgen sein. Daneben werden Freilanduntersuchungen der Coregonen am Hallstättersee und Mondsee im Zuge des FWF-Projektes und der Dissertation von Mag. Finster durchgeführt werden. Ergänzt werden diese Aufnahmen durch laufende genetische Analysen der gefangenen Fische. Diese Tätigkeiten im Zusammenhang mit den erwähnten Projekten werden auch noch weit bis ins Jahr 2007 reichen. Die Zusammenarbeit mit den Kollegen aus Polen wird auch 2006 im Zuge eines ÖAD Kooperationsprojektes fortgeführt werden. Die Kooperation mit den russischen Kollegen läuft unter der Voraussetzung einer Bewilligung der Zusammenarbeit beim ÖAD (WTZ Programm) bzw. ÖAW Austauschprogramm weiter.

C. Langzeitentwicklung von Alpenseen (Forschungsbereich Paläolimnologie)

Die paläolimnologische Auswertung eines Sedimentkerns aus dem hochalpinen (2076 m ü.A.N.) Oberen Landschitzsee (ObLAN), Lungau Szb., wurde fortgesetzt (**R. Schmidt**, mit J. Knoll). Im Gegensatz zum letztjährigen Berichtszeitraum, wo über das ältere Holozän referiert wurde, konzentrieren sich nun unsere Untersuchungen auf den anthropogen beeinflussten Zeitraum von 4000 Jahren bis heute. In Hinblick auf die jüngsten Klimaveränderungen hat dieser Zeitabschnitt einen besonderen Stellenwert für das Verständnis der Interaktionen Klima/Mensch im sensitiven Bereich der Hochalpen. In ObLAN fanden sich erste Spuren menschlicher Gegenwart schon um 5000 vor heute. Mit einem multidisziplinären Ansatz versuchen wir, (a) klimatische von anthropogenen Einflüssen zu trennen und (b) der Hypothese nachzugehen, dass die Hochlagennutzung primär vom Klima bestimmt wurde. Potenzielle Einflussgrößen sind die Länge der winterlichen Schneebedeckung und die Dauer der produktiven Periode. (a) Für die paläolimnologische Rekonstruktion klimarelevanter Kenngrößen verwenden wir ein auf Messdaten von Temperaturschreibern, chemischen Messungen und Abundanzen von Bio-Indikatoren (Diatomeen, Chrysophyceen-Zysten, Chironomiden) in den Sedimentoberflächen von 40 Seen der Niederen Tauern (östliche Zentralalpen) basierenden Kalibrier-Datensatz. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Rekonstruktion saisonaler Klimate. Für die Diatomeen erwies sich dabei der Zeitpunkt der Herstdurchmischung (A_{mix}) als signifikante klimaabhängige Kenngröße, für die Chrysophyceen-Dauersporen (Zysten) dagegen der Zeitpunkt der

Frühjahrsdurchmischung (S_{mix}). Die Vorhersagequalität des S_{mix} -Modells wurde von C. Kamenik (dzt. Schrödinger Stipendium USA) durch die Verknüpfung von Zysten aus Sedimentfallen der NT-Seen mit gleichzeitig gemessenen Thermistor-Werten mehrerer Jahre (updates) erheblich verbessert. Aus der Differenz zwischen S_{mix} und A_{mix} sind wir in der Lage, die Länge der Eisbedeckung, als auch mit einem einfachen empirischen Modell aus höhenabhängiger Lufttemperatur von Jahresgängen Lufttemperatur-Anomalien gegenüber heute zu berechnen. Aufgrund der Sensitivität der Diatomeen und Chrysophyceen gegenüber pH/Alkalinität und gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC) (als Produktionsparameter) wurden auch für diese Variablen Transferfunktionen erstellt und im Rahmen einer Diplomarbeit (Monika Roth) auf den jung-Holozänen Zeitabschnitt von ObLAN angewandt. Diese Arbeit ist noch nicht zur Gänze abgeschlossen. In der Abb. 15 ist der Verlauf von A_{mix} mit der „mittleren Herbst- Lufttemperatur-Anomalie“ gegenüber heute und dem abgeleiteten DOC für den Zeitraum 4000 bis heute dargestellt. Die bronzezeitliche Wärmeperiode ist durch zwei deutlich ausgeprägte Kaltphasen (KP, Pfeile) von der römerzeitlichen Warmperiode getrennt. Diese wiederum von den früh- bis hochmittelalterlichen Wärmeperioden (MT_{opt}), die sich auch durch einen Trend zu höherem DOC abheben. Inverse Trends kennzeichnen die sogenannte „Kleine Eiszeit“ und die Kälteperiode um 1850, gefolgt von der aktuellen Erwärmung (GBW = Global Warming).

Oberer Landschitzsee (2076 m NN)

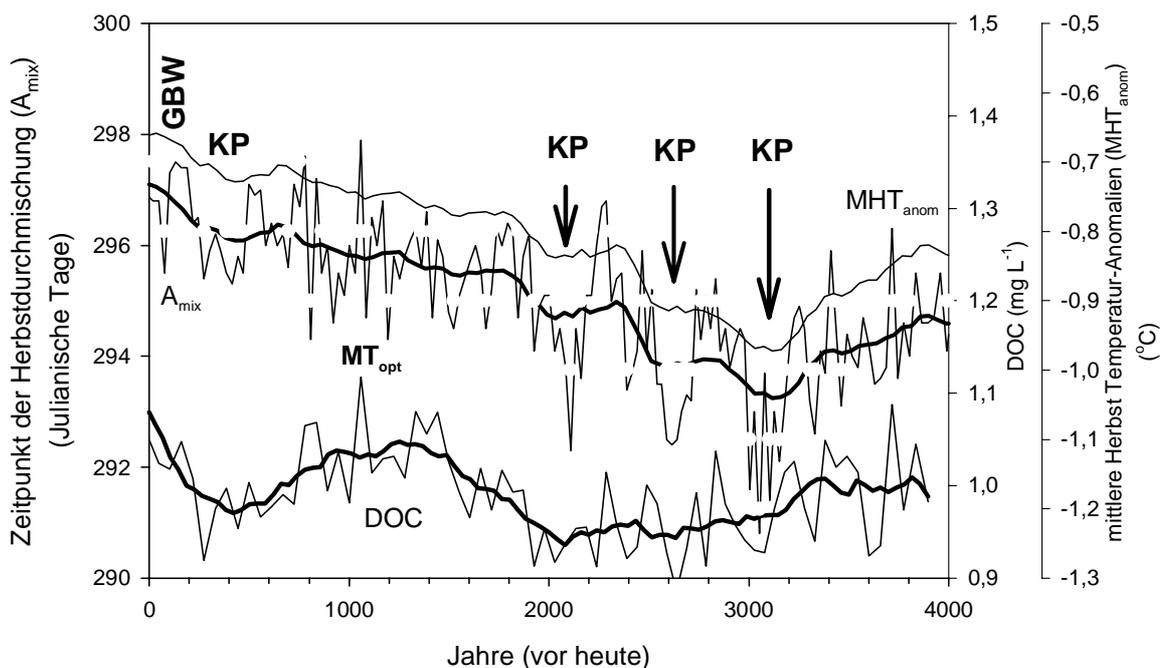


Abb. 15. Aus Diatomeen-Transferfunktionen (Kalibrier-Datensatz Niedere Tauern Seen) abgeleitete Klima- und Umweltvariablen im Sedimentkern Oberer Landschitzsee.

Im Spätherbst 2005 wurde der Antrag an den Wissenschaftsfonds (FWF) mit dem Thema „**Klima-und Umweltentwicklung im späten Pleniglazial**“ (Laufzeit 3 Jahre) genehmigt (P18595-B17) und mit den Vorarbeiten begonnen. In diesem multidisziplinären Projekt (Diatomeen, Chrysophyceen, Ostracoden, Mineralogie, Tephras, Pollen, Makroreste, Datierung) werden die oben genannten und durch 19 Seen der Ost- und Südalpen erweiterten Transferfunktionen auf das späte Pleniglazial des Längsees in Kärnten angewandt. Die Auswahl des genannten Zeitfensters und Sees erfolgte aus folgenden Gründen: Quantitative Rekonstruktionen dieses Zeitraums (u.a. des Längsee Interstadials) fehlen im Alpenraum. Der rasche Wechsel klimatisch unterschiedlicher Zeitabschnitte ist für das Verständnis aktueller klimatischer Veränderungen von besonderem Interesse. Ältere Untersuchungen wiesen im Längsee sowohl Diatomeen als auch Ostracoden für dieses Zeitfenster nach. Damit können die auf Diatomeen und Chrysophyceen basierenden hochauflösenden quantitativen Klimarekonstruktionen mit Sauerstoff-Isotopen-Messungen an Ostracoden-Schalen verknüpft werden. Dies erfolgt in enger Kooperation mit dem ESF-Projekt „DecLakes“ (siehe D. Danielopol).

Mit-Betreuung der Dissertation von Alfred Ellinger an der Universität Graz (Prof. H. Sampl): Dabei werden quantitativ Beziehungen zwischen Wassertemperatur (Thermistoren), Nährstoffen, DOC, Verlandung, Saisonalität und der Diatomeen-Verteilung in Seen der Nockberge (Kärnten) untersucht. Ein Schwerpunkt liegt dabei am Erstellen von Transferfunktionen für flache und, im Vergleich zu den Niederen Tauern, produktivere Alpenseen und der Erarbeitung eines für den Nationalpark repräsentativen Profils.

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

(1) Abschluss der Diplomarbeit von Monika Roth. Weiters soll die Rekonstruktion der Klimavariablen des jung-Holozänen Sedimentkerns ObLAN durch Analysen von Chironomiden (Ableitung von Juli-Temperaturen, M. Rieradevall, Univ. Barcelona) Geochemie (Univ. Heidelberg), Mineralogie (Univ. Innsbruck) und Pollenanalysen ergänzt werden. Gleichzeitig wird mit molekularbiologischen Methoden (C. Kamenik, J. Boenigk) versucht, relevante Chrysophyceen-Zysten mit Arten zu verbinden, um einen erweiterten Zugang zu deren Ökologie zu erlangen. Dazu wurde ein Projektantrag (2 Jahre, R. Schmidt & J. Boenigk) an die Alpenforschung der ÖAW gestellt mit dem Thema „Seasonal climate impact on land-use

development in the Austrian Alps during the last 4,000 years – A multi-proxy approach study (CLIM-LAND).

- (2) Beginn der Feld- und Laborarbeiten des FWF-Projektes. Im Rahmen dieses Projektes erfolgte die Vergabe einer Dissertation und einer TA-Stelle. Weiters wird Dr. Kaarina Weckström, Univ. Helsinki, Finnland, im Rahmen eines schon genehmigten Auslandsstipendiums der Finnischen Akademie der Wissenschaften als Postdoc für 2 Jahre an diesem Projekt mitarbeiten.
- (3) Weiterführung der Dissertation von A. Ellinger (Universität Graz).
- (4) Kooperationspartner in einem internationalen Projekt des Schweizer Nationalfonds (W. Tinner, Universität Bern) zur Klimaentwicklung im nördlichen Mittelmeerraum. Zum Themenkreis klimatischer Interaktionen zwischen den südlichen Alpen und dem nördlichen Mittelmeer, wie dies in der jüngsten Publikation (JOPL) angeschnitten wurde, werden Voruntersuchungen geführt, inwieweit die Alpen Transferfunktionen auf hochalpine Seen im Kristallin Korsikas anwendbar sind.

D. Grundwasserökologie & Paläoökologie von Ostracoden

Dan L. Danielopol mit Institutsmitarbeitern (G. Falkner, K. Minati, A. Stracke, J. Knoblechner, G. Roidmayr), Gästen (Mag. S. Iepure, Dr. T. Namiotko, Dr. R. Pipik) und Kollegen von Univ. Innsbruck (Mag. B. Mindl), Univ. Salzburg (Prof. Dr. J. Linhart, Univ. Doz. Dr. R. Schabetsberger, Mag. W. Brauneis, W. Neubauer), Univ. Wien (Univ. Doz. Dr. M. Zuschin, Dr. G. Drozdowski, Dr. Pospisil, R. Buttinger), Univ. Graz (Prof. Dr. W. Piller), Naturhist. Museum Wien (Univ. Doz. Dr. G. Hoeck, Univ. Doz. Dr. M. Harzhauser), Univ. Lyon (Prof. Dr. J. Gibert), GSF Neuherberg, Inst f. Grundwasser Ökologie (Dr. C. Griebler), UAM Madrid (Prof. Dr. A. Baltanás), Univ. Rennes (Prof. Dr. P. Marmonier).

Folgende Aktivitäten wurden während des Berichtjahres 2005 durchgeführt:

- 1) Mitarbeit bei EU-Projekt PASCALIS: Verfassen einer Publikation ("Why and how to take care of subterranean aquatic microcrustaceans") für den Band "World Subterranean Biodiversity" (Ed. J. Gibert). Zusammenarbeit mit Dr. P. Pospisil).
- 2) Bearbeitung eines Erklärungsmodells über die Mikroevolution des *Pseudocandona eremita* Artenkreises mit morphometrischen Daten (stygobionte Ostracoden). Vorbereitung einer Publikation "Microevolutionary and taxonomical aspects within the species-group *Pseudocandona eremite* (Vejdovský)", (Zusammenarbeit mit Mag. S. Iepure und Dr. T. Namiotko).

- 3) Mitarbeit an dem Projekt "Einfluss und Bedeutung von Mikro, Meio- und Makroorganismen bei Grundwasser-Neubildungsprozessen an Versickerungsoberflächen und im Grundwasser". Verfassung eines Endberichts und eines Abstracts für die Tagung HydroEco 2006 (Zusammenarbeit mit Mag. B. Mindl, Dr. G. Drozdowski, Dr. R. Schabetsberger, Dr. P. Pospisil und Dr. C. Griebler).
- 4) Erstellen eines Benutzerhandbuchs für das Computerprogramm Morphomatica V. 1.5 (Sept. 2005) (Zusammenarbeit mit A. Stracke, Prof. J. Linhart, Prof. A. Baltanás, Mag. W. Brauneis).
- 5). Mitarbeit beim ESF-Projekt DecLakes, Subprojekt "Ostracod morphology and systematics on Mondsee and Hamza Jezero (Polen)". (Zusammenarbeit mit G. Roidmayr, Dr. T. Namiotko). Gestaltung des „1st Workshop DecLakes“ in Mondsee (Zusammenarbeit mit R. Schmidt und M. Dokulil).
- 6) Mitarbeit beim FWF-Projekt "Comparative morphology and taxonomical relationships between living subterranean and fossil "Paratethyan" Ostracoda (Crustacea) from Central and Eastern Europe: an approach to use ostracods as diagnostic tools for evaluation of environmental changes in Lake Pannon during the Upper Miocene. Verfassen von Präsentationen an Internationalen Tagungen: (a) "Evolutionary pathways within Vestalenula lineage (Ostracoda, Darwinulidae)" beim 15th International Symposium on Ostracoda, Berlin. (Zusammenarbeit mit Mag. K. Minati, J. Knobloch, Doz. Dr. G. Hoeck). (b) "Composition of Pannonian ostracod assemblages as indicator of wetland ecology" (Zusammenarbeit mit Mag. K. Minati, J. Knobloch, Doz. Dr. M. Harzhauser). (c) „Small scale shifts in agitated palaeoenvironments of Lake Pannon on ostracod assemblages“ (Zusammenarbeit mit R. Buttinger, Doz. Dr. M. Harzhauser und Doz. Dr. M. Zuschin). Gestaltung des Workshops „Paläoökologie – Methoden und Anwendung an verschiedene Zeitskalen“ in Mondsee (Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Schmidt und Prof. Dr. M. Dokulil).
- 7) Arbeit an einer kritischen Evaluation der Aktivitäten des EU-General Direktorates für Umweltschutzmassnahmen "Efforts of the European Commission to improve communication between environmental scientists and policy-makers" (Zusammenarbeit mit Prof. J. Gibert und Dr. C. Griebler). MS eingereicht bei der Zeitschrift "Science".
- 8) Verfassen eines "Invited Lecture" ("Videography and groundwater invertebrates: Lobau wetlands") für das Symposium "New currents in conserving freshwater systems", April 2005, veranstaltet von "The Center for Biodiversity and Conservation at the American Museum of Natural History, New York (Zusammenarbeit mit Dr. P. Pospisil).

9) Verfassen des Kapitels "Freshwater interstitial communities" für das Buch "Guidelines for the Protection of Subterranean and Karst Biodiversity", (Zusammenarbeit mit Dr. P. Pospisil).

10) Vorbereitung eines Review über die organismische Ökologie der Crustaceen (Zusammenarbeit mit Prof. Dr. P. Marmonier und Prof. Dr. G. Falkner).

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

Fortlaufende Bearbeitung der FWF- und ESF-Projekte.

E. Forschungsbereich Fließgewässerökologie

1) Fractals in Stream Ecosystems (Fraktale Geometrie und Skalierung in benthischen Ökosystemen): FWF-Projekt 15597-B03 (**Humpesch**, mit Projektmitarbeitern)

(HomePage:http://www.oeaw.ac.at/limno/personnel/humpesch/Fractal%20Geometry%20WebSite/Fractal_HomePage.htm)

Im Jahr 2005 wurden die Proben, die im Jahr 2004 genommen wurden, weiter aufgearbeitet. Von Februar bis November 2004 erfolgte die Identifikation und Vermessung der benthischen Organismen aus dem untersuchten Einzugsgebiet des Gam in Wales (UK). Bisher konnten dort 362 mikro-, meio- und makrobenthische Arten mit einer Gesamtdichte von $6,08 \times 10^6$ Individuen pro m^2 nachgewiesen werden. Zwei der drei Probenentriebe wurden bereits zum Teil analysiert, wobei die Hypothese, dass die Individuendichten mit den Biomassen über eine 3/4-Skalierung in Beziehung stehen, bestätigt werden konnte. Der letzte der drei Probenentriebe muss noch eingegeben und analysiert werden.

Parallel dazu wurden auch die ersten Proben aus dem niederösterreichischen Einzugsgebiet aussortiert; die Bestimmung, Vermessung und Wägung der Individuen ist noch im Gange.

Die Granulometrie der Grobsedimente konnte im Oktober 2005 abgeschlossen werden, die Partikelgrößenbestimmung der Feinsedimente von zwei Terminen ist abgeschlossen.

Die bildanalytische Auswertung (September, Oktober 2005) der ersten Fotos von Sedimentquerschnitten aus dem Einzugsgebiet in Wales ergab eine fraktale Dimension von 1.4 mit einer hohen Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Untersuchungsbereichen, wobei zeitliche Variationen noch nicht berücksichtigt sind.

Im Dezember 2005 wurde ein Kolonisationsexperiment in Wales durchgeführt, dessen Ergebnisse zurzeit ausgewertet werden. Es gibt dabei erste Hinweise, dass homogene Sedimente fast keine Individuen aufwiesen und somit heterogene Habitate markant bevorzugt werden.

2) Biodiversity of the macrozoobenthos in a large river, the Austrian Danube.

„Spatio-temporal variability of benthic macroinvertebrate attributes and their relationships to environmental factors in a large river (Danube, Austria)“ (Projekt Gemeine Wien)

The macroinvertebrate community of the riverbed sediments was examined for biodiversity and spatial resource utilisation at four sites on a cross-section of the River Danube in Austria between September 1995 and August 1996. The sites differed in water velocity, sediment composition and habitat stability. A species-accumulation curve based on all samples suggested an open community, with 164 species present at the four sites. Of these, 81 species were Chironomidae, 33 species were Oligochaeta and these two groups accounted for some 95% of the total numbers of macroinvertebrates. Altogether, 93 species occurred at site 1, 82 at site 2 and 71 at site 3. Site 4 had 142 species, of which 47 did not occur at any of the other sites; some (mainly chironomids) possibly immigrate from a neighbouring backwater. Redundancy Analysis (RDA) was used to describe the variation in the relationship between these community attributes, together with total abundances, and environmental factors. The first two RDA-axes separated the four sites with respect to habitat stability and sediment composition; the temporal scale was given by the third and fourth RDA-axes, related to water temperature and flow, respectively. The centroids of the site scores exhibited a clear circular pattern for successive sampling dates, indicating relatively predictable environmental conditions over the year. In general, habitat stability was the major factor associated with community attributes. Lower sediment turnover near the riverbanks coincided with increased densities and decreased species turnover. Highest values for species richness and total abundance occurred at a riverbank site of intermediate stability and greatest sediment heterogeneity, suggesting that the communities were structured by a combination of several factors. Parameters describing resource utilisation patterns were only weakly associated with changes in environmental conditions, suggesting that food distribution and/or biotic interactions also influenced community structure.

3) "Community organisation of larval chironomid (Diptera) assemblages and environmental factors in a large river: prediction and validation of their interrelationships after three years"

Assemblages of larval chironomids in a free-flowing section of the River Danube, east of Vienna, were examined over three years. Relationships between community attributes and environmental factors in the first year were used to predict assemblage characteristics for the subsequent two years. The accuracy of these predictions was then tested against the actual data obtained for the second and third years. Habitat stability and water velocity were the strongest predictors for total abundances (52% of the variance in observed values explained by the predicted values), followed by community persistence (30%, predicted from water temperature) and species aggregation (25%, habitat stability and heterogeneity). Mean spatial resource width, evenness and β -diversity accounted for 14% predictability each, with again habitat stability as the dominant explanatory variable. In contrast, predictability was much higher among community attributes which accounted for up to 80%. Since the slopes of the relationships were not significantly different between the years, deviations from the predictions were mainly due to differences in absolute values of community attributes. Comparisons of multivariate patterns in these relationships, obtained from Redundancy analyses by means of Procrustes analyses, showed no significant differences between the years. However, univariate and multivariate tests suggested a marked annual change in community composition, mainly with respect to patterns in dominance structure due to the replacement of the most abundant species. On the basis of discriminant functions obtained from environmental factors in the first year, 90% of all samples from the two subsequent years were correctly classified to the four sampling sites, and correct classification on the basis of community attributes accounted for 52% where evenness provided the highest discriminatory significance. It is concluded that most relationships, especially those among community attributes, were consistent for the three years. Because shifts in abundant species were reflected neither by total abundances nor by species richness, estimation of dominance structure has to be an essential tool for management purposes. Long-term investigations like this provide valuable information on the base-line variation of natural communities in terms of a data-basis for testable ecological theories and management strategies.

4) Ecology of five species of salmonids and *Thymallus thymallus* (L.):

"Egg size relationships in five species of salmonids and *Thymallus thymallus* (L.)" (Projekt Gemeinde Wien)

Characteristics of reproductive products like egg volume, egg number and alevin size in relation to female size were studied for six species in order to detect similar or different life-history strategies. Interspecific variations in fecundity and egg volume were considered. Moreover, the positive relationship between alevin dry weight and egg dry weight for all species presented indicates that heavier fry emerge from bigger eggs. In *Salvelinus fontinalis* and *Salvelinus alpinus*, both absolute fecundity and egg volume increases with body size. Significant relationships between number of eggs and female length were shown for *Salmo trutta* and *Oncorhynchus mykiss*. Furthermore, egg volume correlated significant to parental length for *Hucho hucho* and *Thymallus thymallus*. An inverse correlation between egg volume and egg number were found for *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss* and *Thymallus thymallus*.

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

1) Fractals in Stream Ecosystems (Fraktale Geometrie und Skalierung in benthischen Ökosystemen): FWF-Projekt 15597-B03: Fortführung und Abschluss

2) Biodiversity of the macrozoobenthos in a large river, the Austrian Danube:

Langzeittrends: Um eine längerfristige Entwicklung in der Biodiversität der bodenlebenden Organismen der Stromsohle der Donau im Raume Wien darzustellen, sollen die Jahre 1996 bis 1998 auf der Basis der Ergebnisse des ersten Untersuchungsjahres 1995/96 analysiert werden. Es wird getestet, ob die aus den Modellen des Untersuchungsjahres 1995/96 prognostizierten Werte, durch die Ergebnisse der Jahre 1996 bis 1998 verifiziert werden können. Letzteres würde den Modellen einen allgemein-gültigen Stellenwert einräumen.

Einwanderung neuer Bodentierarten: Für die Jahre 1995 bis 1998 liegt aus Untersuchungen, die von der Stadt Wien gefördert wurden, ein umfangreiches, quantitativ erfasstes, zur Art bestimmtes Material von Bodentieren der freien Fließstrecke der Donau vor. Aus dem vorliegenden Material soll zunächst eine Artenliste erstellt werden, die die „Einwanderer“ ausweist - qualitativer Aspekt. Weiters soll das Verhältnis zur heimischen Fauna erfasst und über die 3 Untersuchungsjahre verfolgt werden - quantitativer Aspekt. Daraus ließen sich eventuelle Fluktuationen (Zu- oder Abnahmen) im Verhältnis zur heimischen Lebewelt feststellen, mögliche Managementmaßnahme ließen sich über die autökologischen Ansprüche der einzelnen Arten ableiten. (Projekt bei Gemeinde Wien eingereicht)

Ecology of five species of salmonids and *Thymallus thymallus* (L.): Das Wachstum der Äsche in Gewässern im Raum Wien, in Abhängigkeit der Wassertemperatur – quantitative Modellanalyse – Dazu liegt Datenmaterial über das Wachstum des Alevinstadiums von 5 Salomidenarten und der Äsche vor, das jetzt analysiert wird. Weiters: die umfangreiche Diplomarbeit aus dem Jahre 1996, die für die Vergabe des Reinhard-Liepolt-Preises als würdig befunden wurde und 1997 als Buch herauskam (Dujmic, A. 1997 Der vernachlässigte Edelfisch: Die Äsche. Facultas, Wien. 111pp.) hat gezeigt, dass quantitative Daten über das Wachstum und die Populationszusammensetzung der Äsche – Voraussetzungen für das wissenschaftliche Management dieses Fisches in unseren Gewässern – weitgehend fehlen. Zu diesen Fragen liegen nun Untersuchungen aus 3 Jahren aus dem Freiland vor. Da bei den „wechselwarmen“ Fischen das individuelle Wachstum, Überlebensrate und Fortpflanzungserfolg neben Futter- und Habitatverfügbarkeit eng an artspezifische Temperaturoptima gebunden ist, wurde von Mallet et al. (1999) ein temperaturabhängiges Wachstumsmodell entwickelt. Dieses neue Modell beruht auf der Wachstumsformel nach von Bertalanffy (1938) und besagt die Abhängigkeit des Wachstumskoeffizienten von der täglichen Wassertemperatur. Frühere Autoren (Pitcher & MacDonald 1973, Pauli & David 1981) konnten zwar die Wassertemperatur als Variabilitätsmaß für die saisonelle Änderung der Wachstumsrate in dem Wachstumsmodell von Bertalanffy (1960) integrieren, ihre Beschreibungen waren aber oberflächlich und ungenau. Im Gegensatz dazu beschreibt das neue Modell von Mallet et al. (1999) das Wachstum der Ain-Äschen (Frankreich) sehr gut. Bisher wurde dieses Modell aber nur dazu verwendet, um das Äschenwachstum zu beschreiben. Ob Vorhersagen aufgrund dieses Modells mit tatsächlichem Äschenwachstum in anderen Gewässern innerhalb eines 95% Vertrauensbereichs liegen, wurde bisher nicht untersucht. Umfangreiche, experimentelle Daten über die Eientwicklung und 0+ Äschen liegen (Humpesch 1985; Purtscher & Humpesch in prep.) bereits vor. Um Modelle über das Wachstum von älteren Individuen zu testen bzw. zu entwickeln werden die Parameter L_{∞} (asymptotische Länge) k (Wachstumskoeffizient) und die Wassertemperatur benötigt. Der theoretische Ansatz von Mallet wird dann mit Freilanddaten überprüft, um Parameter für den Selbsterhalt von Populationen festzulegen und so der Fischereiwirtschaft ein auf wissenschaftlichen Grundlagen beruhendes Instrumentarium für die Bewirtschaftung an die Hand zu geben. (Projekt Gemeinde Wien € 4.000).

5) Untersuchungen zum Laubabbau und Fließgewässerökologie subtropischer Gewässer (**Leichtfried**, mit Kooperationspartnern):

- Abschlussarbeiten im Rahmen der „Wissenschaftlich – Technologischen Zusammenarbeit Polen / Österreich“ (WTZ Polen/Austria) zum Thema „Leaf litter decomposition and its ETS (Electron Transport System) activity in two mountain stream systems (Austria and Polen)“.
- Arbeiten im Rahmen der Zusammenarbeit mit der TU Berlin, Institut für Umweltmikrobiologie, an den Fließgewässern des Nationalparks Unteres Odertal über die Diversität der aquatischen Pilze.
- Ökologische Untersuchungen an zwei Fließgewässern in Sri Lanka: Yan Oya, ein saisonaler Zufluss des Hurulu-Wewa Reservoirs in der „dry zone“ von Sri Lanka und Eswathu Oya, ein perennierender Zufluss der Kelani Ganga in der bergigen „wet zone“ von Sri Lanka im Rahmen des „IRESA (Initiative in River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application) Projektes“.

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

- Tätigkeit im Rahmen des bewilligten Projektes "IRESA – Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application“ an zwei Fließgewässern Sri Lankas in Zusammenarbeit mit der Universität Innsbruck und University of Kelaniya, Sri Lanka.
- Verstärkt Arbeiten zur Kenntnis der aquatischen Hyphomyzeten und ihrer Rolle in den Biofilmen der Fließgewässerökosysteme in Zusammenarbeit mit der TU Berlin.
- Tätigkeit im EU-Projekt: Network of Excellence on „A Long-term Biodiversity, Ecosystem and Awareness Research Network“ (ALTER – NET Region Eisenwurzen).

F. Forschungsprojekte in der Angewandten Limnologie

Mehrere Projekte innerhalb des IPGL-Kurses (s. folgende Seiten), die z. T. in die Grundlagenforschung des Instituts eingebunden sind (s. S. 25), sind primär der Angewandten Limnologie zuzuordnen.

Das Projekt '*Typspezifische Referenzbedingungen für die integrierende Bewertung stehender Gewässer Österreichs entsprechend der EU-Wasserrahmenrichtlinie*' (WRRL) im Auftrag des BMLFUW wurde endgültig abgeschlossen (Leitung: M. Dokulil, s. S. 11)

Neu begonnen wurde die vergleichende limnologische Untersuchung der Tagebaurestseen der Gemeinde Langau (NÖ). Diese Freilanduntersuchungen sollen die im Berichtszeitraum durchgeführten Laborexperimente zur pH-Toleranz und pH-Einnischung von Protisten (Weisse, Stadler, Kiesenhofer, Schamberger, s. S. 35) ergänzen. Die Voruntersuchungen konzentrierten sich auf einen See, der mit einem pH-Wert von 2.6-2.8 und hohen FeS-Konzentrationen viele Gemeinsamkeiten mit ähnlichen Seen in dem ehemaligen Braunkohleabbaugebiet in der Lausitz (D) aufweist. Langau bietet für die Untersuchung der Besonderheiten der sauren Seen einen Standortvorteil, weil hier zwei Seen vergleichbaren Alters, die nur durch einen Damm getrennt sind, sich um >4 pH-Einheiten im Epilimnion unterscheiden. Aus dem sauren See konnten sowohl die dominante Algenart (*Chlamydomonas cf. acidophila*) als auch die dominante Rotatorienart (*Cephalodella cf. hodium*) isoliert werden. Ein Projektantrag zur Finanzierung der für 2006 geplanten Freilandarbeiten wurde beim BMLFUW eingereicht.

Vorschau für 2006 und Planung für 2007

Die Fortführung des Projektes ist von der noch ausstehenden Genehmigung des Projektantrages abhängig.

G. Internationaler Postgraduierten-Lehrgang Limnologie (IPGL-Kurs)

Insgesamt wurden 43 WasserexpertInnen aus Entwicklungsländern von IPGL betreut und die entsprechenden akademischen Aus/Weiterbildungsprogramme von IPGL organisiert und durchgeführt.

Das 6-monatige IPGL-Kursprogramm wurde mit 9 TeilnehmerInnen durchgeführt, davon wurden 3 Teilnehmer extern finanziert (WB, DANIDA, self-funding). Zwölf extern finanzierte TeilnehmerInnen nahmen an IPGL-Kursmodulen teil (short-course participants) und eine Teilnehmerin absolvierte das Weiterbildungsprogramm für wissenschaft.-techn. Angestellte. Im September/Oktober wurde das IPGL-Kursmodul "Tropical Limnology" mit 14 TeilnehmerInnen an Egerton University und Sagana-Fish-Farm in Kenia durchgeführt (Abb. 16). Der thematische Schwerpunkt lag im Studium der Struktur und Funktion von tropischen Ökosystemen, dem nachhaltigen Management von aquatischen Ressourcen und typischen Umweltnutzungsproblematiken in Entwicklungsländern (Interaktion von menschlichen Nutzungsansprüchen und Umweltschutz/Naturschutzaspekten).



Abb. 16. A (links): TeilnehmerInnen des Kursmoduls „Tropical Limnology“ in Kenia. B (rechts): M.Sc. Ausbildung am Institut für Limnologie, Mondsee.

Sieben Diplomarbeiten wurden erfolgreich in Afrika und Österreich durchgeführt (Uganda, Kenia, Äthiopien, Tansania, China) und allen DiplomandInnen wurde der akademische Titel "Master of Science" im verliehen (Februar 2005 & Oktober 2005).

Das umstrukturierte Master-Programm „Limnology & Wetland Ecosystems" erhielt die M.Sc. Akkreditierung vom niederländischen Wissenschaftsministerium.

Wissenschaftliche Arbeiten & Projekteinreichung im Rahmen des IPGL-Kurses:

Sieben Diplomarbeiten wurden von österreichischer Seite organisiert und erfolgreich abgeschlossen. Die Ergebnisse von drei IPGL Diplomarbeiten wurden in internationalen Fachjournalen publiziert. An Projekten wurden beantragt:

- 3-Jahres-Projektantrag an Austrian Development Agency (ADA); International Post-Graduate Training Programme in Limnology; EZA 612-00/2005-2007); Projektsumme € 985.433,- Das Projekt wurde im April 2005 genehmigt.
- Projektanbahnung für INCO-Dev Projekteinreichung an Bm:bwk; Integrating BOMOSA Cage-Farming System in Reservoirs, Ponds and Temporary Water Bodies in Eastern Africa; Bm:bwk-360.057/0052/VI/5/2005; Projektsumme € 1.173,--; das Projekt wurde im Mai 2005 genehmigt.
- EU-Projektantrag, Framework-6 (INCO-Dev, STREP): BOMOSA Cage-Farming System in Reservoirs, Ponds and Temporary Water Bodies in Eastern Africa; Projektnummer 032103; Projektsumme € 1.582.818,--; das Projekt wurde im Dezember 2005 von der EU-Evaluierungskommission zur Genehmigung empfohlen und die finanziellen Verhandlungen werden am 13. Februar 2006 in Brüssel stattfinden.
- EU-Projektantrag (EU – ASIA PRO ECO-II Post-Tsunami programme): Rehabilitation of the Aquatic Environment and Promotion of Improved Wastewater Management Systems in Tsunami Affected Coastal Towns in Sri Lanka; Projektnummer AIDCO/D3/86; Projektsumme € 746.164,50; das Projekt wurde im Dezember 2005 aus Formalgründen abgelehnt.

Vorschau für 2006 bis 2008

- Durchführung des IPGL-Programmes mit 90 TeilnehmerInnen.
- Durchführung von 15 IPGL-Diplomarbeiten.
- Organisation einer wissenschaftlichen Konferenz in Ostafrika mit ca. 200 TeilnehmerInnen anlässlich des 30. IPGL-Kursjubiläums in 2006; Projekteinreichung erfolgt im April 2006.
- Ausbau der „East African –Water Association (EAWA)“.
- Durchführung des EU-Projektes BOMOSA (2006-2008).
- Aufbau von weiteren Kursmodulen in Ostafrika.
- Akademischen Akkreditierung der IPGL-Programme in Österreich und Ostafrika. Weitere Projekteinreichungen (UNDP/GEF; EU).

2.4 Bewertung Übereinstimmung / Abweichung vom Mittelfristigen Forschungsprogramm

Die im vorigen Kapitel dargestellten Forschungsarbeiten wurden fast ausschließlich im Rahmen von international begutachteten, vom FWF oder gesamteuropäischen Institutionen geförderten Projekten durchgeführt. Die Institutsleitung achtet vor der Projekteinreichung darauf, dass die beantragten Projekte sich in den gemeinsamen, im Mittelfristigen Forschungsprogramm formulierten, Schwerpunkt einnischen. Die Wechselwirkungen zwischen den Habitaten und den Organismen und die Prozesse, die bei der Artbildung eine Rolle spielen, werden nunmehr von den Gewässerbakterien über die Flagellaten und Ciliaten unter den Protozoen, bei diversen Evertebraten im Benthos und Grundwasser bis hin zu den Fischen bearbeitet. Die verschiedenen Untersuchungen an Cyanobakterien ("Blualgen") verdeutlichen, wie anhand eines Modelorganismus die verschiedenen Ebenen der Diversität von den Molekülen (Gene und Proteine, Kurmayer), über einzelne Zellen (Falkner) und Populationen (Weisse) bis hin zu Gemeinschaften (Dokulil) bearbeitet werden. Ähnliche Fragestellungen werden bei den heterotrophen Bakterien (Hahn) und den Protozoen, d. h. bei den Flagellaten (Boenigk) und Ciliaten (Weisse) verfolgt. Der Einfluss der Struktur des Habitats lässt sich besser an benthischen (=Boden-) Organismen erkennen, wie sie in der Fließgewässerökologie (Humpesch, Leichtfried) untersucht werden, als an Planktonorganismen. Die am Gewässergrund oder in dessen Nähe laichenden pelagischen Fische (Wanzenböck) verkörpern ein drittes Muster bezüglich ihrer Bindung an das Habitat. Die paläolimnologischen (Schmidt) und evolutionsbiologischen Untersuchungen (Danielopol) fügen weitere Dimensionen hinzu, in dem sie die (kurzzeitigen) Diversitätsuntersuchungen der rezenten Organismen um langfristige Zeitskalen ergänzen.

Demzufolge ist die Übereinstimmung mit den im Mittelfristigen Forschungsprogramm genannten Zielen generell sehr groß. Weiters ist es im Berichtszeitraum gelungen, die Integration dreier auf dem Gebiet der Klimaforschung tätigen Projekte (EU-Projekt CLIME, Dokulil; ESF-Projekt DecLakes, Danielopol, Paläolimnologie-Projekt, Schmidt) zu fördern und eine unmittelbare Vernetzung zu einem Projekt aus der Mikrobiellen Ökologie herzustellen (FWF-Projekte Schmidt und Boenigk). Die Auswirkungen der im CLIME-Projekt bearbeiteten rezenten Klimaänderungen auf die aquatischen Ökosysteme können nunmehr mit dem von den beiden paläolimnologischen Projekten bearbeiteten historischen Klimawandel verglichen werden. Da die Klimarekonstruktion, z. B. im späten Pleniglazial (FWF-Projekt Schmidt), auf Grund von Transferfunktionen berechnet wird, die an den Umweltansprüchen rezenter Arten kalibriert werden, sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Artbildung und Artdefinition der rezenten Chrysophyceen (FWF-

Projekt Boenigk) oder die Untersuchungen zur Entwicklung und Bedeutung der lokalen Adaptation von (Cyano-)Bakterien (Projekte Kurmayer, Hahn) und Ciliaten (FWF-Projekt Weisse) für die Paläolimnologie von großer Bedeutung. Das Institut für Limnologie ist die einzige Forschungseinrichtung in Österreich und weltweit eine der wenigen, in der die Mechanismen der Artbildung und die Probleme der Artdefinition von den Prokaryonten (Bakterien) über die Protisten (Flagellaten, Ciliaten, 'Algen') und Evertebraten (z. B. Crustaceen, Insekten) bis hin zu Vertebraten (Fischen) auf den verschiedenen Ebenen der Diversität untersucht werden.

2.5 Vorschau auf die weitere wissenschaftliche Tätigkeit 2006 – 2011

Die Vorhaben für den derzeit überschaubaren Zeitrahmen des laufenden und kommenden Jahres wurden im Kap. 2.3 dargelegt. Wie schon im ersten Kapitel angesprochen, ist eine zuverlässige Vorschau auf die weitere Entwicklung der wissenschaftlichen Tätigkeit des Instituts für Limnologie angesichts der in den Jahren 2007-2009 anstehenden Pensionierungen und der großen Planungsunsicherheit bezüglich des Institutshaushalts und des Schicksals des Gebäudes in Mondsee derzeit nicht möglich. Der Wunsch der Institutsleitung und seiner Mitarbeiter(innen) ist, die begonnene Entwicklung hin zu einer international auf dem Fachgebiet führenden Institution konsequent weiter zu verfolgen und der limnoökologischen Forschung i. w. S. neue Perspektiven zu erschließen. Dies kann jedoch nur unter folgenden Voraussetzungen gelingen:

- Sanierung und Ausbaus des Laborgebäudes in Mondsee
- Erhalt des jüngeren, international hoch kompetitiven Stammpersonals
- Nachbesetzung der ausscheidenden Wissenschaftlerstellen mit innovativen, international konkurrenzfähigen Wissenschaftler(innen), die zur
- Erweiterung des gegenwärtigen Forschungsgebietes im Hinblick auf allgemeine ökophysiologische und evolutionsökologische Fragestellungen

führen soll. Um diese ehrgeizigen Ziele zu erreichen, sind, neben der entsprechenden finanziellen Dotierung, ein weiter verbessertes Management seitens der ÖAW , verbunden mit einer mehrjährigen Planungssicherheit für das Institut, unabdingbare Voraussetzungen.

2.6 Personalstand 2005

Name	Funktion	Anstellungsverhältnis	Finanzierung	Beschäftigungsausmaß (in % Vollbesch.)	Beschäftigungsdauer (in Monaten), (a) = ausgeschrieben
BOENIGK Jens	Dr., Ass.	AKA		100	
CHRISTIANSEN Guntram	Dr., Ass.	AKA	FWF18185	100	3
DANIELOPOL Adriana	Mag., wiss. Ang.	AKA		85	
DANIELOPOL Dan Luca	Prof. Dr., Ass.	AKA		100	
DICKBAUER Ulrich	wiss. Ang.	AKA	EUP 0069 CLIME	50	2 (a)
DOKULIL Martin	Prof. Dr., Ass.	AKA		100	
EISL Liselotte	wiss. techn.	AKA		100	
FALKNER Gernot	Prof. Dr., Ass.	AKA		100	
FALKNER Renate	Dr., wiss. Ang.	AKA	FWF6237	100	
FINSTER Martin	Mag., wiss. Ang.	AKA	ÖAW9206	55	1
GRADL Ingrid	Sekretärin	AKA		100	
GREISBERGER Sonja	Mag., wiss, Ang.	AKA	EUP 0069 CLIME	60	12 (a)
GÄCHTER Elke	Mag., wiss.Ang.	AKA	FWF6796	75	6
HAHN Martin	Dr., Ass.	AKA		100	
HÖLLERER Hannes	Techniker	AKA		100	
HUMPESCH Uwe	ORat, Prof. Dr., Ass.	B		100	
KAIBLINGER Christina	Mag.	AKA	EUP 0069 CLIME	70	
KNOBLECHNER Josef	wiss. techn.	AKA	FWF17738	100	
KNOLL Johann	wiss. techn.	AKA		75	

KRONSTEINER Ernestine	wiss. techn.	AKA		Altersteilzeit	2 (a)
KURMAYER Rainer	Dr., Ass.	AKA		100	
LEICHTFRIED Maria	ORat Dr., Ass	B		100	
MAIER Karl	wiss. techn.	AKA		100	
MAYRHOFER Kurt	Techniker	AKA		100	
MINATI Klaus	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWF17738	75	
MITROVIC Nevenka	Dipl.-Ing.	AKA	FWF18185	100	2 (a)
NAMIOTKO Tadeusz	Dr., wiss. Ang.	AKA	FWFI35B06	100	2 (a)
PAMMINGER-LAHNSTEINER Barbara	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWFL229B1 2	100	9
PFANDL Karin	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWF5940	70	
PICHLER Maria	Mag., wiss. Ang-	AKA	FWF6796	50	
PLOYER Harald	wiss. techn.	AKA		100	
PÖCKL Mathias	wiss. techn.	AKA		100	12 (a)
ROIDMAYR Gertraud	wiss. techn.	AKA	EUP 0071 FWFI35B06	50 100	6 6
ROTH Monika	Wiss. Ang.	AKA		5	8
SCHEFFEL Ulrike	Dipl.-Biol., wiss.Ang.	AKA	FWF 6796	75	
SCHMIDT Johanna	wiss. techn.	AKA	FWF5709 (9 Mo) Institut (3 Mo)	100	
SCHMIDT Roland	Prof. Dr., Ass., stellv. Dir.	AKA		100	
SCHOBER Eva	Mag., wiss. Ang:	AKA	EUP 0071	70	9 (a)

STADLER Peter	Techniker	AKA		100	
STEINKOGLER Hildegard	Reinigung	AKA		100	
STRACKE Anika	wiss. techn.	AKA		100	12 (a)
TEUBNER Katrin	Dr., wiss. Ang.	AKA	EUP 0069 CLIME	100	
UNTERSBERGER Gertrude	Reinigung	AKA		Altersteilzeit	1 (a)
WANZENBÖCK Josef	Doz. Dr., Ass.	AKA		100	
WANZENBÖCK Sabine	Dr., Kurs- sekretaria t	AKA	ADA	70	
WEISSE Thomas	Prof. Dr., Direktor	AKA		100	
WERNDL Michael	Mag., wiss. Ang.	AKA	FWF18185	85	2,5
WIEDLROITHER Anneliese	wiss. techn.	AKA	FWF5940	50	
WINKLER Gerold	Mag., Kursleiter	AKA	ADA	100	
Wu Qinglong	Dr., wiss. Ang.	AKA	FWF 5655	100	3 (a)

2.7 Publikationen 2005

2.7.1 Veröffentlichungen

Originalbeiträge in begutachteten, internationalen Fachorganen:

(Institutsmitarbeiter im Fettdruck, Projektmitarbeiter und Examenskandidaten unterstrichen; •Publikationen in Journalen, deren 'Impact factor' 2004 >1 war)

- **Boenigk J** (2005) Some remarks on strain specificity and general patterns in the ecology of Spumella (Chrysophyceae). *Nova Hedwigia* 178: 167-178.
 - **Boenigk J**, Pfandl K, **Stadler P**, Chatzinotas A (2005a) High diversity of the “Spumella-like” flagellates: An investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environ. Microbiol.* 7:685-697
 - **Boenigk J**, Wiedroither A, Pfandl K (2005b) Heavy metal toxicity and bioavailability of dissolved nutrients to a bacterivorous flagellate are linked to suspended particle physical properties. *Aquat. Toxicol.* 71: 249-259.
- Callieri, C., Moro, S., Crosbie, N.D. & **Weisse, T.** (2005) Strain-specific photosynthetic response of freshwater picocyanobacteria. *Verh. int. Ver. Limnol.* 29: 777-782.
- Camacho, A., C. Rochera, J.J. Silvestre, E. Vicente & **Hahn, M.W.** (2005) Spatial Dominance and Inorganic Carbon Assimilation by Conspicuous Autotrophic Biofilms in a Physical and Chemical Gradient of a Cold Sulfurous Spring: The Role of Differential Ecological Strategies. *Microb. Ecol.* 50: 172 - 184..
- Chen, Y., Hu, Y. & **Dokulil, M.T.**, 2005. Phytoplankton photosynthesis and plankton community respiration in a large shallow lake, Taihu China. - *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29, 395-398.
- **Dokulil, M.T.** & Teubner, K. (2005a) The global warming versus re-oligotrophication controversy in lakes: Can effects on phytoplankton be disentangled? – *Phycologia* 44 (Suppl.), 28-29.
 - **Dokulil, M.T.** & Teubner, K. (2005b) Do phytoplankton assemblages correctly track trophic changes? – Assessment from contemporary and palaeolimnological data. *Freshwater Biology* 50, 1594-1604.
- Fesl, C. & **Humpesch, U. H.** (2005). Biodiversität des Makrozoobenthos der österreichischen Donau unter Berücksichtigung quantitativer Befunde der Freien Fließstrecke unterhalb Wien. *Denisia* 16: 139-158.

- Foissner, W., Müller, H. & **Weisse, T.** (2005). The unusual, Lepidosome-coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea) 1. Light and scanning electron microscopy, cytochemistry. *Acta Protozool.* 44: 201-215.
- Gassner, H, **J. Wanzenböck**, D. Zick, G. Tischler & **B. Pamminer-Lahnsteiner** (2005): Development of a fish based lake typology for natural Austrian Lakes > 50 ha based on the reconstructed historical fish communities. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 90: 422-432.
- **Hahn, M.W., M. Pöckl & Wu, Q.L.** (2005) Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4539–4547.
 - **Hahn, M.W. & Pöckl, M.** (2005) Ecotypes of planktonic *Actinobacteria* with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 766–773.
 - Jeppesen, E., Søndergaard, M., Jensen, J.P., Havens, K., Anneville, O., Carvalho, L., Coveney, M.F., Deneke, R., **Dokulil, M.T.**, Foy, B., Gerdeaux, D., Hampton, S.E., Kangur, K., Köhler, J., Körner, S., Lammens, E., Lauridsen, T.L., Manea, M., Miracle, R., Moss, B., Nöges, P., Persson, G., Phillips, G., Portielje, R., Romo, S., Schelske, C.L., Straile, D., Tatrai, I., Willén, E. & Winder, M., 2005. Lake responses to reduced nutrient loading – an analysis of contemporary long term data from 35 case studies. *Freshwater Biology* 50, 1747–1771.
- Kaiblinger, C., Teubner, K. & Dokulil, M.T., 2005. Comparative assessment of phytoplankton photosynthesis using conventional ¹⁴C-determination and Fast Repetition Rate Fluorometry in freshwaters. - *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29, 254-256.
- **Kamenik C. & R. Schmidt** (2005a). Chrysophyte resting stages: a tool for reconstructing winter/spring climate from Alpine lake sediments. *Boreas* 34: 477-489.
 - Kamenik C. & **R. Schmidt** (2005b). Computer-aided SEM analysis of Chrysophyte stomatocysts. *Nova Hedwigia, Beihefte* 128: 269-274.
 - Kamenik C., K.A. Koinig & **R. Schmidt** (2005). Potential effects of pre-industrial lead pollution on algal assemblages from an Alpine lake. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 29: 535-538.
 - **Kurmayer, R.**, Christiansen, G., Gumpenberger, M., Fastner J. (2005) Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology* 151: 1525-1533.
- Liti, D.M., Fulanda, B., Munguti, J.M., Straif, M., Waidbacher, H. & **Winkler, G.** (2005). Effects of open-pond density and caged biomass of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*

L.) on growth, feed utilization, economic returns and water quality in fertilized ponds. *Aquaculture Res.* 36: 1535-1543.

Liti D., Munguti J., Kreuzinger N. & H. Kummer (2005). Effects of sodium chloride on water quality and growth of *Oreochromis niloticus* in earthen ponds. *Afr. J. Ecol.* 43, 3, 170-176.

Mikheev, V.N., A.F. Pasternak, G. Tischler & **J. Wanzenböck** (2005): Contestable shelters provoke aggression among 0+ perch, *Perca fluviatilis*. *Environ. Biol. Fish.* 73: 227-231.

Namiotko, T., Marmonier, P. & **Danielopol, D.L.** (2005). *Cryptocandona keferi* (Crustacea, Ostracoda): redescription, morphological variability, geographical distribution. *Vie Milieu* 55: 91-108.

- Plaetzer, K., Thomas, S.R., Falkner, R. & **Falkner, G.** (2005) The microbial experience of environmental phosphate fluctuations. An essay on the possibility of putting intentions into cell biochemistry. *J. Theor. Biol.* 235: 540-554.

- Schauer, M., Kamenik, C. & **Hahn, M.W.** (2005) Ecological Differentiation within a Cosmopolitan Group of Planktonic Freshwater Bacteria (SOL Cluster, *Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*). *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5900-5907.

- Schauer, M. & **Hahn, M.W.** (2005) Diversity and phylogenetic affiliations of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1931-1940.

Sekadende, B.C., Lyimo, T.J., & **Kurmayer, R.** (2005) Microcystin production by cyanobacteria in the Mwanza Gulf (Lake Victoria, Tanzania). *Hydrobiologia* 543: 299-304.

- Šimek, K., Hornák, K., Jezbera, J., Masín, M., Nedoma, J., Gasol, J.M. & Schauer M. (2005) Influence of Top-Down and Bottom-Up Manipulations on the R-BT065 Subcluster of β -Proteobacteria, an Abundant Group in Bacterioplankton of a Freshwater Reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2381-2390.

- Statzner, B., Mérioux, S., & **Leichtfried, M.** (2005) Mineral grains in caddisfly pupal cases and stream bed sediments: Resource use and its limitation through conflicting resource requirements.- *Limnol. Oceanogr.* 50: 713–721.

- Stoeck T, Schwarz MVJ, **Boenigk J**, Schweikert M, von der Heyden S & Behnke A (2005) Cellular identity of a novel 18S rRNA sequence clade within the class Kinetoplastea: the novel genus *Actuariola* gen. nov. (Neobodonida) with description of the type species *Actuariola framii* sp. nov. *Int J Sys Evol Microbiol* 55:2623–2635.

Thompson, R., C. Kamenik & **R. Schmidt** (2005). Ultra-sensitive Alpine lakes and climate change. *J. Limnol.* 64: 139-152.

- **Weisse, T.** & Rammer, S. (2006): Pronounced ecophysiological clonal differences of two common freshwater ciliates, *Coleps spetai* (Prostomatida) and *Rimostrombidium lacustris* (Oligotrichida), challenge the morphospecies concept. - J. Plankton Res. **28**: 55-63 (published online by JPR Advance Access on November 23, 2005, doi:10.1093/plankt/fbi100).

Manuskripte in press/Publikationen 2006:

- **Christiansen, G., Kurmayer, R., Liu, Q., Börner, T.** (2006) Transposons inactivate the biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. Applied and Environmental Microbiology 72: 117-123.
- Müller, H., Foissner, W. & **Weisse, T.** (2006): The role of soil in the life cycle of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): experiments with two clonal strains from the type locality, an astatic meadow pond. - Aquat. Microb. Ecol.: (in press).
- **Schmidt R., C. Kamenik, R. Tessadri & K.A. Koinig** (2006). Climatic changes from 12,000 to 4,000 years ago in the Austrian Central Alps tracked by sedimentological and biological proxies of a lake sediment core. J. Paleolim.: (in press).

Weisse, T. (2006). Biodiversity of freshwater microorganisms - achievements, problems, and perspectives. In: GLIWICZ, Z. M., MAZURKIEWICZ-BORON, G. & ROUEN, K. (eds.): Reviewing European Freshwater Sciences, 2005 - Pol. J. Ecol. -, pp. (in press).

Wu, Q.L., and **M.W. Hahn.** (2006) Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake revealed at three phylogenetic levels. FEMS Microb. Ecol. (in press).

Buchbeiträge:

Danielopol, D.L. & P. Pospisil, 2005. Why and how to take care of subterranean aquatic microcrustaceans? In J. Gibert (Ed.) World subterranean biodiversity, UMR-CNRS, Lyon, pp. 29-35.

Dokulil, M.T., Kirschner, A.K.T. & Wolfram, G. (2005). Produktion aquatischer Systeme. Einleitung. – In: C. Steinberg W. Calmano, . Klapper & R.-D. Wilken (Hg.), Handbuch angewandte Limnologie, IV-9.1: 3-4, 21. Erg. Lfg, 4/05, ecomed, Landsberg.

Dokulil, M.T., Teubner, K. & Kaiblinger, C. (2005). Produktivität aquatischer Systeme. Primärproduktion (autotrophe Produktion). - In: C. Steinberg, W. Calmano, H. Klapper & R.-D. Wilken. (Hg.), Handbuch angewandte Limnologie, IV-9.2, 1-30, 21. Erg. Lfg, 4/05, ecomed, Landsberg.

Symposiumsbeiträge, Berichte, Buchbesprechungen, Abstracts, Sonstiges:

Danielopol, D.L., 2005. Cladocera: the genus Daphnia (J.A.H. Benzie), Crustaceana 78: 1023.

Eisenreich, S.J., Bernansconi, C., Campostrini, P., De Ron, A., George, G., Heiskanen, A.-S., Hjorth, J., Hoepffner, N., Jones, K.C., Noges, P., Pirrone, N., Runnalls, N., Somma, F., Stilanakis, N., Umlauf, G., van de Bund, W., Viaroli, P., Vogt, J., Zaldivar, J.-M., Algieri, A., Beaugrand, G., Bidoglio, G., Blenckner, T., Bouraoui, F., Cinnirella, S., Vole, G., Cornell, S., Demuth, S., **Dokulil, M.T.**, Giordani, G., Hedgecock, I., Lavelle, C., Marsh, T., Mostajir, B., Niemeyer, S., Nykjaer, L., Raes, F., Reynard, N., Straile, D., Thielen, J., Tomasin, A., Trombino, G. (2005). Climate Change and the European Water Dimension. - European Comm., Joint Res. Centre, EUR 21553, Ispra, Italy, 253 pp.

EU-Projekt PEPCY (2005) Jahresbericht, Berichtszeitraum 1.12.03-30.11.2004, 72 pp.

FÜREDER, L., LEICHTFRIED, M., AMARASINGHE, U.S., WELIANGE, W.S., 2005: IRESA – Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application.- Proc. 11th Ann. Scient. Sessions of the SLAFAR, June 2005: 11

Kurmayer, R. (2005) Dreckige Gewinner. Team vom Mondsee erforscht die Karriere von Blaualgen. Universum April 2005, No4: 91.

Kurmayer, R., Christiansen, G., Fastner, J., Börner, T. (2005) Microevolution of toxin synthesis in cyanobacteria. XVII International Botanical Congress, Vienna, 17-23 August 2005, Abstract, p.191

Kurmayer, R. (2005) FWF Projekt, P15709, CYTOGENE, Cyanobacterial toxin production and genetic diversity, Endbericht, 21pp

Leichtfried, M., MROTZEK, M., FROTHE, A., WELLER, S., HUTTER C., POGO-SA, J.O., BAJARIAS J.G., WELIANGE, W.S., GÖLTENBOTH, F., 2005: Preliminary results of freshwater investigations at Lake Danao and the Inawasan River in the mid-mountain area of Leyte, Philippines.- Proc. 10th Int. Sem. and Workshop on Trop. Ecol., LSU Baybay, Leyte, Philippines: 52 – 59

Leichtfried, M. & T. FLEITUCH, 2005: Leaf litter decomposition and its ETS (Electron Transport System) activity in two stream ecosystems (Austria, Poland).- Abstract, Annual Meeting of NABS (North American Benthological Society).- NABS Bull. 22 (1): 442 – 443

Leichtfried, M. & T. FLEITUCH, 2005: Decomposition of leaf litter and its ETS (Electron Transport System) activity in two stream ecosystems in Austria and Poland.- Abstract,

PLPF 4 (4th Int. Meeting on Plant Litter Processing in Freshwater), Toulouse, France.-
Progr. and Abstr. P7: 40

Leichtfried, M. & W.S.WELIANGE, 2005: Limnological investigations on the Tubod River, Leyte, Philippines: from rain forest mountains to the Pacific ocean.- Abstract, SEFS 4 (4th Symposium for European Freshwater Sciences), Krakow, Poland.- Progr. and Abstr.: 98

Leichtfried, M., 2005: Energy basis of the consumer community in streams yesterday, today and tomorrow.....- Key note abstract, Symposium "River Bottom VI", Brno, Czech Republic.- Book of Abstracts: 36

FÜREDER L. & **M. Leichtfried**, 2005: IRESA - Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application.- Abstract, KEF-MDG+5 Workshop: "A critical look at the role of research in achieving the MDGs", Vienna, Austria.-

Schober, E., Christiansen, G., Fastner, J., Liu, Q., Börner, T., Kurmayer, R. (2005) Genetiv diversity in the production of small bioactive peptides in cyanobacteria. European Geosciences Union, General Assembly, Vienna, 24-29 April 2005, Abstract

Winkler G. (2005). Sustainability as added-value of integrated capacity enhancement programmes for approaching MDG's: IPGL - freshwater ecosystem research & management in developing countries. Artikel in „Conference proceedings – A Critical Look at the Role of Research in Achieving the MDGs“. 29. November 2005, Kommission für Entwicklungsfragen bei der ÖAW, Wien, Österreich.

2.7.2 Dissertationen

Chen, Y. (2005). Changes of phytoplankton structure, biomass and seasonality related to environmental health in Lake Tai Hu, China: A long-term approach. Univ. Wien, 56 S. (Dokulil).

Schauer, M. (2005). Unbeknownst giants: Sol bacteria, a cosmopolitan and important part of the freshwater bacterioplankton. Univ.Salzburg, 99 S.(Hahn¹).

Wu, Q. L. (2005). Intra-habitat heterogeneity of microbial food webs and microheterogeneity of bacterioplankton in lakes located in East China and Central Europe. Univ.Salzburg, 142 S.(Hahn).

¹ Name des Betreuers

2.7.3 Diplomarbeiten

- Akoll, P.* (2005). Prevalence and pathology of protozoan and monogenean parasites in fry and fingerlings from cultured *Clarias gariepinus* (Burchell 1882) in Uganda. (Betreuung in Österreich: Dr. R. Konecny, Univ. Wien; Betreuung in Uganda: Dr. J. Rutaisire, Makerere Univ.).
- Desta, K. A.* (2005). Distribution, abundance and feeding biology of fish species in Koka Reservoir and the associated Awash River floodplain, Ethiopia. (Betreuung in Österreich: Prof. Dr. H. Waidbacher & Mag. M. Straif, Univ. für Bodenkultur, Wien; Betreuung in Äthiopien: Dr. Z. Tadesse, National Fisheries and Other Living Aquatic Resources Research Center, Sebeta, Äthiopien)
- Dickbauer, U. (2005). Nährstoffaustrag aus dem Einzugsgebiet eines alpinen Sees. Univ. Wien, 79 S. (Dokulil²).
- Finster, M. (2005). Unterschiede hinsichtlich der Relation von Routine-Sauerstoffverbrauch und Körpergewicht des Flussbarsches (*Perca fluviatilis* L.) bei frühen Entwicklungsstadien. Diplomarbeit, Univ. Salzburg (Wanzenböck).
- Fungomeli, M.* (2005). Effect of varying feeding rates on the growth performance, feed utilization, water quality and economic returns of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in cage-cum-pond integrated culture using automated feeders" in Sagana, Kenya. (Betreuung in Österreich: Prof. Dr. H. Waidbacher, Univ. für Bodenkultur, Wien; Betreuung in Kenia: Dr. D. Liti, Moi University, Kenia).
- Kaggwa, M.* (2005). Influence of fish cage culture on nutrient dynamics and primary productivity in small man-made reservoirs - A case study in Machakos district, Kenya. (Betreuung in Österreich: Ass. Prof. Dr. M. Schagerl, Univ. Wien; Betreuung in Kenia: Dr. D. Liti, Moi University, Kenia).
- Kosol, S. (2005). Microcystins and anabaenopeptins, two structurally related toxic peptides in the cyanobacterium *Planktothrix* sp. Diplomarbeit, Univ. Salzburg, 87pp. (Kurmayer).
- Liu, Q.* (2005). Abundance of specific microcystin ecotypes in populations of *Planktothrix* spp. from some lakes in Austria and Germany. (Kurmayer).
- Moser, M. (2005). Ökophysiologische Diversität genetisch ähnlicher Picocyanobakterien. Univ. Salzburg, 75 S. (Weisse).
- Mushi, D.* (2005). Suitability of fecal indicators and their enumerating methods for monitoring stream and groundwater, Dar es Salaam, Tanzania. (Betreuung in Österreich: Dr. A. Farnleitner, Technische Univ. Wien; Betreuung in Tanzania: Prof. Dr. A. K. Kivaisi, Univ. Dar es Salaam und Dr. D. Byamukama, Makerere Univ.).
- Rongoei, P.* (2005). Assessment of the water cycle and nutrient flow to implement sustainable water reuse in Egerton University, Kenya. (Betreuung in Österreich: Dr. Norbert Kreuzinger, Technische Univ. Wien; Betreuung in Kenia: Dr. W. Shivoga, Egerton Univ.).

* Diplomarbeit im Rahmen des IPGL-Kurses

² Name des Betreuers

2.8 Wissenschaftliche Zusammenarbeit 2005

2.8.1 Zusammenarbeit mit in- und ausländischen Instituten

Name des Mitarbeiters	Partner (Name, Institution)	Projekt
Boenigk	Dr. G. Novarino (Natural History Museum, London, UK)	Morphologie und Taxonomie der Chrysomonaden
Boenigk	Dr. A. Chatzinotas (EPFL, Lausanne, Schweiz)	Molekulare Diversität der Chrysomonaden
Boenigk	Dr. P.J. Hansen (University of Copenhagen, Marine Biological Laboratory, Helsingør, Dänemark)	Überlebensstrategien von Flagellaten
Danielopol	Mag. S. Iepure (Speleologisches Inst., Cluj, Rumänien), Dr. T. Namiotko (Uni Gdansk Inst. f. Genetik), Dr. R. Pipik (Slowakische Akad, Inst. f. Geologie), Mag. B. Mindl (Universität Innsbruck) Prof. Dr. J. Linhart, Univ. Doz. Dr. R. Schabetsberger, Mag. W. Brauneis, W. Neubauer (Uni Salzburg), Univ.-Doz. Dr. M. Zuschin, Dr. G. Drozdowski, Dr. Pospisil, R. Buttinger (Uni Wien) Prof. Dr. W. Piller (Uni Graz) Univ.-Doz. Dr. G. Hoeck, Univ.-Doz. Dr. M. Harzhauser (Naturhist. Museum Wien) Prof. Dr. J. Gibert (Uni Lyon), Dr. C. Griebler (GSF Neuherberg, Inst f. Grundwasser Ökologie), Prof. Dr. A. Baltanás (UAM Madrid) Prof. Dr. P. Marmonier (Uni Rennes)	Taxonomische Biodiversität Morphometrie – Ostracoden Phylogenie der Crustaceen Grundwasser Ökologie, Grundwasserschutzpolitik
Dokulil, Teubner, Kaiblinger, Greisberger, Dickbauer	HR. Dr. Jagsch, Dr. Gassner u.a. (BA für Wasserwirtschaft, Institut für Gewässerökologie, Fischereiwirtschaft und Seenkunde, Scharfling)	EU-Projekte: CLIME
Dokulil, Teubner, Dickbauer	Prof. Psenner, Dr. Thies (Institut für Zoologie und Limnologie der Universität Innsbruck)	EU-Projekte: CLIME
Dokulil, Teubner	Dr. Donabaum, Dr. Wolfram, Mag. Kabas (Donabaum & Wolfram OHG)	Alte Donau

Dokulil, Teubner	Prof. Janauer, Dr. Schagerl (Institut für Ökologie und Naturschutz der Universität Wien, Abt. Hydrobotanik)	Neue Donau, Alte Donau, Studentenbetreuung
Dokulil, Teubner, Greisberger	Mag. Pall, Moser (Systema)	WRRL, Phase 3
Dokulil	Prof. Chen, Prof. Bo, Prof Chen Yuwei (Nanjing Institute of Geography and Limnology, Academia Sinica, Nanjing, VR China)	Limnologische Untersuchung Tai Hu
Dokulil	Prof. Alois Herzig (Biologische Station Illmitz)	Neusiedlersee, EU- Projekt: CLIME
Hahn	Dr. Paul Richardson (Joint Genome Institute (JGI), US Department of Energy, Walnut Creek, CA, USA) Dr. David Bruce (Joint Genome Institute (JGI), US Department of Energy, Walnut Creek, CA, USA) Dr. Giulio Petroni (Dipartimento di Etologia, Ecologia, Evoluzione, Università di Pisa, Pisa, Italy) Dr. Claudia Vannini (Dipartimento di Etologia, Ecologia, Evoluzione, Università di Pisa, Pisa, Italy) Prof. Dr. Wolfgang Hess (Universität Freiburg, Deutschland) Prof. Dr. Eric Triplett (University of Florida, USA) Dr. Katherine McMahon (University of Wisconsin, USA)	
Hahn	Prof. Lars Tranvik, Dr. Eva Lindström, Silke Langenheder (Department of Limnology, Evolutionary Biology Centre Uppsala University, Sweden)	
Hahn	Prof. Erko Stackebrandt, Dr. Elke Lang (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland)	
Hahn	Prof Antonio Camacho (Department of Microbiology and Ecology, Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University Of Valencia, Spain)	

Hahn	Prof. Karel Simek (Hydrobiological Institute, Academy of Sciences CR, Ceske Budejovice, Czech Republic)	
Hahn	Dr. Qinglong Wu (Nanjing Institute of Geography and Limnology, Academia Sinica, Nanjing, VR China)	
Humpesch	Prof. N. Matsché, Dr. N. Kreuzinger, Dr. A. Farnleitner (Technische Universität Wien); Mag. A. Aschauer (Bundesumweltamt Wien); Doz. C. Frank, Prof. J. Waringer (Universität Wien)	Donau
Humpesch	Dr. M. Staras (<u>Danube Delta National Institute</u>)	Donau
Humpesch	Dr. A. Kureck (Uni Köln)	Donau, Rhein
Humpesch	Dr. E. Bauernfeind (Naturhistor. Museum Wien)	FWF - Projekt
Humpesch	Dr. J. Schmid-Araya, Dr. P.E. Schmid (University of London)	FWF - Projekt
Humpesch	Prof. J. M. Elliott (FBA, UK)	Fish, Ephemeroptera
Humpesch	Prof. E. Kamler (Inland Fisheries Institute, Polen)	Early life stages of fish
Kurmayer	Dr. Thomas Börner (Humboldt Universität Berlin, Institut für Biologie, Berlin, Deutschland)	Mikroevolution der Toxinsynthese bei Cyanobakterien (FWF- P18185)
Kurmayer	Guntram Christiansen (bis Ende September), Prof. Thomas Hemscheidt (University of Hawaii at Manoa, Department of Chemistry, Honolulu, USA)	Mikroevolution der Toxinsynthese bei Cyanobakterien (FWF- P18185)
Kurmayer	Dr. Thomas Rohrlack (Norwegian Institute for Water Research, NIVA Culture Collection of Algae, Oslo, Norwegen)	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)
Kurmayer	Dr. Martin Welker (TU Berlin, Institut für Chemie, AG Biochemie & molekulare Biologie, Berlin, Deutschland)	Toxische und andere bioaktive Peptide bei Cyanobakterien (EU-Projekt PEPCY)

Kurmayer	Dr. Dan Kramer (Cyano Biotech GmbH, Berlin, Deutschland)	Exploiting bioactive compounds in cyanobacteria
Leichtfried	Prof. Dr. L. Füreder (Universität Innsbruck, Institut für Zoologie und Limnologie)	IRESA Projekt in Sri Lanka - Initiative River Ecology
Leichtfried	Prof. Dr. U. Amarasinghe (Univ. Kelaniya, Dept. of Zoology, Sri Lanka)	Initiative River Ecology in Sri Lanka – IRESA Projekt
Leichtfried	Dr. Ch. Baschien (TU Berlin, Dept. Environmental Microbiology, Germany)	Aquatic Hyphomycetes in Fließgewässern
Leichtfried	Dir. Prof. Dr. B. Statzner (CNSR & Univ. C. Bernard, Lyon)	Köcherbau bei Trichopteren, Partikelnutzung
Leichtfried	Prof. Dr. J. Helesic (Masaryk University, Inst. Botany & Zoology Brno, Czech Rep.)	Schotterinseln in Bächen und deren ökologische Bedeutung
Leichtfried	Dr. T. Fleituch (Inst. of Natural Cons., Polish Acad. Sciences)	Decompositionsprozesse in Bächen
Schmidt	Prof. Roy Thompson (University of Edinburgh, Scotland)	Ultra-sensitive Alpine lakes
Schmidt	Dr. Willy Tinner (Institute of Plant Sciences, University Bern, Switzerland)	Long-term vegetation dynamics of Mediterranean ecosystems
Schmidt	Dr. Christian Kamenik (Institute of Plant Sciences, University Bern, Switzerland)	Chrysophyte resting stages as climate indicators
Schmidt	Dr. Richard Tessadri (Mineralogical Institute, University Innsbruck)	Multi-proxy investigations of Oberer Landschitzsee, Niedere Tauern, Austria
Schmidt	Dr. Bill Shotyk (Institut für Umweltgeochemie, Universität Heidelberg)	Multi-proxy investigations of Oberer Landschitzsee, Niedere Tauern, Austria
Wanzenböck	Dr. I. J. Winfield, Centre for Ecology and Hydrology, Windermere, England..	Reproduzierbarkeit von Echoloterhebungen
Wanzenböck	Dr. M. Godlewska, Prof. M. Zalewski, Prof. P. Frankie-wicz, Dr. A. Swierczowski, International Centre for Ecology, Polish Academy of Sciences	Echolotstudien an Brutfischen ÖAD
Wanzenböck	Dr. V. Mikheev, Dr. A. Pasternak, Severtsov Institute for Ecology and Evolution bzw. Shirshov	Nahrungsaufnahme von Jungfischen unter Einfluss von

	Institute of Oceanology, Moscow, Russland	Räubersignalen ÖAD
Wanzenböck, Pamminger-Lahnsteiner	Prof. Ch. Sturmbauer, Prof. S. Weiss, Universität Graz, Institut für Zoologie	Ökologische und genetische Nischendifferenzierung von Coregonen
Wanzenböck, Pamminger-Lahnsteiner, Finster, Mayr	Dr. H. Gassner, Prof. Dr. A. Jagsch (Bundesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Gewässerökologie, Fschereibiologie und Seenkunde)	Ökologische Bewertung von Seen Echolotuntersuchungen Entwicklung von Aufzuchtmethoden für Coregonen
Wanzenböck, Pamminger-Lahnsteiner	Dr. F. Hölker, Dr.T. Mehner, Dr. J. Freyhof, Dr. K. Kohlmann (Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin)	Evolutionsökologie der Coregonen
Weisse	Dr. Cristiana Callieri (CNR Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Sezione di Idrobiologia ed Ecologia delle Acque Interne, Verbania Pallanza, Italy)	Ecophysiological diversity of autotrophic picoplankton in subalpine lakes
Weisse	Prof. W. Foissner (Universität Salzburg)	Phänotypische und genotypische Diversität von Planktonciliaten (FWF-Projekt P16796-B06)
Weisse	Dr. Helga Müller (Konstanz, Deutschland)	Cystenbildung bei oligotrophen Ciliaten (FWF-Projekt P16796-B06)
Weisse	Dr. Michaela Strüder-Kypke, (University of Guelph, Department of Zoology, Guelph, Ontario, Kanada)	Genotypische Diversität und Phylogenie von Planktonciliaten (FWF-Projekt P16796-B06)
Weisse	Mag. Tanja Burgmert (Universität Köln, Institut für Botanik, Aquat. Ökologie)	Auswirkungen der globalen Klimaerwärmung auf planktische Lebensgemeinschaften
Weisse	Mag. Jitka Jezberová (Hydrobiological Institute, Czech Academy of Sciences, Budejovice, CZ)	Selective feeding of heterotrophic protists on picocyanobacteria
Winkler	Prof. J. Mathooko, Egerton University, Njoro, Kenya; Prof. Y. Mgaya, University of Dar Es Salaam, Tanzania; Dr. N. Kitaka, Egerton University, Kenya; Dr. Y. Kizito, Makerere University, Uganda; Dr. J. Balirwa, Fisheries Research Institute, Jinja (FIRRI).	East-African Network (EAWA)

	Dr. D. Chitamwebwa, Tanzanian Fisheries Research Institute, Tanzania. Dr. D. Liti, Moi University, Kenya	
Winkler	<p>Dr. Z. Adamek, University of South Bohemia, Tschechien; Dr. C. Baschien, TU Berlin, Deutschland. Dr. T. Battin, Universität Wien, Österreich. Prof. P. Denny, UNESCO-IHE, Niederlande, Dr. V. Bauer, Tschechische Akademie der Wissen-schaften, Tschechien. Dr. D. Byamukama, Makerere University, Uganda. Mag. A. Eder, ÖAD Salzburg, Österreich. Prof. K. Edwards, University of South Bohemia, Tschechien, Dr. J. Elster, Dr. J. Kvet, Dr. J. Dvorak & Dr. J. Husak, Tschechische Akademie der Wissen-schaften, Tschechien; Dr. J. Erbler, Afro Asiatisches Institut Salzburg, Österreich. Dr. A. Farnleitner, TU Wien, Österreich. Dr. C. Fesl et al., Universität Wien, Österreich. Prof. Dr. L. Füreder, Universität Innsbruck, Österreich. Dr. U. Goldschmid, Magistrat der Stadt Wien, Österreich. Dr. Ch. Griebler, GSF, Institute for Groundwater Ecology, Deutschland. Prof. Dr. H. Habersack, BOKU Wien, Österreich. Dr. T. Hein, Universität Wien. Mag. I. Hoedl, Universität Wien, Österreich; Dr. A. Jagsch, Dr. H. Gassner & Dr. E. Kainz, Institut f. Gewässerökologie, Fischereibiologie & Seenkunde, Scharfling, Österreich. Dr. G. Kavka, Bundesamt für Wasserwirtschaft, Petzenkirchen, Österreich; Prof. Dr. H. Keckeis, Universität Wien, Österreich. Dr. R. Konecny, Umweltbundesamt, Österreich. Dr. V. Kowarc, ARGE Ökologie, Wien, Österreich. Dr. N. Kreuzinger, TU Wien, Österreich. Dr. J. Lewis, Royal Holloway, Univ. London, England; Dr. O. Linhart, Dr. J. Kouril, University of South Bohemia, Tschechien. Dr. D. Liti, Moi University, Kenia.</p>	IPGL-Programm

	<p>Prof. Dr. R. Mach, TU Wien, Österreich. Dr. E. Marti, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spanien. Prof. Dr. J. Mathooko, Egerton University, Kenia. Dr. N. Matsché, TU-Wien, Österreich; Dr. Ch. M. M'Erumba, Egerton University, Kenia; Dr. J. Pokorný & Dr. D. Pithart, Tschechische Akademie der Wissenschaften, Tschechien. DI R. Perfler, BOKU, Wien, Österreich. Dr. M. Pusch, IGB Berlin, Deutschland. Mag. W. Reckendorfer, Universität Wien, Österreich. Mag. K. Ruzicka, Technische Universität Wien, Österreich; Dr. H. Sattmann, Naturhistorisches Museum Wien, Österreich. Dr. R. Schabetsberger & Dr. C. Jersabek, Universität Salzburg, Österreich; Dr. M. Schabuss, Universität Wien, Österreich. Prof. M. Schagerl, Universität Wien, Österreich. Dr. F. Schiemer, Universität Wien. Dr. Jaromir Seda, University of South Bohemia, Tschechien. Mag. G. Singer, Universität Wien, Österreich. DI M. Straif, BOKU Wien, Österreich. Dr. K. Tockner, EAWAG, Schweiz. Dr. J. Vymazal, Tschechische Akademie der Wissenschaften, Tschechien; Dr. F. Wagner, Bundesamt für Wasserwirtschaft, Wien, Österreich; Prof. Dr. H. Waidbacher, BOKU Wien, Österreich. Dr. G. Weigelhofer, Universität Wien, Österreich. Dr. G. Wolfram, Technisches Büro Wien, Österreich; Dr. P. Znachnor, University of South Bohemia, Tschechien.</p>	
--	--	--

2.8.2 Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen

Organisation von Tagungen und Workshops in bzw. am Mondsee:

- 24.-27.02. **Workshop DECLAKES** (Mondsee; Danielopol)
Vorträge:
Danielopol: Ostracod taxonomy, ecology and biometry.
Dokulil: Presentation of results from an ongoing EC-project (Climat impacts and modelling).
Geiger: "Ostracod research in mondsee – on the interface between ecology and paleoecology".
Schmidt: Presentation of the paleolimnological project "A multi-proxy Holocene study of a SE-Alpine lake sediment core (Oberer Landschnitzsee, Niedere Tauern).
Stracke: Informal discussion at the Institute, presentation of the "Image Analysis for ostracod digital photographs" in the Benthos.
von Grafenstein U. (project leader, CNRS, Frankreich): Short presentation of the DECLAKES-project.
Weisse: Welcome and brief presentation of the Limnological Institute's scientific aims and activities.
- 01.-03.06. **EU-Project PEPCY**, Toxic and other bioactive peptides in cyanobacteria, Annual Meeting (Mondsee; Kurmayer und Mitarbeiter)
- 10.-14.10. Workshop **EU-Projekt CLIME** (Scharfling; Dokulil)
- 20.-21.10. **Workshop Paläoökologie**: Methoden und Anwendung an verschiedene Zeitskalen (Mondsee; Danielopol, Schmidt)
Vorträge:
Buttinger: Paläoökologische Veränderungen im Pannon See und deren Auswirkungen auf fossile Ostracoden Vergesellschaftungen am Beispiel des Aufschlusses von St. Margarethen/Altes Zollhaus (Burgenland).
Danielopol: Ökologie und Paläoökologie der Ostracoden aus dem Mondsee.
Dokulil: Reduzierter Nährstoffeintrag in Seen. Eine Analyse Rezent- und Paläo-Daten aus dem Mondsee.
Gross M. (Joanneum Graz): Limnische Ostracoden aus dem Umfeld der Miozänen, Zentralen Paratethys (Steirisches Becken)
Minati: Diversität Miozäner Ostracoden aus dem Bereich des Pannon Sees im Wiener Becken
Müllegger S. (Universität Graz): Foraminiferen aus den Tiefseebecken des östlichen Südatlantiks - Ökologie und Methodik.
Piller W. (Universität Graz): Paläobiogeographische Entwicklung im östlichen Mediterran und der Paratethys an der Grenze Oligozän/Miozän.
Pipik R. (Slowakische Akademie): The ostracods of the ancient lake and their paleobiotopes in the Upper Miocene (The Turiec basin, Slovakia).
Roth und Schmidt: Paläolimnologische Auswertung eines Holozänen Sedimentkerns aus einem hochalpinen See (Oberer Landschnitzsee, Niedere Tauern).
Schmidt: Einführung zum Paläoökologischen Workshop.
Stracke: "Morphomatica" – Ein Werkzeug zur Umrissanalyse von Ostracoden.

Teilnahme an sonstigen wissenschaftlichen Veranstaltungen

Name des Mitarbeiters	Veranstaltung	Titel des Vortrages
Boenigk	24. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Kaiserslautern, Deutschland, 02.-05.03.	V: Application of morphological and molecular defined groups of organisms (species) in protist ecology.
Danielopol	Symposium "New currents in conserving freshwater systems", The Center for Biodiversity and Conservation at the American Museum of Natural History, New York, USA, 07.-08.04.	V: Videography and groundwater invertebrates: Lobau wetlands.
Danielopol	12th Congress RCMNS – Patterns and Processes in the Neogene of the Mediterranean "Region", Wien, 06.-11.09.	P: Small scale shifts in agitated palaeoenvironments of Lake Pannon on ostracod assemblages. (gemeinsam mit R. Buttinger)
Danielopol	15th International Symposium on Ostracoda, Berlin, Deutschland, 12.-15.09.	V: Microevolutionary and taxonomical aspects within the species-group <i>Pseudocandona eremita</i> (Vejdovský).
Danielopol	15th International Symposium on Ostracoda, Berlin, Deutschland, 12.-15.09.	Presentation of Morphomatica (Version 1.5).
Dokulil	Wasserrahmenrichtlinie (WRRL), Arbeitstagung, München, Deutschland, 26./27.01.	V: Entwicklung einer Einstufung auf der Basis Phytoplankton: Algenentwicklung nach Brettum.
Dokulil	Int. Shallow Lake Tagung (ISESL), Nanjing, China, 18.-28.04.	V: Global climatic change affecting lakes world-wide: An overview of current understanding. (Eingeladener Vortrag)
Dokulil	Summer Meeting American Society of Limnology & Oceanography (ASLO), Santiago di Compostela, Spain, 19.-26.06.	V: Climate change affecting hypolimnetic water temperatures in lakes across Europe. (Eingeladener Vortrag)
Dokulil	8th International Phycological Congress (IPC), Durban, South-Africa, 13.-19.08.	V: The global warming versus re-oligotrophication controversy in lakes: Can effects on phytoplankton structure be disentangled? (Eingeladener Vortrag)
Dokulil, Teubner	Deutschsprachige Diatomeen Tagung (DDT), Rostock,	V: Langzeittrends der Silikat-konzentration in einem tiefen Alpensee:

Dokulil, Teubner	Deutschland, 10.-13.03. 14. Workshop Int. Assoc. Phytoplankton (IAP), Sapanca, Türkei, 04.-11.09.	Dokulil: 1. Einfluss der Oligotrophierung. Teubner: 2. Bedeutung von Klimaänderungen. V: Modifications in phytoplankton size structure and growth by environmental constraints induced by nutrient reduction in an urban lake.
Dokulil, Teubner	Jahrestagung Deutsche Gesellschaft Limnologie (DGL), Karlsruhe, 25.-30.09.	V: Bewertung der Phytoplanktonstruktur stehender Gewässer gemäß der EU Wasserrahmenrichtlinie.
Dokulil, Teubner	Jahrestagung Deutsche Gesellschaft Limnologie (DGL), Karlsruhe, 25.-30.09.	V: The impact of climate change on lakes in Central Europe. (Eingeladener Vortrag)
Falkner	QND Seminar „The comparative biology of self-cognizance“, Universität Salzburg, 23.-26.06.	V: The microbial experience of environmental phosphate fluctuations.
Foissner, W., Weisse & Müller, H.	24. Wissenschaftliche Tagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Burg Lichtenberg, 02.-05.03.	V: The unusual resting cyst of <i>Meseres corlissi</i> (Ciliophora, Oligotrichea).
Gächter, Weisse	24. Wissenschaftliche Tagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Burg Lichtenberg, 02.-05.03.	V: Variable response to temperature among five clones of <i>Meseres corlissi</i> .
Greisberger	Deutschsprachige Diatomeen Tagung (DDT), Rostock, Deutschland, 10.-13.03.	V: Pigmentmuster als Ausdruck vertikaler und jahreszeitlicher Verteilung planktischer Diatomeen.
Greisberger	14. Workshop Int. Assoc. Phytoplankton (IAP), Sapanca, Türkei, 04.-11.09.	V: Functional plasticity, photosynthetic rate and pigment composition of the Picoplankton size fraction in an alpine lake.
Greisberger	Jahrestagung Deutsche Gesellschaft Limnologie (DGL), Karlsruhe, Deutschland, 25.-30.09.	V: Abschätzung der saisonalen und vertikalen Verteilung des Phytoplanktons in einem tiefen Alpensee (Mondsee) anhand von Pigmentmustern.
Hahn	Gordon Research Conference on Applied & Environmental Microbiology 2005, New London, CT, USA; 24.-29.07.	V: Cultivation of aquatic bacteria: Did we try hard enough? (Eingeladener Vortrag)
Hahn	Italian Congress of Protozoology, Castiglioncello,	V: Life History Evolution in <i>Polynucleobacter</i> Bacteria:

	Italien, 07.-08.10.	From Free-Living Organisms to Obligate Endosymbionts of Ciliates. (Eingeladener Vortrag)
Kaiblinger	Deutschsprachige Diatomeen Tagung (DDT), Rostock, Deutschland, 10.-13.03.	V: Photosynthetische Parameter planktischer Diatomeengesellschaften.
Kaiblinger	Summer Meeting American Society of Limnology & Oceanography (ASLO), Santiago di Compostela, Spanien, 19.-26.06.	V: Vertical niche separation of phytoplankton assemblages in deep alpine lakes: optical properties, light acclimation and photosynthetic response.
Kaiblinger	14. Workshop Int. Assoc. Phytoplankton (IAP), Sapanca, Türkei, 04.-11.09.	V: Size-related differences in phytoplankton structure and photosynthesis in two oligotrophic alpine lakes.
Kaiblinger	Jahrestagung Deutsche Gesellschaft Limnologie (DGL), Karlsruhe, Deutschland, 25.-30.09.	V: Saisonale Unterschiede der photosynthetischen Parameter des Phytoplanktons in Seen: Kurzzeitmessungen mit aktiver Fluoreszenz (FRRF-Technik).
Kurmayer	XVII International botanical Congress, Wien, 17.-23.07.	V: Microevolution of toxin synthesis in cyanobacteria.
Leichtfried	Annual meeting der NABS, New Orleans, USA, 22.-27.05.	V: Leaf litter decomposition and its ETS (Electron Transport System) activity in two stream ecosystems (Austria, Poland).
Leichtfried	11th Ann. Scientific. Sessions of the SLAFAR, Colombo, Sri Lanka, 17.06.	V: IRESA – Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application – Project Presentation.
Leichtfried	PLPF 4 (4th Int. Meeting on Plant Litter Processing in Freshwater), Toulouse, Frankreich, 25.-28.07.	V: Decomposition of leaf litter and its ETS (Electron Transport System) activity in two stream ecosystems in Austria and Poland.
Leichtfried	SEFS 4 (4th Symposium for European Freshwater Sciences), Krakow, Polen, 22.-26.08.	V: Limnological investigations on the Tubod River, Leyte, Philippines: from rain forest mountains to the Pacific ocean.
Leichtfried	Symposium "River Bottom VI", Brno, Tschechien, 19.-23.09.	V: Energy basis of the consumer community in streams yesterday, today and tomorrow... (Key note address)
Leichtfried	KEF-MDG+5 Workshop: "A critical look at the role of research in achieving the MDGs", Wien, 29.11.	V: Initiative of River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application - Project presentation. (Gemeinsam mit

Liu Qian	International Symposium on the Eutrophication Process and Control in Large Shallow Lakes, Nanjing, China, 23.-26.04.	Füreder) P: Abundance of specific microcystin ecotypes in populations of <i>Planktothrix</i> spp.
Minati	12 th Congress RCMNS – “Patterns and Processes in the Neogene of the Mediterranean “Region”, Wien, 06.-11.09.	P: Composition of Pannonian ostracod assemblages as indicator of wetland ecology.
Minati	15th International Symposium on Ostracoda, Berlin, 12.-15.09.	V: Evolutionary pathways within <i>Vestalenula lineage</i> (Ostracoda, Darwinulidae).
Müller, H., Foissner, W. & Weisse	24. Wissenschaftliche Tagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Burg Lichtenberg, 02.-05.03.	P: Variable response to pH among three clones of <i>Meseres corlissi</i> .
Pamminger-Lahnsteiner	IX International Symposium on the Biology and Management of Coregonid Fishes. Olsztyn, Poland, 21.-27.08.	V: Genetic identification of alpine versus baltic whitefish larvae in two Austrian lakes.
Pfandl	24. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Kaiserslautern, Deutschland, 02.-05.03.	P: Unexpected Effects of Prey Dimensions and Morphologies on the Size Selective Feeding by Two Bacterivorous Flagellates (<i>Ochromonas</i> sp. and <i>Spumella</i> sp.).
Šimek, Hornák, Jezbera, Nedoma, Gasol, Hahn, Schauer	9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology (SAME 9), Helsinki, Finnland, 21.-26.08.	V: Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster of <i>Betaproteobacteria</i> , an abundant group in bacterio-plankton of a freshwater reservoir.
Šimek, Hornák, Jezbera, Nedoma, Gasol, Hahn, Schauer	Symposium on Single-Celled Analysis of Planktonic Microbes, Observatoire Océanologique de Banyuls, Banyuls-sur-mer, Frankreich, 17.-20.10.	V: Responses of the R-BT065 subcluster of <i>Betaproteobacteria</i> to varying experimental manipulations in a freshwater reservoir studied using single-cell analysis techniques.
Schmidt	Workshop DECLAKES, Mondsee, 24.-27.02.	V: A multi-proxy Holocene study of a SE-Alpine lake sediment core (Oberer Landschitzsee, Niedere Tauern).
Schober	European Geosciences Union, General Assembly, Wien, 24.-29.04.	P: Genetic diversity in the production of small bioactive peptides in cyanobacteria.
Teubner, Dokulil	EU-Projekt CLIME, SIG	V: Deep-water warming of lakes

	„Regionalisation“, Tartu, Estland, 15.-19.05.	across Europe.
Wanzenböck J.	IX International Symposium on the Biology and Management of Coregonid Fishes. Olsztyn, Poland, 21.-27.08.	V: Temporal stability of spatial distribution patterns in Austrian lakes dominated by whitefish – a hydroacoustic study.
Weisse	Zoologisches Institut der Universität zu Köln, Kolloquium am 02.02.	V: Ökophysiologische Bedeutung der Temperatur für planktische Protisten. (invited)
Weisse	Seminarreihe des SFB 454, Univ. Konstanz, 03.06.	V: Diversity patterns in aquatic microorganisms: everyone everywhere? (invited)
Weisse	Symposium Innovatives Wassermanagement im Salzkammergut, 'water tec-net', 09.06.	V: Lebensraum Wasser - die Salzkammergutseen aus ökologischer Sicht. (invited)
Weisse	4th Symposium for European Freshwater Sciences (SEFS 4), Krakau, Polen, 22.-26.08.	V: Biodiversity of freshwater microorganisms. (invited keynote presentation)
Winkler	Konferenz: A Critical Look at the Role of Research in Achieving the MDGs“; Wien, 29.11.	V: Sustainability as added-value of integrated capacity enhancement programmes for approaching MDG's: IPGL - freshwater ecosystem research & management in developing countries.
Wu, Hahn	ASLO Summer Meeting, Santiago de Compostela, Spanien, 19.-24.07.	V: Bacteria affiliated to subcluster B of the <i>Polynucleo-bacter</i> cluster are of importance in the pelagic of neutral and alkaline lakes.

2.8.3 Vorträge von Mitarbeitern an anderen Institutionen

Name des Mitarbeiters	Gastinstitution	Titel des Vortrages
Boenigk	Firma Aventis Sanofi, Frankfurt, Deutschland, 03.03.	(Micro-)diversity and chemical ecology of flagellates.
Boenigk	Centre de Recherche Public, Gabriel Lippmann, Esch, Luxembourg, 03.06.	Ecology of bacterivorous flagellates with special emphasis on heterotrophic chrysophytes.
Dokulil	BW München, Deutschland, 26./27.01.	WRRL-Phytoplankton: Algenengewichtung nach Brettum.

Dokulil	MA45 Wien, 22.02.	WRRL-Einstufung des Phytoplanktons: Algengewichtung nach Brettum.
Dokulil	Jinan University, Guangzhou, China, 20.04.	Eutrophication and Restoration of shallow lakes.
Dokulil	Polnische Akademie der Wissenschaften, 23.-25.10.	Alternative stable states in floodplain ecosystems.
Gumpenberger	Universität Konstanz, Limnologisches Institut, 22.06.	Genetische Variation und Verteilung von Microcystin Ökotypen in Populationen des toxischen Cyanobakteriums <i>Planktothrix</i> spp.
Humpesch	Math.-nat. Klasse der ÖAW, 07.04.	Die Beziehung der Biodiversität der Bodentiere zu Umweltparametern in der Freien Fließstrecke der Donau im Kulturräum Wien als Grundlage für Management-Maßnahmen (IX/1995 – IX/1996).
Kurmayer	ARC Seibersdorf Research, Nano-Systemtechnologies, 20.07.	Möglichkeiten zur Umsetzung von Forschungsergebnissen und wissenschaftlicher Methodik zum Thema Bioaktive Naturstoffe in Cyanobakterien.
Leichtfried	TU Berlin, Fachbereich Umweltmikrobiologie, Deutschland, 11.05.	Biological Station Lunz and Limnology of Stream Ecosystems (Ritrodat-Lunz-Concept).
Pfandl	Centre de Recherche Public, Gabriel Lippmann, Esch, Luxembourg, 03.06.	Biogeography and Ecophysiology of „Spumella-like“ flagellates.
Wanzenböck J.	Hydrobiological Institute, Czech Academy of Sciences, Ceske Budejovice, 24.03.	fish ecology in the prealpine lakes of Austria.
Winkler	UNESCO-IHE, International Institute for Water Education. Epe, The Netherlands, 30.10.	Infrastructure, mission and research priorities at the Institute for Limnology Mondsee and IPGL activities.
Winkler	Egerton University, Njoro, Kenia, 22. & 23.09.	Overview about IPGL-programmes. Infrastructure, mission and research priorities at the Institute for Limnology Mondsee and IPGL activities.

2.8.4 Vorträge von Gästen (Kolloquiumsvorträge)

Name des Vortragenden	Herkunftsinstitution	Titel und Datum des Vortrages
Berendonk Thomas	AG Molekulare Evolution & Systematik der Tiere, Univ. Leipzig, Deutschland	Genetic diversity in freshwater: two case studies. 16.06.
Chen Yuwei	Institut für Limnologie der ÖAW; Academia Sinica, Njing, China	Phytoplankton and environmental health in Lake Taihu, China. 17.02.
Danielopol	Institut für Limnologie der ÖAW	Neue Impulse in der Grundwasserökologie. 27.01..
Dickbauer	Institut für Limnologie der ÖAW	Nährstoffaustrag aus dem Einzugsgebiet eines alpinen Sees. 17.03.
Dokulil	Institut für Limnologie der ÖAW	Reduzierter Nährstoffeintrag in Seen: Eine Analyse rezenter und Paläodaten aus dem Mondsee. 20.10.
Finster	Institut für Limnologie der ÖAW	Respirationsmessungen an larvalen und juvenilen Barschen. 02.06.
Gerloff-Elias Antje	Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam, Deutschland	Adaptation of <i>Chlamydomonas acidophila</i> to low pH-values and low light conditions in extremely acidic lakes in Lusatia (Germany). 10.11.
Grossart Hans-Peter	IGB-Neuglobsow, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abt. Limnologie Geschichteter Seen, Stechlin, Deutschland	Bacterial diversity and seasonal dynamics in 4 lakes of the Mecklenburg lake district, Northern Germany. 01.12.
Hahn, Schauer, Wu	Institut für Limnologie der ÖAW	Ecology of Freshwater Bacterioplankton. 24.02.
Hansen Per Juel	Marine Biological Laboratory, Universität Kopenhagen, Dänemark	Effect of high pH and DIC limitation on plankton dynamics. 13.10.
Harzhauser Mathias	Naturhistorisches Museum, Wien	Der Pannon See – 6 Millionen Jahre endemische Evolution im Spannungsfeld von Klima und Geodynamik. 17.11.
Hess Wolfgang	Albert Ludwigs Universität, Freiburg, Deutschland	Marine Picocyanobacteria, their genomes and molecular ecology. 19.01.

Kagami Maiko	Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Center for Limnology, Nieuwersluis, Niederlande	Parasitic fungi of phytoplankton in lakes. 24.11.
Kosol Simone, Stracke Anika, Kurmayer Rainer	Institut für Limnologie der ÖAW	Wachstumsversuche zur Regulation der Peptid-synthese bei Cyanobakterien. 03.02.
Stelzer Claus-Peter	Institut für Evolution und Ökologie der Tiere, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, Deutschland	Evolutionary aspects and plasticity of life history decisions in planktonic rotifers. 19.05.
Walochnik Julia	Abtlg. Medizinische Parasitologie, Klinisches Inst. für Hygiene und Medizin. Mikrobiol., Medizin, Universität Wien	Diversität von Akanthamoeben. 12.05.
Weiss Steven	Institut für Zoologie, Karl-Franzens Universität Graz	Comparative phylogeography of Eurasian salmonids: inferences on evolution and paleohydrology. 15.12.

2.9 Wissenschaftlertausch 2005

2.9.1 Inlands- und Auslandsaufenthalte von Mitarbeitern

Name des Mitarbeiters	Gastinstitution und Aufenthaltsdauer	Finanzierung
Dokulil	Jinan University, Guangzhou und Nanjing Institute for Limnology & Geography, Nanjing, beide China, 18.04.-06.05.	ÖAW-Austausch
Dokulil	Forschungszentrum Limnologie der Univ. Tartu, Estland, 15.-19.06.	ÖAW-Austausch
Hahn	Hydrobiological Institute, Academy of Sciences CR, Ceske Budejovice, Czech Republic, 15.-21.05.	ÖAW-Austausch
Hahn	Hydrobiological Institute, Academy of Sciences CR, Ceske Budejovice, Czech Republic, 08.-09.12.	Projekt (Prof. Karel Simek)
Humpesch	Danube Delta National Institute, Rumänien, 21.-28.05.	ÖAW
Kurmayer	IHE Delft, Niederlande, 23.-25.02.	IPGL

Kurmayer	UBA, Berlin, Deutschland, 29-31.03.	BMBWK
Leichtfried	TU Berlin, Fachbereich Umweltmikrobiologie, Deutschland, 03.-18.05.	Gastinstitut und Institut für Limnologie, Mondsee
Leichtfried	University of Kelaniya, Dept. of Zoology, Sri Lanka, 01.-21.06.	IRESA Projekt
Wanzenböck J., Pamminger-Lahnsteiner	Institute for Inland Fisheries, University of Masuri and Warmia, Olsztyn, Poland, 18.-21.08.	ÖAD
Winkler	Tschechische Akademie der Wissenschaften, Institute of Botany, Trebon, Tschechien, 06.-08.07.	BAA0010
Winkler	Tschechische Akademie der Wissenschaften, Institute of Botany, Trebon, Tschechien, 18.07.-19.07.	BAA0010
Wanzenböck S.	Tschechische Akademie der Wissenschaften, Institute of Botany, Trebon, Tschechien, 20.07.	BAA0010
Winkler	Egerton University, Njoro, Kenia, 10.09.-03.10.	BAA0010
Winkler	UNESCO-IHE, International Institute for Water Education. Delft, The Netherlands, 26.-30.10., 18.-21.12.	BAA0010
Winkler	Tschechische Akademie der Wissenschaften, Institute of Botany, Trebon, Tschechien, 09.11.	BAA0010

2.9.2. Aufenthalte von Gastwissenschaftlern

Name des Gastes	Herkunftsinstitution und Aufenthaltsdauer	Finanzierung
Baschien Christiane	Masaryk University, Institute for Zoology and Ecology, Brno, Tschechien, 14.-20.04.	Herkunftsinstitut
Chatzinotas Antonis	UFZ Leipzig, Deutschland, 09.-14.04., 23.-30.11., 22.12.	FWF
Decrouot L.	Univ. Lausanne, 19.-23.09.	privat
Fleituch Tadeusz	TU Berlin, Fachbereich Umweltmikrobiologie, Deutschland, 02.-10.07.	WTZ Austria/Polen

Frankiewicz Piotr	University Lodz, Poland, 19.-23.06	ÖAD/WTZ
George Glen	NERC England, 10.-14.10.	CLIME WP 1
Godlewska Malgorzata	International Centre for Ecology, Polish Academy of Sciences, 19.-23.06	ÖAD/WTZ
Hansen Per-Juel	Universität Kopenhagen, Dänemark, 17.-29.04., 12.-21.10.	Akademie Austausch / FWF
Helešic Jan	Institute of Nature Conservation, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland, 12.-15.08., 02.-04.09.	Herkunftsinstitut
Iepure Sanda	Inst. Speologie "E.G. Racovitza", Cluj, Rumänien, 19.05.-15.07.	ÖAW-Austausch
Jezbera Jan	Hydrobiological Institute, Academy of Sciences CR, Ceske Budejovice, Czech Republic, 22.-31.05.	ÖAW-Austausch
Jezberová Jitka	Hydrobiological Institute, Czech Academy of Sciences, Budejovice, CZ, 01.-15.05.	ÖAW-Austausch
Kagami Maiko	Nederlands Inst. Ecologie, 23.-25.11.	Institut, CLIME WP 6
Mikheev Victor N.	Severtsov Institute for Ecology and Evolution, RAS, Moscow, 12.05.-26.06.	ÖAD/WTZ
Namiotko Tadeusz	Universität Gdansk, Institut für Genetik 01.07.-30.08.	ESF Projeckt
Pasternak Anna F.	Shirshov Institute of Oceanology, RAS, Moscow, 12.05.-26.06.	ÖAW-Austausch
Simek Karel	Hydrobiological Institute, Academy of Sciences CR, Ceske Budejovice, Czech Republic, 22.-31.05.	ÖAW-Austausch
Stoeck T.	Universität Kaiserslautern, Deutschland, 30.08.-02.09.	DGP
Tarao Mitsunori	Institute of Symbiotic Science and Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan, 01.04.05-31.01.06	ÖAD

Gäste im Rahmen des „International Postgraduate Training Course in Limnology“

Battin, T.	Universität Wien, 11.04., 15.04., 18.04. und 27.-29.04.	BMAA
Baschien, Ch.	TU Berlin, 15.04.	BMAA
Eder, A.	ÖAD Salzburg, 04.-05.04. und 07.04.	BMAA
Fesl, Ch.	Universität Wien, 19.- 20.04.	BMAA
Füreder, L.	Universität Innsbruck, 26.04.	BMAA
Griebler, Ch.	GSF, Inst. f. Grundwasserökologie Neuherberg, 11.04.	BMAA
Habersack, H.	BOKU Wien, 12.04.	BMAA
Hödl, I.	Universität Wien, 18.04.	BMAA
Keckeis, H.	Universität Wien, 06.-08.05.	BMAA
Konecny, R.	Umweltbundesamt Wien, 20.-22.06.	BMAA
Kreuzinger, N.	Technische Universität Wien, 09.-13.05.	BMAA
Pusch, M.	IGB Berlin, 25.-26.04.	BMAA
Ruzicka, K.	Technische Universität Wien, 11.13.05.	BMAA
Jersabek, Ch.	Universität Salzburg, 17.-20.5. und 13.06.	BMAA
Sattmann, H.	Naturhistorisches Museum Wien, 21.06.	BMAA
Schabetsberger, R.	Universität Salzburg, 17.-20.05. und 31.05.-03.06.	BMAA
Schabuss, M.	Universität Wien, 20.-24.06.	BMAA
Singer, G.	Universität Wien, 19.-20.04.	BMAA
Gassner, H.	Institut f. Gewässerökologie, Fischereibiologie & Seenkunde, Scharfling, 30.05.-03.06.	BMAA
Schagerl, M.	Universität Wien, 14.-15.04.	BMAA
Stachowitsch, M.	Universität Wien, 20.04.	BMAA
Wagner, F.	BAW/IWG, 22.04.	BMAA
Weigelhofer, G.	Universität Wien, 12.-13.04.	BMAA

2.10 Ausbildung und Schulung 2005

Lehre

Vorlesungen (VO), Seminare (SE), Übungen (U):

Danielopol

SS 2005

Wissenschaftliche Arbeiten, Universität Wien

WS 2005/06

Wissenschaftliche Arbeiten, Universität Wien

Dokulil

WS 2005

Einführung in die angewandte Gewässerökologie, (VO),
Universität Wien

Falkner

WS 2004/05

Pflanzenphysiologisches Seminar (SE), Universität Salzburg

WS 2005/06

Pflanzenphysiologisches Seminar (SE), Universität Salzburg

Hahn

WS 2005/06

Mikrobielle Ökologie (VO+U), Universität Salzburg

Humpesch

SS 2005

882727 SE+EX Wissenschaftliche Arbeiten, Universität Wien
(Privatissimum für Dissertanten und Diplomanden)

WS 2005

300125 SE+EX Zur Ökologie der Fließgewässer: Fluß-Stau-Au,
Universität Wien

300308 VO Biologie und quantitative Ökologie einheimischer
Wasserinsekten, Universität Wien

300294 SE+EX Wissenschaftliche Arbeiten, Universität Wien
(Privatissimum für Dissertanten und Diplomanden)

Schmidt

SS 2005

Wissenschaftliche Arbeiten: Schwerpunkt Paläolimnologie,
Universität Wien (SE)

Wanzenböck

WS 2004/05

Fischökologie, Universität Salzburg (VO)

WS 2005/06

Fischökologie, Universität Salzburg (VO)

Weisse

WS 2004/05

Methoden und Konzepte der Limnologie, Universität Salzburg (1
SWSt) (VO)

SS 2005

Einführung in die Angewandte Limnologie, Universität Salzburg (2
SWSt) (VO)

WS 2005/06

Methoden und Ergebnisse aktueller limnologischer
Forschungsprojekte, Universität Salzburg (1 SWSt) (SE)

Winkler
WS 2005/06 Ökologie der Entwicklungsländer, Universität Wien (VO-300113)
Seminar zur Ökologie der Entwicklungsländer, Universität Wien
(SE-300153)

Kurse und Praktika:

Dokulil Produktionsbiologie (VO und UE, Univ. Wien), Biologische Station
01.-08.07. Illmitz, gem. m. A. Herzig

Dokulil Integrative ökologische Grundübungen – Limnologischer Beitrag,
20.-22.09. Univ. Wien, gem. m. Kaiblinger

Humpesch 809577 EX Limnologische Auslandsexkursion Donaudelta
SS 2005

876700 SE+UE+EX Projektpraktikum: Energie-, Nährstoffflüsse
und Biodiversität eines großen Fließgewässers, am Beispiel der
Donau im Wiener Raum

Leichtfried 2 Lehr- und Informationsveranstaltungen im Framework vom
01.-10.06. IRESA Projekt in Sri Lanka

Wanzenböck J. Angewandte Ökologie (Kurs 1) – Arbeitsgemeinschaft. Gem. mit J.
SS 2004 Hasslett, Universität Salzburg

.
04.-09.07. Fischökologiekurs: Populations- und Gemeinschaftsökologie Kurs
4, Universität Salzburg

IPGL Kurs:

Boenigk, Hahn 02.-06.05.	Microbial Ecology
Dokulil 23.-27.05.	Seenlimnologie (VO und UE), gem. m. Teubner, Greisberger, Kaiblinger
Humpesch 6.-18.08.	Joint Course on Energy-, Nutrienflow and Biodiversity of a Large River, taking the Danube in the Area of Vienna as an Example
Kurmayer 16.06.	Ökologie und Toxinproduktion bei Cyanobakterien
Leichtfried 11.04-29.05.	„Ecology of Running Waters“
Wanzenböck J., Maier 30.05-03.06.	Seenökologie Teil: Fischökologie
Winkler 20.5.	Data analysis and final seminar on physico-chemical parameters of Lake Mondsee and Lake Krottensee. Datenanalyse und Abschlussseminar IPGL-Kursmodul Lake Ecology I.
Winkler 30.05.-03.06.	Fish sampling, catch-data analysis and data presentation. Probennahmen, Datenanalyse und Abschlussseminar IPGL-Kursmodul Lake Ecology II.
Winkler 06.-07.06.	Fish sampling, catch-data analysis and data presentation. Probennahmen, Datenanalyse und Präsentation River Fish.
Winkler 13.06.	Final Seminar of Lake Ecology I & II (IPGL Kursprogramm). Moderation & Diskussionsleitung vom Abschlussseminar Lake Ecology I & II.
Winkler 08.07.	Final Seminar of Fishpond Management (IPGL Kursprogramm). Teilnahme am Abschlussseminar IPGL-Kursteil Fishpond Management.
Winkler 12.-30.09.	Physico-chemical characterisation of Njoro River and Malewa River. Vorlesung, Probennahme, Laborarbeit, Datenanalyse und Abschlussseminar (IPGL-Modul Tropical Limnology in Kenia).

Winkler G. & Wanzenböck S.: Organisation des gesamten IPGL-Kursprogramms:

Ref.	Subject	Lecturer(s)	ECTS Credits	Study load hrs	Exam order
	Promoting intercultural understanding	Erbler	0.2	6	
	German classes	Eder	0.3	9	
ES13a-L	Ecology of Streams & Rivers	Baschien/ Battin/Fesl/ Füreder/ Griebler/Habersack/Hödl/ Kovarc/Leichtfried/ Marti / Pusch/ Schagerl/ Schauer/Singer/ Stachowitsch/ Wagner/ Weigelhofer	5	140	1
ES9-L	Lake Ecology I Structure & functioning of lake ecosystems with emphasis on the interaction of physico-chemical & biological processes (physical limnology, chemistry, microbiology, zooplankton)	Boenigk/Gollmann/Hahn/ Kurmayer/Kreuzinger/Jersabek/ Schabetsberger/Ruzicka/Schauer/S tadler/Weisse/Winkler	5	140	1
ES10-L	Lake Ecology II Structure & ecological functioning, quantitative approaches, food web & trophic interactions (phytoplankton & primary production, fish, synthesis of results)	Dokulil/ Kaiblinger/Greisberger/ Gassner/ Kaiblinger/Keckeis/ Kurmayer/ Wanzenböck/ Winkler	5	140	1
	Aquaculture excursion	Kainz	0.2	6	
	Groundwater Ecology	Griebler	0.4	12	
ES11-L	a: Fish Parasites b: Fishpond Management	Konecny/Lewis/Sattmann/ Schabuss Elster/Pithart/Adámek/Seda/ Petr/Pokorny/Komarek/Kouril/ Kvet/Linhart	5	140	1
ES12-L	a: Wetland Ecology b: Floodplain Ecology	Pokorny/Bauer/Květ/ Denny/Dvořák/Husák/Adamec/ Šetlík/Kučerová/Smahel/Vymaza/ID ušek/Edwards/Vávrova/Hajek Hein/Reckendorfer/Schiemer/ Tockner/Keckeis/Peduzzi/Winkler	5	140	1
ES8-L	a: Pollution Microbiology b: Water Quality Monitoring & Bio-indicators	Farnleitner/ Beiwl/Müller/ Kavka/ Poetsch Farnleitner/Kreuzinger/Matsché/ Mach/Humpesch/Kavka/Fesl/ Wagner/Beiwl/Müller/Burtscher/ Reischer	5	140	2
	Various excursions within IPGL curriculum	Goldschmid/ Wolfram/Hein/Waidbacher/Winkler			
ES13b-L	Individual study	Depending on specific topic	5	140	
13c-L	Tropical Limnology	Mathooko/ Magana/Merimba/ Muia/ Nzula/ Omondi/ Byamukama/van Bruggen/ Winkler/and others	3.2	90	2
LWE 14a	Individual study	Depending on specific topic	5	140	
L11	Tropical limnology	Mathooko/ Magana/Merimba/ Muia/ Nzula/Omondi/van Bruggen/ Winkler/and others	3.2	90	2

Examenskandidat(in)en und Praktikant(inn)en am Institut:

Name	Herkunftsinstitut, Dauer, Ausbildungsziel, Betreuer	Finanzierung
Andrae Stefanie	Universität Salzburg, Bakkalaureatsarbeit 01.01.-03.08.	keine
Brandstätter Regina	Universität Salzburg, Bakkalaureatsarbeit 01.01.-04.08. (Wanzenböck)	keine
Buttinger Robert	Universität Wien, Institut für Paläontologie, Diplomarbeit (Danielopol, Doz. Zuschin)	FWF
Chen Yuwei	Nanjing Institute of Geography and Limnology, Academia Sinica, Nanjing, VR China, Dissertation (Dokulil, Teubner)	Österreichischer Auslandsdienst (ÖAD), Abschluss 14.2.2005
Dickbauer Ulrich	Universität Wien, Diplom (Dokulil)	CLIME, Institut (teilweise), Abschluss 14.4.2005
Ellinger Alfred	Universität Graz, Dissertation (Schmidt)	Nationalparkverwaltung Nockberge (Kärnten)
Finster Martin	Universität Salzburg, bis 31.05. Diplomarbeit, ab 01.10. Dissertation (Wanzenböck)	ÖAW DOC Stipendium
Gächter Elke	Universität Salzburg, Dissertation (Weisse)	FWF
Greisberger Sonja	Universität Wien, Dissertation (Teubner)	CLIME
Kaiblinger Christina	Universität Wien, Dissertation (Dokulil)	CLIME
Kosol Simone	Universität Salzburg, Diplomarbeit bis 31. Juli (Kurmayer)	FWF P15709
Kramberger Gerwin	Universität Salzburg, Praktikum im August (Kurmayer)	privat
Landauer Corinna	Universität Salzburg, Praktikum im Juli (Kurmayer)	privat
Laufenstein Nicole	Universität Salzburg, Pflichtpraktikum Bakkalaureat, 18.07.-12.08.	

	(Weisse)	
Liu Quian	Hohai University, Nanjing, China, MSc, bis Ende Februar (Kurmayer)	IPGL
Mayr Stefan	Universität Salzburg, Diplomarbeit (Wanzenböck)	keine
Minati Klaus	Universität Graz, Institut für Paläontologie, Dissertation (Danielopol, Prof. Piller)	FWF
Molitor Carole	Universität Innsbruck, Diplomarbeit, ab August (Kurmayer)	FWF P18185
Moser Michael	Universität Salzburg, Diplomarbeit (Weisse)	ÖAW
Neubauer Walter	Universität Salzburg, Institut für Mathematik, Diplomarbeit (Danielopol, Prof. Linhart)	FWF
Pamminger-Lahnsteiner, Barbara	Universität Salzburg, Dissertation (Wanzenböck)	KIÖS Projekt, Institut, FWF
Roth Monika	Universität Salzburg, Diplomarbeit (Schmidt)	ÖAW
Rychert Krzysztof	Sea Fisheries Institute, Gdynia, POLAND, 22.-25.02., Feeding experiments (Boenigk)	Polen
Schauer Michael	Universität Salzburg, Dissertation, Abschluss 3/05 (Hahn)	FWF P15655
Schober Eva	Universität Wien, bis 30.09., Dissertation (Kurmayer)	EU-Projekt PEPCY
Scheuerl Thomas	Universität Salzburg, Pflichtpraktikum Bakkalaureat, 01.-30.09.	
Weliange Wasantha Sena	University of Kelaniya, Zoology Department, 3 Monate, PhD (Leichtfried, Füreder)	ÖAD Projekt
Wu Qinglong	Nanjing Institute of Geography and Limnology, Academia Sinica, Nanjing, VR China, Dissertation, Abschluss 3/05 (Hahn)	ÖAD

International Postgraduate Training Course in Limnology

OCHIENG, Hannington	NARO- Fisheries Resources Research Institute (FIRRI), P.O.Box 343, Jinja, UGANDA, 02.04.-21.08., IPGL-Kurs.	BMAA
SHARAFF, Fathima F.C.	Institute for Fundamental Studies, Hantana Road, Kandy, SRI LANKA, 02.04.-21.08., IPGL-Kurs, 22.08.-31.12., Dr. T. Battin & IPGL.	BMAA & UNESCO-IHE
DHUNGANA, Purna	District Agriculture Development Office, Chitwan, NEPAL, 02.04.-21.08., IPGL-Kurs.	BMAA
BETT, Alice	Kenya Wildlife Service, Research and Planning, P.O.Box 40241, Nairobi, KENYA, 02.04.-21.08., IPGL-Kurs.	BMAA
IVANOVSKI, Aleksandar	Ministry of Environment and Physical planning, Macedonian Environmental Information Center, Svetlana Gjorgjeva, REP. MACEDONIA, 02.04.-21.08., IPGL-Kurs.	BMAA
BANZRAGCH, Zagas	Institute of Meteorology & Hydrology, Khudaladaany gudamj-5, Ulanbaatar-46, MONGOLIA, 02.04.-21.08., IPGL-Kurs.	BMAA
MEGAHED, Sherif A.	The Ministry of Water Resources & Irrigation (MWRI), Water Quality Management Unit (WQMU), P.O.Box 12666, Imbaba, Giza, EGYPT, 02.04.-21.08., IPGL-Kurs.	Weltbank
YOMBA, Wilson, S.	The Department of Natural Resources & Tourism, District Fisheries Urambo, P.O.Box 37, Urambo, TANZANIA, 02.04.-21.08., IPGL-Kurs.	DANIDA
RAUB, Sonja, Ch.	University of California, 6127 Contra Costa Road, Oakland CA 94618, USA, 02.04.-21.08., IPGL-Kurs.	selbstfinanziert
LUYIGA, Jane	Fisheries Resources Research	BMAA

BIRRU, Firew H.	Institute (FIRRI), UGANDA, 02.05.-19.08., Technician Programme.	
PICHIRIKKAT, R. Rajeev	NFLARRC, P.O.Box 64, Sebeta, ETHIOPIA, 02.05.-15.06., Short course: "Lake Ecology".	NFP
MANGORA, Mwita M.	St. Albert´s College, Kochi 682 018, Kerala, INDIA, 20.06.-08.07., Short course: "Fishparasites & Fishpond Management".	NFP
MULI, Jones R.	Institute of Marine Sciences, P.O.Box 668, Zanzibar, TANZANIA, 11.07.-29.07., Short course: "Wetland & Floodplain Ecology"	NFP
DOS SANTOS, Raquel A. Lopes	KMFRI, P.O.Box 1881, Kisumu, KENYA, 01.08.-19.08., Short course: "Water quality monitoring & bioindicators".	NFP
TIBATEMWA, Sarah M.	ISECMAR, Superior Institute of Engineer and Maritime Science, Ribeira de Juliao, Mindelo, CP No 163, CAPE VERDE, 01.08.-19.08., Short course: "Water quality monitoring & bioindicators".	NFP
SENEVIRATNA, A. G.D.H.	National Water & Sewerage Cooperation (NWSC), P.O.Box 7053, Kampala, UGANDA, 01.08.-19.08., Short course: "Water quality monitoring & bioindicators".	NFP
FUQAHA, Abdel H. M. A.	Department of Zoology, University of Jayewardenepura, Nugegoda, SRI LANKA, 01.08.-19.08., Short course: "Water quality monitoring & bioindicators".	NFP
PALENCIA AGUILAR, Carla I.	Birzeit University, Biology & Biochemistry Dept., P.O.Box 14, West Bank, Ramallah, PALESTINE, 01.08.-19.08., Short course: "Water quality monitoring & bioindicators".	BMAA
	GiCaP Products Ltda., Calle 125 No 31-14 Piso 4, Bogota, COLOMBIA, 20.06.-08.07.,	selbstfinanziert

MESSER, Willem P.	Short course: "Fishparasites & Fishpond Management", 11.-29.07., Short course: "Wetland & Floodplain Ecology" und 01.-19.08., Short course: "Water quality monitoring & bioindicators". Ministry of housing, spatial planning and the Environment, Postbus 30945, 2500 GX , The Hague, THE NETHERLANDS, 11.-29.07., Short course: "Wetland & Floodplain Ecology".	selbstfinanziert
AL HADDABI, Mansour H.	Sultan Qaboos University, P.O. Box 21, Al-Khod 123, SULTANATE OMAN, 01.-19.08., Short course: "Water quality monitoring & bioindicators"..	selbstfinanziert
BELLO, Hudu	Federal Capital Territory Water Board, P.M.B. 163, Garki, Abuja, NIGERIA, 01.-19.08., Short course: "Water quality monitoring & bioindicators".	selbstfinanziert
KIFUKO Richard	Makerere University, Zoology Dept., UGANDA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
RWABUKWIIRE Magume S.	Ntungamo District Local Govt., P.O.Box 1, Ntungamo, UGANDA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
KAAYA Lulu T.	University of Dar es Salaam, P.O.Box 35064, Dar es Salaam, TANZANIA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
MATOLA, Hakimu, D.	Tanzania Fisheries Research Institute, Dar es Salaam, TANZANIA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
AYOKU, Dick	Department of Fisheries Resource, Entebbe, UGANDA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
MBONDE, Athanasio, S.	TAFIRI Sota, TANZANIA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA

CAVALLO Mulugeta J.	NFLARRC, P.O.Box 64, Sebeta, ETHIOPIA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA & UNESCO
WANJALA, Stella N.	Moi University, Dept. Zoology, P.O.Box 1125, Eldoret, KENYA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
KYULE, Domitila N.	Kenya Marine & Fisheries Research Institute (KMFRI), P.O.Box 1881, Kisumu, KENYA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
KUBASU, Kizito, M.	Egerton University, Natural Resources Dept., P.O.Box 536, Njoro, KENYA, 12.09.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
SIKACHOMA, C.	University SDA Church, P.O.Box 32379, Lusaka, ZAMBIA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA & UNESCO
FASIL, Degefu A.	NFLARRC, P.O.Box 64, Sebeta, ETHIOPIA, 12.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
ODHIAMBO, Charles O.	Kenyatta University, Biol. Science Dept., P.O.Box 43844, Nairobi, KENYA, 12.09.-30.09., Short course: "Tropical Limnology".	BMAA
FUNGOMELI, Maria M.	Community Based Butterfly Farm, P.O.Box 58, Gede, KENYA, 01.01.-30.10., Prof. Waidbacher, DI Straif & IPGL..	BMAA
RONGOEI, Priscah J.	Egerton University, Dept. of Env. Science, P.O.Box 536, Njoro, KENYA, 01.01.-30.10., Dr. Kreuzinger & IPGL.	BMAA
KAGGWA, Mary N.	Makerere University, Dept. of Zoology, P.O.Box 7062, Kampala, UGANDA, 01.01.-30.10., Dr. Schagerl & IPGL.	BMAA
DESTA, Kassahun A.	Ethiopian Agricultural Research Organization (EARO), P.O.Box 121849, Addis Ababa, ETHIOPIA 01.01.-30.10., Prof.	BMAA

MUSHI, Douglas W.	Waidbacher, DI Straif & IPGL. University of Dar es Salaam, Dept. of Botany, Microbiology Unit, P.O.Box 35065, Dar es Salaam, TANZANIA, 01.01.- 30.10., Dr. Farnleitner, Dr. Byamugisha & IPGL.	BMAA
AKOLL, Peter	Makerere University, Dept. of Zoology, P.O.Box 7062, Kampala, UGANDA, 01.01.- 30.10., Dr. Konecny & IPGL.	BMAA
LIU, Qian	Hohai University, College of Traffic & Ocean Engineering, 1 XiKang Road, Nanjing 210098, PR. CHINA, 01.01.-23.02., Dr. Kurmayer & IPGL.	BMAA

3 ERLÄUTERUNGEN ZUR FINANZIERUNG 2005–2011

3.1 Erläuterungen zum Rechnungsabschluss 2005

Der vorläufige Rechnungsabschluss 2005 war nahezu exakt um jene 100.000 € niedriger als im BVA 2005 geplant, die für den vorgesehenen, im Berichtszeitraum aber nicht erfolgten Ausbau des Institutsgebäudes als Beteiligung des Instituts veranschlagt waren. Diese Differenz erscheint im Betriebsaufwand (S. 2 im Anhang, v. a. 5.1), während die tatsächlichen Aufwendungen für Personal, Material und den Betrieb des Gebäudes weitgehend der Planung entsprachen. In der Summe wurde das Ordinarium mit einem positiven Saldo von 63.500 € abgeschlossen. Die Ein- und Ausgaben für Drittmittel waren höher als in der Finanzierungsübersicht genannt, weil hier nur die über die ÖAW verwalteten Projekte einfließen und der Rechnungsabschluss zum Zeitpunkt der Berichterstellung noch nicht für alle Drittmittelprojekte vorlag. Einschließlich der ad personam-Projekte betragen die Drittmittelausgaben ca. 1.05 Mio € (s. Drittmittelaufstellung am Ende des Anhangs), das sind 41.5% des Gesamthaushalts.

3.2 Erläuterungen zum Budgetvoranschlag 2006

Der Budgetvoranschlag 2006 basiert auf dem zugewiesenen Ordinario von 1.624 Mio €, wobei ca. 72% auf die Personalkosten entfallen. Eine Erhöhung des sonstigen Aufwandes gegenüber 2005 ist vor allem bei den wissenschaftlichen Geräten (Kostenstelle 0410) vorgesehen, weil im Zuge der genehmigten FWF-Projekte mehrere, der Grundausstattung zuzurechnende Geräte beschafft werden müssen. Der Drittmittelanteil wird im laufenden Jahr mehr als 1.1 Mio € betragen, wobei jedoch 300.000 € auf das Genomprojekt entfallen, die dem Institut nur mittelbar zu Gute kommen.

3.3 Aktualisierung des / Erläuterungen zum Budgetantrag 2007-2011

Der BA 2007 berücksichtigt den Inflationsausgleich und ist 3 % höher als der BVA 2006. Zugesagte Drittmittel betragen über 700.000 €. Eine realistische Planung über das Jahr 2007 hinaus ist derzeit weder für das Ordinarium, noch für das Drittmittelaufkommen möglich.

5. Mid-Term Research Programme 2006-2010

Mid-term Research Programme 2006-2010 of the Institute for Limnology of the Austrian Academy of Sciences



(Translation of the version originally written in German in April 2005)

1. Main objective of the research programme of the Institute for Limnology

The study of ***“Ecophysiology and evolutionary ecology of aquatic organisms and communities”*** shall remain the primary research objective of the Institute for Limnology. We aim, however, at some modifications with regard to its content and structure. Based upon the focus of the Mid-term Research Programme (MRP) 2001-2005 and taking into consideration some structural changes in the course of the extension of the Institute and the replacement of four research positions within the next three years, we will modify the existing research programme within MRP 2006-2010. Two new research areas were developed within the previous programme ***“Formation and maintenance of diversity at the level of individuals, populations, species, and ecosystems”***: (1) A formerly unknown intraspecific diversity was demonstrated within microbial ecology and (2) climate-related algal and paleolimnological research revealed the importance of catchment area and long-range climatic effects for lake ecosystems. Within the MRP 2006-2010 we aim at a synthesis of these two subject areas by complementing the existing limnological research with investigations in terrestrial ecology and theoretical evolutionary biology. The perspective is a forward-looking research orientation under a changing socio-economic context, which requires increased public awareness of our research and demands for a more direct applicability of the results of basic research. These topical and structural changes may suggest a change of the Institute’s name into ‘Institute for Aquatic and Evolutionary Ecology’. A further goal of this change of name is the signalling effect with regard to the development of a new, interdisciplinary research area.

2. Catalogue of priorities

The former research focus is replaced by the modified objective, to investigate the ***“Extent, origin and ecological significance of intraspecific diversity of aquatic micro- and macroorganisms”***. This theme shall have the highest priority in all research fields of the Institute. The principle differences between prokaryotic and

eukaryotic organisms shall be illuminated. Genomes of microorganisms often differ considerably within one species, whereas such differences are smaller in higher organisms (e.g. vertebrates); however, intraspecific differentiation is also known for the latter (e.g. ecotypes). The obvious, fundamental differences between micro- and macroorganisms gained only minor importance in ecological research. The ecological significance of the intraspecific genetic diversity (microdiversity) shall be investigated in our laboratory for aquatic macroorganisms (e.g. coregonids in fish ecology) and microorganisms (heterotrophic bacteria, phototrophic cyanobacteria, fungi and protists). All the organisms shall be investigated by means of novel molecular and genetic methods; furthermore the effects of catchment area shall be investigated, specifically for microorganisms, because a global and ubiquitous distribution is currently assumed for the latter. The main challenge of such a research program is to link intraspecific molecular diversity with ecological aspects. With respect to biogeography this has already been investigated in microbial ecology within the MRP 2001-2005. Does high intraspecific genetic diversity correspond to a high ecological potential, i.e. a wide ecophysiological reaction norm? Or do, in contrast, only a few key genes determine the ecological amplitude? Different time scales, ranging from short-term, reversible acclimations to evolved and genetically fixed adaptations need to be considered for answering these key questions. Palaeolimnology offers the opportunity to analyse long-term variation, which is not accessible from evolutionary and ecological research with extant organisms.

The research programme outlined above is at the cutting edge within aquatic ecology, linking limnology with terrestrial and evolutionary ecology. The new research programme continues the scientific demand of the former, i.e. to recognise limnology as a sub-discipline of ecology and to give impulses for the higher research field. We will continue to use aquatic organisms and ecosystems to address general ecological and evolutionary issues. Even though these research issues are primarily related to basic research, there is a gradual transition to applied limnology, for instance with respect to the toxin production of cyanobacteria and the ecology of groundwater organisms. Groundwater resources will increasingly become important for maintenance of the human population in the 21st century, and microorganisms are responsible for element flow and detoxification of xenobiotics. Still, the genetic diversity and physiological capacity of groundwater organisms are largely unknown. The unity of basic and applied limnology is further demonstrated by the evaluation of

the ecological integrity of inland waters as demanded by the EU water framework directive. As a second priority, the Institute will try to keep a broad professional expertise to act as consultant for regional and federal agencies. In third priority, the Institute will continue its educational efforts. The International Postgraduate Programmes in Limnology (IPGL) has a leading role at the interface between research and education. The IPGL has an excellent national and international reputation regarding the transfer of knowledge to African and Asian (mainly China) countries. Several current and future research projects are based upon the long-term cooperation with former IPGL students. The qualified senior scientists will continue their lecturing at the universities of Salzburg, Vienna, and Innsbruck. Graduate and post-graduate students shall be integrated more closely into the institute's research activities than it is usual and feasible at most Austrian universities.

6. Mid-term Research Programme 2001-2005

Institute for Limnology - Mid-term Research Programme 2001-2005

Necessity of a new research focus

Limnology is the comprehensive study of biological properties of inland waters in their physical-chemical context. As a scientific discipline in the modern sense, limnological research has been conducted for approximately 100 years. Traditionally, limnology investigates, as a subdiscipline of ecology, the interactions determining the occurrence and abundance of organisms in inland waters; the cycling of matter and the energy budget of waters are studied holistically. The hitherto existing research approach, as formulated in the foregoing Mid-term Research Programme 1996-2000 (MRP 1996-2000), stressed this ecosystem oriented approach. The primary goal was "The study of aquatic ecosystems, in particular, stagnant and running waters including ground water". The study of the following questions were listed as the most important research tasks in the MRP 1996-2000:

- Structure, function, and long-term changes of inland waters
- Autecology of aquatic organisms and their interactions with their environment including their adaptations to changing environmental conditions

The hitherto existing research approach was too broad, considering the existing infrastructure and the staff resources; a corporate identity of the Institute, which would render it discernible from similar research institutions and from university departments, could not be developed to a desirable extent; this was regretted by the reviewers during the last evaluation. The decision by the Austrian Academy of Sciences to close the Institute's "Lunz Department" in 2003 at the latest, the appointment of a new director, and the retirement of several scientists in the mid-term, will lead to personal and structural changes in the near future; the new research approach shall account for these changes. A new approach appears also necessary in view of a rapidly changing scientific and social environment at the start of a new century.

The institute intends to focus the resources towards a realistic, common goal. This will necessarily imply diminution of some hitherto conducted research topics; that is, stream ecology, which was one of the Institute's foci and the only focus of the Department Lunz, will have to be largely given up. The research programme outlined in the following refers, therefore, mainly to the Institute's "Mondsee Department".

Ecophysiology and Evolutionary Ecology as the primary research topics

The previous research approach shall be replaced by the new approach "*Ecophysiology and Evolutionary Ecology of aquatic organisms and communities*". In pursuit of this task, scientists at the Institute will be encouraged to address fundamental ecological processes and principles, and to better exploit the specific advantages of limnology, such as the comparatively easy access to its research objects and the short time scales of essential processes, relative to the related disciplines of marine and terrestrial ecology.

The "**origin and maintenance of diversity and complexity at the levels of the individual, population, species and ecosystem**" has been chosen as the central theme of the new research focus. This research theme shall integrate the ongoing and, for the near future, planned projects of the existing working groups and shall serve as a framework for the appointment of new personal.

Microorganisms as primary research objects

Whilst, during the past century, limnological research concentrated on higher organisms, which contribute less than ten percent to the cycling of matter in aquatic ecosystems, microorganisms (bacteria and protists) will be a focus of the Institute's research in the future; the latter are responsible for over ninety percent of the transfer of matter and are, therefore, more important than macroorganisms for biogeochemical cycling. These investigations shall be linked to complementary studies of macroorganisms. Essential phenomena, e.g., the significance of clonal differences for the maintenance of genotypic and phenotypic diversity within an exclusively or primarily asexually reproducing population, can be studied particularly well with short-lived microorganisms. Evolutionarily ancient predator-prey interactions between heterotrophic flagellates and bacteria have resulted in various mutually-adaptive survival strategies, which we have only begun to understand. These strategies are certainly not limited to aquatic organisms, yet they can be studied in relatively simple cultures in suspension. Macroorganisms will be further studied as objects of biodiversity and evolutionary ecology, for example those living in ground water and in the River Danube. Fish and the fish communities will be further investigated as indicators of the ecological status of lakes and as objects of behavioural physiology. Enhanced application of novel techniques from molecular biology, hydroacoustics, and flow cytometry will be inherent to the new approach. These novel methods will enable, to a large extent, automatic quantification of processes and structures at the individual and

population levels. Analytical, experimental work shall be supported, while largely descriptive field work shall become of minor importance.

It is an outstanding aspiration of the future research of the Institute to perceive limnology as a subdiscipline of ecology and to provide stimuli to the field of ecological research as a whole. In this context, aquatic organisms and ecosystems can be seen as comparatively accessible subjects for the study of ecological and evolutionary questions of general relevance. The primary goal is no longer to analyse an aquatic ecosystem in all its complexity, but rather to recognise and characterise key cross-system processes and structures. Such an approach needs to consider the varying time scales. It is the aim of the Institute's paleolimnological research, by selecting sensitive groups of organisms (bioindicators), to analyse the significance of past environmental parameters for the historic changes of organisms and communities and to come up with predictions on the significance of climatic factors for future developments. Similarly, ground water crustacea will be used to analyse the factors which caused morphological adaptations of individual species and led to phylogenetic shifts in the species spectrum. In both cases, reconstruction of historic processes shall lead to conclusions about the most important long-term factors, which are not amenable to experimental manipulation but which impact extant communities. Medium-term processes including critical periods in the life cycle of fish or macrozoobenthos populations will also be studied. The effect of short-term processes, including the important issue of the organisms' physiological adaptation to short-term environmental changes (e.g., nutrient pulses, temperature changes), is being studied by several working groups with unicellular organisms. As a part of this, theoretical approaches from network thermodynamics will be pursued further to understand physiological adaptations of organisms as a complex interplay of energy converting subsystems in a single cell. In this respect, it will be of major interest in the years to come to analyse how a given adaptational event results from the organisms' previous history.

In all cases, basic biological phenomena and processes are being studied, with different temporal resolution, with respect to the overall research goal outlined above. In all probability, these phenomena and processes are not only specific for aquatic ecosystems. Taken together, the conclusions, primarily obtained independently from each other in the different research projects, will potentially lead to the discovery of new, general rules, which may explain the origin and/or the maintenance of diversity and complexity in (aquatic) ecosystems. The new research approach and the main research subject of the next five years are in

accordance with research priorities, which have been named recently by some leading authorities for the limnological research in the 21st century.

Although the research subjects belong primarily to basic research, there is a transition towards applied limnology. This holds true, for example, for microbial ecology of ground waters. The ground water stocks will become increasingly important for the human water supply during the 21st century, and microorganisms are primarily responsible for the turnover of matter including detoxification of harmful xenobiotics. In spite of this significance, genetic diversity and physiological capacities of ground water microbes are almost unknown. The interaction between basic research and applied limnology is also illustrated by the evaluation of the ecological functioning of inland waters, as it is postulated within the water directive of the European Union by its member states. Maintenance of diversity and complexity at the level of the ecosystem is an inherent criterion of this directive, although a causal analysis of the respective environmental factors is not intended. Our research shall contribute to the causal understanding of the origin and maintenance of diversity and complexity, i.e., investigate system properties beyond the individual case studies.

7. Peer-reviewed publications 2006-2008 (Staff scientists in bold face, project scientists, graduate students, laboratory assistants and guest researchers underlined)

- Anneville, O., Kaiblinger, C., Tadonl  k  , R.D., Druart, J.-C. & **Dokulil, M.T.** (2008) Contribution of long-term monitoring to the European Water Framework Directive Implementation. In: Sengupta, E. & Dalwani, R. (eds.), Proceedings of Taal 2007: The 12th Large Lake Conference, pp. 1122-1131, CD-ROM, Ministry of Environment & Forests, New Delhi.
- Auinger, B.M., Pfandl, K. & **Boenigk, J.** (2008) An improved methodology for the identification of protists and microalgae from Lugol-fixed plankton samples: Combining microscopical analysis with single cell PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2505-2510.
- Boenigk, J.** (2008) The past and present classification problem in nanoflagellates. *Protist* 159: 319-337.
- Boenigk, J.**, Jost, S., Stoeck, T. & Garstecki, T. (2006) Differential thermal adaptation of clonal strains of a protist morphospecies originating from different climatic zones. *Environ. Microbiol.* 9 : 593-602.
- Boenigk, J.**, Jost, S., Stoeck, T. & Garstecki, T. (2007) Differential thermal adaptation of clonal strains of a protist morphospecies originating from different climatic zones. *Environ. Microbiol.* 9: 593-602.
- Boenigk, J.**, Pfandl, K., Garstecki, T., Novarino, G. & Chatzinotas, A. (2006) Evidence for geographic isolation and signs of endemism within a protistan morphospecies. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5159-5164.
- Boenigk, J.**, Pfandl, K. & Hansen, P. (2006) Exploring strategies for nanoflagellates living in a 'wet desert'. *Aquat. Microb. Ecol.* 44: 71-83.
- Christiansen, G., **Kurmayer, R.**, Liu, Q. & Börner, T. (2006) Transposons inactivate the biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 117-123.
- Christiansen, G., Molitor, C., Philmus, B., **Kurmayer, R.** (2008) Non-Toxic Strains of Cyanobacteria are the Result of Major Gene Deletion Events Induced by a Transposable Element. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1695-1704.
- Christiansen, G., Yoshida, W., Blom, J., Portmann, C., Gademann, K., Hemscheidt, T., **Kurmayer, R.** (2008) Isolation and Structure Determination of Two Microcystins and Sequence Comparison of The McyABC Adenylation Domains in *Planktothrix* species. *J. Nat. Prod.* : (in press)
- Danielopol, D.L.**, Gibert, J. & Griebler, C. (2006) Efforts of the European Commission between environmental scientists and policy-makers. *ESPR – Environ. Sci. & Pollut.*

Res. 13: 138-139.

- Danielopol, D.L.**, Griebler, C., Gunatilaka, A., Hahn, H. J., Gibert, J. et al. (2007) Incorporation of groundwater ecology in environmental policy. In: Quevauviller, P. (Hrsg.), *Groundwater Science and Policy*; Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 671-689.
- Dokulil, M.T.** (2006) Short and long term dynamics of nutrients, potamoplankton and primary productivity in an alpine river (Danube, Austria). *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 158/4, Large Rivers 16: 473-493.
- Dokulil, M.T.**, Donabaum, K. & Pall, K. (2006) Alternative stable states in floodplain ecosystems. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 6: 37-42.
- Dokulil, M.T.**, Donabaum, K. & Teubner, K. (2007) Modifications in phytoplankton size structure by environmental constraints induced by regime shifts in an urban lake. *Hydrobiologia* 578: 59-63.
- Dokulil, M.T.**, Jagsch, A., George, G.D., Anneville, A., Jankowski, T., Wahl, B., Lenhart, B., Blenckner, T. & Teubner, K. (2006) Twenty years of spatially coherent deep-water warming in lakes across Europe related to the North Atlantic Oscillation. *Limnol. Oceanogr.* 51: 2787-2793.
- Dokulil, M.T.**, Teubner, K. & Jagsch, A. (2006) Climate change affecting hypolimnetic water temperatures in deep alpine lakes. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29: 1285-1288.
- Fesl, C., & **Humpesch, U.H.** (2006) Spatio-temporal variability of benthic macroinvertebrate community attributes and their relationships to environmental factors in a large river (Danube, Austria). *Arch. Hydrobiol., Suppl.* 158, Large Rivers 16: 329-350.
- Fleituch, T., **Leichtfried, M.** (2007) Electron Transport System (ETS) Activity in Alder Leaf Litter in Two Contrasting Headwater Streams. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 92 : 378-391.
- Foissner, W., Pichler, M., Al-Rahsheid, K. & **Weisse, T.** (2006) The unusual, Lepidosome-coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): encystment and genesis and release of the lepidosomes. *Acta Protozool.* 45: 323-338.
- Gächter, E. & **Weisse, T.** (2006) Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. I. Temperature response. *Aquat. Microb. Ecol.* 45: 291-300.
- Gächter, E. & **Weisse, T.** (2008) Long-term acclimation of growth rates in the oligotrich freshwater ciliate *Meseres corlissi*. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 30: 218-222.
- Gassner, H. & **Wanzenböck, J.** (2007) Application of population size structure indices to Austrian whitefish (*Coregonus* sp.) stocks. *Fund. Appl. Limnol./Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 60: 377-384.

- Greisberger, S., **Dokulil, M.T.** & Teubner, K. (2008) A comparison of phytoplankton size-fractions in Mondsee, an alpine lake in Austria: distribution, pigment composition and primary production rates. *Aquat. Ecol.* 42: 379-389.
- Hahn, M.W.** (2006) The microbial diversity of inland waters. *Curr. Opin. Biotech.* 17: 256-261.
- Hahn, M.W.** & Schauer, M. (2007) '*Candidatus Aquirestis calciphila*' and '*Candidatus Haliscomenobacter calcifugiens*', filamentous, planktonic bacteria inhabiting natural lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 936-940.
- Helešić, J., **Leichtfried, M.**, Wagner, F., & Omesova, M. (2006) Investigations on gravel bars and the hyporheic zone in an alpine and two hercynian streams in Central Europe. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29: 1511-1515.
- Ishida, K., Christiansen, G., Yoshida, W.Y., **Kurmayer, R.**, Welker, M., Bonjoch, J., Hertweck, C., Börner, T., Hemscheidt, T., & Dittmann, E. (2007) Biosynthetic pathway and structure analysis of aeruginoside 126A and B, cyanobacterial peptide glycosides bearing an unusual 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole moiety. *Chem. Biol.* 14: 565-576.
- Kaiblinger, C. & **Dokulil, M.T.** (2006) Application of Fast Repetition Rate Fluorometry to phytoplankton photosynthetic parameters in freshwaters. *Photosynth. Res.* 88: 19-30.
- Kaiblinger, C., Greisberger, J., Teubner, K. & **Dokulil, M.T.** (2007) Photosynthetic efficiency as a function of thermal stratification and phytoplankton size structure in an oligotrophic alpine lake. *Hydrobiologia* 578: 29-36.
- Kornicker, L.S., **Danielopol, D.L.** & Humphreys, W.F. (2006) Description of the anchialine ostracode *Danielopolina* sp. cf. d. *kornickeri* from Christmas Island, Indian Ocean. *Crustaceana* 79: 77-88.
- Kosol, S., Schmidt, J. & **Kurmayer, R.** (2008) Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp.. *Europ. J. Phycol.* 43: (in press)
- Kurmayer, R.** & Gumpenberger, M. (2006) Diversity of microcystin genotypes among populations of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* and *Planktothrix agardhii*. *Mol. Ecol.* 15:3849-3861.
- Lamatsch, D.K.**, Fischer, P., Geiger, M., Lampert, K.P., Schlupp, I., Scharl, M. (2008) Diploid Amazon mollies (*P. formosa*) show a higher fitness than triploids in clonal competition experiments. *Evol. Ecol.*: [doi:10.1007/s10682-008-9264-2](https://doi.org/10.1007/s10682-008-9264-2)
- Lamatsch, D.K.**, Lampert, K.P., Fischer, P., Scharl, M. (2008) A tetraploid Amazon molly, *Poecilia formosa*. *J. Hered.* 99: 223-226.
- Lamatsch, D.K.** & Stöck, M. (in press) Paternal leakage in unisexual fishes. In: Lost sex! (eds. Schön, I., Martens, K. & van Dijk, P.), Springer Berlin/Heidelberg.

- Leichtfried, M.** (2007) The Energy Basis of the Consumer Community in Streams Yesterday, Today and Tomorrow... *Internat. Rev. Hydrobiol.* 92 (4 - 5): 363 – 377.
- Loewe, L. & **Lamatsch, D.K.** (2008) Muller's ratchet may threaten the Amazon molly and other ancient asexuals. *BMC Evol. Biol.* 8: 88-108.
- M'Erimba, Ch.M., **Leichtfried, M.**, Mathooko, J.M. (2007) Particulate Organic Matter (POM) in the Humid and Wet Zones of the Ellegirini River, Kenya. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 92 (4-5): 392-401.
- M'Erimba, Ch.M., Mathooko, J.M., & **Leichtfried, M.** (2006) Variations in coarse particulate organic matter in relation to anthropogenic trampling on the banks of the Njoro River, Kenya. *Afr. J. Ecol.* 44: 1-5.
- Mikheev, V.N., **Wanzenböck, J.** & Pasternak, A.F. (2006) Effects of predator-induced visual and olfactory cues on 0+ perch (*Perca fluviatilis* L.) foraging behaviour. *Ecol. Freshw. Fish* 15: 111-117.
- Montagnes, D.J.S., Morgan, G., Bissinger, J.E., Atkinson, D. & **Weisse, T.** (2008) Short-term temperature change may impact freshwater carbon flux: a microbial perspective. *Global Change Biology* 14: (in press).
- Müller, H., Foissner, W. & **Weisse, T.** (2006) The role of soil in the life cycle of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): experiments with two clonal strains from the type locality, an astatic meadow pond. *Aquat. Microb. Ecol.* 42: 199-208.
- Naselli-Flores, L., Barone, R., Chorus, I., & **Kurmayer, R.** (2007) Toxic cyanobacterial blooms under a semiarid mediterranean climate: The magnification of a problem. *Environ. Toxicol.* 22: 399-404.
- Pasternak, A.F., Mikheev, V.N. & **Wanzenböck, J.** (2006). How plankton copepods avoid fish predation: From individual responses to variations of the life cycle. *J. Ichthyol.* 46 (Suppl. 2): 220-226.
- Persson, I., Jones, I., Sahlberg, J., **Dokulil, M.**, Hewitt, D., Leppäranta, M. & Blenckner, T. (2005, published in 2006) Modeled thermal response of three European lakes to a probable future climate. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29: 667-671.
- Pfandl, K., & **Boenigk, J.** (2006) Stuck in the mud: Suspended sediments as a key issue for survival of bacterivorous protists. *Aquat Microb Ecol* 45: 89-99.
- Philmus, B., Christiansen, G., Yoshida, W., Hemscheidt, T. (2008) Posttranslational Modification in Microviridin Biosynthesis. *Chembiochem*: (in press)
- Schauer, M., Jing, J., & **Hahn, M.W.** (2006) Recurrent seasonal variations in abundance and composition of filamentous SOL cluster bacteria (*Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*) in oligomesotrophic Lake Mondsee (Austria). *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4704-4712.
- Schmidt, R.**, Kamenik, C. & Roth, M. (2007) Siliceous algae-based seasonal temperature inference and indicator pollen tracking ca. 4,000 years of climate/land use

- dependency in the southern Austrian Alps. *J. Paleolimnol.* 38 (4): 541-554.
- Schmidt, R.**, Kamenik C., Tessadri, R. & Koinig, K.A. (2006) Climatic changes from 12,000 to 4,000 years ago in the Austrian Central Alps tracked by sedimentological and biological proxies of a lake sediment core. *J. Paleolimnol.* 35: 491-505.
- Schmidt, R.**, Roth, M., Tessadri, R. & Weckström, K. (2008). Disentangling late-Holocene climate and land use impacts on an Austrian alpine lake using seasonal temperature anomalies, ice-cover, sedimentology, and pollen tracers. *J. Paleolimnol.* 40: 453-469.
- Schober, E. & **Kurmayer, R.** (2006) Evaluation of different DNA sampling techniques for the application of the real-time PCR method for the quantification of cyanobacteria in water. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 412-417.
- Schober, E., Werndl, M., Laakso, K., Korschineck, I., Sivonen, K., **Kurmayer, R.** (2007) Interlaboratory comparison of Taq Nuclease Assays for the quantification of the toxic cyanobacteria *Microcystis* sp. *J. Microbiol. Methods* 69: 122-128.
- Schön, I., **Lamatsch, D.K.**, Martens, K. (2008) Lessons to Learn from Ancient Asexuals. In: *Genome Dynamics & Stability*, Vol. 3 (eds. Lanckenau, D. & Egel, R.) Springer Berlin / Heidelberg.
- Šimek, K., Horňák, K., Jezbera, J., Nedoma, J., Vrba, J., Straškrábová, V., Macek, M., Dolan, J.R., & **Hahn, M.W.** (2006) Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ. Microbiol.* 8: 1613-1624.
- Snell, T. W., Kubanek, J., Carter, W., Payne, A.B., Kim, J., Hicks, M. & **Stelzer, C.P.** (2006) A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Mar. Biol.* 149: 763-773.
- Stelzer, C.P.** (2006) Changes in the competitive abilities of two planktonic rotifer species at different temperatures: an experimental test. *Freshw. Biol.* 51: 2187-2199.
- Stelzer, C.P.** (2008) Obligate asex in a rotifer and the role of sexual signals. *J. Evol. Biol.* 21 (1): 287–293.
- Stelzer, C.P.** & Snell, T.W. (2006) Specificity of the crowding response in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Limnol. Oceanogr.* 51: 125-130.
- Stoeck, T., Jost, S., **Boenigk, J.** (2008) Multigene phylogenies of clonal *Spumella*-like strains, a cryptic heterotrophic nanoflagellate, isolated from different geographic regions. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 58:716-124.
- Teubner, K., Tolotti, M., Greisberger, S., Morscheid, H., **Dokulil, M.T.** & Kucklantz, V. (2006) Steady state of phytoplankton and implications for climatic changes in a deep pre-alpine lake: epilimnetic versus metalimnetic assemblages. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29: 1688-1692.
- Timmermeyer, N. & **Stelzer, C.P.** (2006) Induction of sexual reproduction in *Synchaeta*

- tremula (Rotifera, Monogononta). J. Plankton Res. 28: 1233-1239.
- Vannini, C., Pöckl, M., Petroni, G., Wu, Q.L., Lang, E., Stackebrandt, E., Schrallhammer, M., Richardson, P.M. & **Hahn, M.W.** (2007) Endosymbiosis in statu nascendi: Close phylogenetic relationship between obligately endosymbiotic and obligately free-living *Polynucleobacter* strains (*Betaproteobacteria*). Environ. Microbiol. 9: 347-359.
- Waidbacher, H., Liti, M.D., Fungomeli, M., Mbaluka, K.R., Munguti, M.J. & Straif, M. (2006) Influence of pond fertilization and feeding rate on growth performance, economic returns and water quality in a small-scale cage-cum-pond integrated system for production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquacult. Res. 37: 594-600.
- Wanzenböck, J.**, Mikheev, V.N. & Pasternak, A.F. (2006) Modification of 0+ perch foraging behaviour by indirect cues of predation risk. Ecol. Freshw. Fish. 15: 118-124.
- Weisse, T.** (2006a) Freshwater ciliates as ecophysiological model organisms - lessons from *Daphnia*, major achievements, and future perspectives. Arch. Hydrobiol. 167: 371-402.
- Weisse, T.** (2006b) Biodiversity of freshwater microorganisms - achievements, problems, and perspectives. In: Gliwicz, Z. M., Mazurkiewicz-Boron, G. & Rouen, K. (eds.): Advances in European Freshwater Sciences, 2005. Pol. J. Ecol. 54: 633-652.
- Weisse, T.** (2008) Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective. Biodivers. Conserv. 17: 243-259.
- Weisse, T.** & Rammer, S. (2006) Pronounced ecophysiological clonal differences of two common freshwater ciliates, *Coleps spetai* (Prostomatida) and *Rimostrombidium lacustris* (Oligotrichida), challenge the morphospecies concept. J. Plankton Res. 28: 55-63.
- Weisse, T.**, Scheffel, U., Stadler, P. & Foissner, W. (2007). Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. II. Response to pH. Aquat. Microb. Ecol. 47: 289-297.
- Weisse, T.** & Stadler, P. (2006) Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution. Limnol. Oceanogr. 51: 1708-1715.
- Weisse, T.**, Strüder-Kypke, M., Berger, H. & Foissner, W. (2008). Genetic, morphological, and ecological diversity of spatially separated clones of *Meseres corlissi* Petz and Foissner, 1992 (Ciliophora, Spirotrichea). J. Eukaryot. Microbiol. 55: 257-270.
- Wu, Q.L. & **Hahn, M.W.** (2006a) Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake revealed at three phylogenetic levels. FEMS Microb. Ecol. 57: 67-79.
- Wu, Q.L. & **Hahn, M.W.** (2006b) High predictability of the seasonal dynamics of a species-like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake. Environ. Microbiol. 8: 1660-

1666.

- Wu, Q.L., Zwart, G., Schauer, M., Kamst-van Agterveld, M.P. & **Hahn, M.W.** (2006) Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5478-5485.
- Wu, Q.L., Chen, Y., Xu, K., Liu, Z. & **Hahn M.W.** (2007) Intra-habitat heterogeneity of microbial food web structure under the regime of eutrophication and sediment resuspension in the large subtropical shallow Lake Taihu, China. *Hydrobiologia* 581: 241–254.
- Wu, Q.L., Zwart, G., Wu, J., Kamst-van Agterveld, M.P., Liu, S. & **Hahn, M.W.** (2007) Submersed macrophytes play a key role in structuring bacterioplankton community composition in the large, shallow, subtropical Taihu Lake, China. *Environ. Microbiol.* 9: 2765–2774.
- Zick, D., Gassner, H., Filzmoser, P., **Wanzenböck, J.**, Pamminger-Lahnsteiner, B., & Tischler, G. (2006) Changes in the fish species composition of all Austrian lakes >50 ha during the last 150 years. *Fish. Manage. Ecol.* 13: 103-111.

8. Supplementary material to the Annual Reports

8.1 Keynote presentations at international meetings 2006-2008

- Boenigk, J.: The past and present dilemma with protist species, diversity and ecophysiological differentiation. Annual Meeting of the British Society for Protist Biology, Gregynog, UK, 2008
- Boenigk, J.: Summary and future directions. Symposium of Aquatic Microbial Ecology - Workshop on new insights in selective feeding in protists. Faro, Portugal, 2007
- Boenigk, J.: Protist microdiversity: Implications for the interpretation of protist ecology, biogeography and taxonomy. Annual meeting of the scandinavian section of Protozoologists, Helsingor, Denmark, 2006.
- Boenigk, J.: Survival and predation strategies: Different levels of phylogenetic resolution uncover a cryptic diversity of strategies. Gordon Research Conference, Marine Microbes: Activities and interactions, Biddeford, USA, 2006
- Danielopol, D.L. et al.: Groundwater ecology as a necessary link to the EU Water Framework Directive. European Groundwater Conference, Vienna, 2006.
- Dokulil, M.T. & Kaiblinger, C.: Assessment of potamoplankton and primary productivity in the River Danube: A review. 37th IAD Conference, Chisinau, Moldova, 2008.
- Dokulil, M.T.: Longterm Monitoring in the European Water Framework Directive Implementation, International Workshop Sustainability of Lake Restoration and Interventions, Hyderabad, Indien, 2008.
- Dokulil M.T. & Herzig A.: Long term winter data on phyto- and zooplankton from a shallow lake in Austria. 1st International Symposium on Winter Limnology, Kilpisjärvi, Finland 2008
- Dokulil, M.: Eutrophication and restoration of Austrian Lakes, Taal, World Lake Conference, Jaipur, India, 2007.
- Dokulil, M.T.: Climate impacts on Lakes in Central Europe. 5th Symposium for European Freshwater Sciences (SEFS 5), Palermo, Italy, 2007.

Dokulil, M.T. & Kaiblinger, C: Effects of eutrophication, oligotrophication and climate change on phytoplankton dynamics in a large shallow lake, Neusiedlersee, Austria: A review of long-term variability. European Large Lakes Symposium, Tartu, Estonia, 2006.

Kurmayer., R.: Application and validation of qPCR methods for the monitoring of toxin-producing cyanobacteria in freshwater. Plenary lecture. Experts Scientific Workshop on Development, Validation and Implementation of qPCR and PCR methods for use in recreational waters, 12 May-16 May 2008, Cincinnati, Ohio, USA:

Kurmayer, R.: Cyanobacteria and toxin production in freshwater: research priorities from a limnological perspective. Plenary lecture. 5th Symposium for European Freshwater Sciences (SEFS 5) , Palermo, Italy, 2007.

Kurmayer, R.: Phylogenetic and geographic distribution of transposases inactivating the synthesis of the toxic heptapeptide microcystin in cyanobacteria, Gordon Research Conferences, Mycotoxins & Phycotoxins, 17-22 June 2007, Waterville, Maine.

Lamatsch DK: Genetic variability in an freshwater ostracod with mixed reproduction modes. Autumn Meeting of the Genetic Society, Bath, UK, 2008

Leichtfried, M.: The Energy Basis of the Consumer Community in Streams Yesterday, Today and Tomorrow.... – International Conference “River Bottom VI” in Brno, Czech Rep. 2006

Weisse, T.: Biodiversity and ecology of freshwater ciliates. XXth International Congress of Zoology, Paris, 2008.

Weisse, T., Scheffel, U., Stadler, P.: Significance of pH as environmental factor limiting the distribution of freshwater protists. V European Congress of Protistology and XI European Conference on Ciliate Biology, St. Petersburg (Russia), 2007.

8.2 Editors and Editorial Board Members 2006-2008

Dokulil, M.: Editorial Board Member of *Algological Studies*, *Limnologica*, *Journal of Lake Science (China)*, *Aquatic Ecosystem Health and Management*;
Archiv für Hydrobiologie – Large Rivers, Editor

Hahn, M.W: *Applied and Environmental Microbiology*, Editorial Board Member

Humpesch, U.: *Archiv für Hydrobiologie – Large Rivers*, Editorial Board

Leichtfried, M.: - *International Revue of Hydrobiology*, Special Issues “River Bottom” and
“Plant Litter Processes in Freshwater” , Editorial Board

- *Annals of Tropical Research*, Editorial Board

-

Schmidt, R.: *Journal of Palaeolimnology*, Editorial Board Member

Weisse, T.: *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Associate Editor;

Journal of Plankton Research, Editorial Board;

Limnologica, Editorial Board

Protozoological Monographs, Associate Editor

8.3 Portraits of Working Groups

WG “Physiology and Molecular Ecology of secondary metabolite synthesis in algae” - Rainer Kurmayer (head), Guntram Christiansen; Technical assistance:

Johanna Schmidt, Josef Knoblechner; Graduate Students: William Okello, Veronika Ostermaier, Nadja Straubinger

Microorganisms are rich in their metabolic capacity and are of profound importance for the functioning of ecosystems. The production of secondary metabolites – defined as those that are not required for primary metabolism and growth – has been found to be particularly intriguing. The production of toxins by algae in fresh water and in marine water affects the ecosystem on all trophic levels. For the vast majority of secondary metabolites their function is unknown, and the understanding on their regulation in the ecosystem is poor. Consequently we lack the ability to predict conditions and thresholds for the occurrence of catastrophic changes, such as the occurrence of toxic algal blooms. Our research seeks to overcome fragmented research areas by combining different disciplines such as genetics, (bio)chemistry and molecular biology, evolutionary biology, and ecology. Research is performed on cyanobacteria that are (i) of quantitative importance in water, (ii) show high metabolic diversity in the production of toxins and other bioactive peptides, (iii) have been sequenced in total and information on peptide synthesis pathways is available (iv) are amenable to genetic manipulation. During the last years insights were obtained on the

- Significance of random drift for the innovation of metabolic pathways⁴
- Plasticity of secondary metabolite synthesis due to various recombination processes^{1,5}
- Diversification of secondary metabolite synthesis due to relaxation of selective constraints vs. purifying selection⁴
- Structural elucidation of non-ribosomal and ribosomal peptides including elucidation of their metabolic pathways^{2,6}
- Time scales in the evolutionary diversification of genotypes carrying major mutations in non-ribosomal metabolic pathways¹
- Identification of factors influencing the net synthesis rate of the toxic metabolite microcystin³
- Methodology to quantify toxic and non-toxic genotypes in water⁷

Key publications

¹**Christiansen G., Kurmayer R.,** Liu Q., Börner T. (2006) Transposons inactivate the biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. Applied and Environmental Microbiology 72: 117-123.

²**Christiansen G,** Molitor C, Philmus B, **Kurmayer R** (2008): Non-Toxic Strains of Cyanobacteria are the Result of Major Gene Deletion Events Induced by a Transposable Element. Molecular Biology and Evolution 25, 1695-1704.

³**Christiansen, G.,** Yoshida, W., Blom, J., Portmann, C., Gademann, K., Hemscheidt, T., **Kurmayer, R.** (in press) Isolation and Structure Determination of Two Microcystins and Sequence Comparison of The McyABC Adenylation Domains in *Planktothrix* species. Journal of Natural Products

- ⁴**Kurmayer R.**, Gumpenberger M. (2006) Diversity of microcystin genotypes among populations of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* and *Planktothrix agardhii*. Molecular Ecology 15: 3849-3861.
- ⁵**Kurmayer R., Christiansen G.**, Gumpenberger M., Fastner J. (2005) Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. SGM Microbiology 151: 1525-1533.
- ⁶Philmus, B, **Christiansen, G.**, Yoshida, W., Hemscheidt, T (in press) Posttranslational Modification in Microviridin Biosynthesis. Chembiochem
- ⁷Schober E., Werndl M., Laakso K., Korschineck I., Sivonen K., **Kurmayer R.** (2007) Interlaboratory comparison of Taq Nuclease Assays for the quantification of the toxic cyanobacteria *Microcystis* sp. Journal of Microbiological Methods 69: 122-128.

WG “Environmental Microbiology” - Martin W. Hahn (head), Jitka Jezberova, Jan Jezbera; Technical assistance: Ulrike Brandt; Graduate Students: Thomas Scheuerl, Sophia Schärfl

Knowledge on diversity and ecological function of freshwater bacteria is still superficial, which stands in strong contrast to their role in the metabolism of natural freshwater systems². The research of the working group ‘Environmental Microbiology’ is addressing basic questions regarding ecology, diversity, and biogeography of planktonic freshwater bacteria. Research on these topics is strongly hampered by the fact that the majority of the prokaryotic diversity on earth is still not represented by cultivated strains, and hence, is not taxonomically described. Thus, almost the whole recent prokaryotic diversity is represented by undescribed species. Even the described prokaryotic species represent taxonomic units, which are incomparable to species of eukaryotes (fundamentally differing species definitions). Furthermore, evaluation of many current hypotheses on diversity and biogeography of free-living bacteria (e.g. “everything (microbe) is everywhere”) requires detailed knowledge on their phylogenetic diversity (especially microdiversity, = intra-“specific” diversity) and the ecological diversification within evolutionary lineages.

Laying the foundations. Our solution for the above-mentioned basic problems is to focus on model taxa, for which we establish the required knowledge on taxonomy, genetic and ecological diversity, etc. We developed a method enabling the cultivation of (so far uncultured) bacterial strains representing abundant planktonic freshwater bacteria^{1,5}. Our model taxa are

- ***Polynucleobacter* spp. (*Betaproteobacteria*)** (major model group)
- Freshwater *Actinobacteria* (taxonomic description in process)
- *Haliscomenobacter* spp., *Candidatus Aquirestis* spp. (*Bacteroides*)

Especially for the taxon *Polynucleobacter*, we have established a large collection of cultured strains (> 300 strains) and characterized them genetically (SSU rRNA gene, 16S-23S ITS, glnA). A free-living and an endosymbiotic *Polynucleobacter* strain were genome-sequenced by the Joint Genome Institute, USA (proposed by Hahn et al.). Based on the revealed genetic diversity of *Polynucleobacter* spp., molecular tools for detection of species-like groups and for “intraspecific” subgroups were developed (FISH, RLBH, qPCR, etc.).

Microdiversity, ecology, and biogeography. We demonstrated inter-“specific” and intra-“specific” ecological differentiations (habitat preferences, thermal adaptation, mode of lifestyle) (e.g., Hahn & Pöckl, 2005; Vannini et al., 2007). We revealed an unexpected intra-“specific” ecological diversity of *P. necessarius* strains, which seems to result from an adaptive radiation.

Evolution of microdiversity. A future goal is the understanding of the evolution of microdiversity in the context of ecological differentiation. Genomes of free-living *P. necessarius* strains adapted to various habitat types shall be sequenced and analysed. What is the role of horizontal gene transfer?

Evolution of populations. Another future goal is the investigation of the evolution of *Polynucleobacter* populations³. What is the role of geneflow between populations for the development of structure and diversity of populations?

Cooperation, internal, Jens Boenigk, Gerold Winkler (IPGL); **international,** USA, Canada, Czech Republic, Italy, Spain, Sweden, Germany, China, Japan

Key publications

- ¹**Hahn, M.W.** (2003) Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5248-5254.
- ²**Hahn, M.W.** (2006) The microbial diversity of inland waters. *Current Opinion in Biotechnology* **17**:256-261.
- ³**Hahn, M.W.**, and M. Pöckl. (2005) Ecotypes of planktonic *Actinobacteria* with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:766–773.
- ⁴**Hahn, M.W.**, M. Pöckl, and Q.L. Wu. (2005) Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4539–4547.
- ⁵**Hahn, M.W.**, Stadler, P., Wu, Q.L. and Pöckl, M. (2004) The filtration–acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *Journal of Microbiological Methods.* **57**: 379-390
- ⁶Vannini, C., M. Pöckl, G. Petroni, Q.L. Wu, E. Lang, E. Stackebrandt, M. Schrällhammer, P.M. Richardson, and **M.W. Hahn.** (2007) Endosymbiosis *in statu nascendi*: Close phylogenetic relationship between obligately endosymbiotic and obligately free-living *Polynucleobacter* strains (*Betaproteobacteria*). *Environ. Microbiol.* **9**:347-359.

WG “Diversity and Ecology of Flagellates & Microalgae“ – Jens Boenigk (head),

Technical Assistance: Liselotte Eisl, Anneliese Wiedlroither; Graduate Students:

Barbara Findenig, Steffen Jost

The working group „Diversity and Ecology of Flagellates & Microalgae“ integrates different aspects of limnology and of molecular and organismic diversity research. This comprises specifically aspects of ecology, evolutionary biology, phylogeny, biogeography, and – increasingly – also aspects of population genetics. Up to recently, our research focus was the diversity and biogeography as well as the ecophysiological basis of the formation and maintenance of diversity – with a focus on interorganismic interactions, specifically on predator-prey interactions⁵. Our research interest generally focusses on conceptual aspects at the interface between ‘established’ disciplines – for instance between botany and zoology, between bio- and geosciences, or between aquatic and terrestrial ecology.

Assessing the diversity both, in a regional and in a global context. JB is currently integrated in several aquatic and terrestrial diversity projects. These currently include investigations within alpine gradients with a focus on lakes and their catchment areas as well as antropogenic land-use gradients within the Biodiversity Exploratories of the DFG. These regional studies are complemented by global studies with a focus on the tropical and subtropical Africa and Antarctica. Future studies will comprise population studies based on individual cells by means of competitive single cell PCR¹ and, second, by means of massive parallel sequencing of more than 100,000 sequences per sample (pyrosequencing, '454'-technology). These field studies are complemented by the isolation, cultivation, and characterisation of the target organisms³. Whereas the focus is currently on ribosomal genes, other gene loci such as COX1 as used in the barcoding initiatives will be in the focus of future seasonal and spatial screening approaches.

Formation and maintenance of diversity: Mechanisms of inter-specific interactions and evolutionary and functional differentiation. A further research focus is the functional and ecological differentiation between autotrophic microorganisms and colourless algal lineages as well as to the evolutionary scenarios yielding in such a differentiation⁴. The ecophysiological advantages and disadvantages of such a shift in 'strategy' are a basic component for assessing the evolutionary scenarios. My studies so far demonstrate a complex interplay between the basic mode of nutrition and selective predator-prey interactions. The ongoing research projects focus on ecophysiological experiments as well as on ultrastructural and phylogenetic analyses. Future issues comprise the analysis of genomic data and EST-libraries (sequencing scheduled for 2009 by DOE-JGI). A detailed analysis of the plastid genomes and the reduction of plastid genomes in different lines of protist will be a future issue.

Species concept, microevolution, history of biological theory. The observed variation between organisms affiliated with the same species was one main agent triggering the idea of evolution – a theory yielding in fundamental conflicts with the 'traditional' concept of species as always existing and unchanging units (based on the ideas of the greek philosophers, e.g. Aristotle). The judgement of morphospecies in the context of ecology and evolution and the search for suitable units below morphospecies level is a further aspect of our research². Our studies demonstrate the discrepancy between morphology and molecular phylogeny; but they also demonstrate the strenght of both approaches. In my future research, and with regard to conceptual research questions (species concept, biodiversity), I would like to focus on comparative analyses on different organisms, specifically between plants, animals, and microeukaryotes.

Based on the above research subjects there are several synergies and joint research projects with other working groups at the Institute. Current cooperations specifically comprise the working groups Hahn (Grazing on bacteria, ecology of small ponds) and Schmidt (Relating vegetative chryomonad taxa to stomatocysts).

Key publications

¹Auinger BM, Pfandl K, Boenigk J (2008) An improved methodology for the identification of protists and microalgae from Lugol-fixed plankton samples: Combining microscopical analysis with single cell PCR. *Appl Environ Microbiol* 74:2505-2510

²Boenigk J (2008) The past and present classification problem in nanoflagellates. *Protist* 159:319-337

³Boenigk J, Jost S, Stoeck T, Garstecki T (2007) Differential thermal adaptation of clonal strains of a protist morphospecies originating from different climatic zones. *Environ Microbiol* 9:593-602

⁴Boenigk J, Pfandl K, Hansen P (2006) Exploring strategies for nanoflagellates living in a 'wet desert'. *Aquat Microb Ecol* 44:71-83

⁵Montagnes DJS, Barbossa A, Boenigk J, Davidson K, Jürgens K, Macek M, Parry J, Roberts E, Šimek K (in press) Selective grazing behaviour of free-living protists: views on and avenues for continued study. *Aquat Microb Ecol*

WG “Quantitative Algal ecology“ – Martin Dokulil (head), Christina Kaiblinger

The three-years EC-Research Project **Climate and Lake Impacts in Europe (CLIME)** which followed and expanded the EC-project **Response of European Freshwater Lakes to Environmental and Climatic change (REFLECT)** terminated by the end of 2005 and most collaborators left the WG. In these projects we used long-term data from Austrian lakes to analyse impacts of climate change and to develop a suite of methods and models that can be used to manage lakes and catchments under future as well as current climatic conditions. The most up-to-date regional climate scenarios, and existing catchment and lake models were used to address issues that are central to the implementation of the Water Framework Directive. In this context, we deployed an automatic water quality monitoring systems on Mondsee. We recorded **increasing water temperatures at the lake surface as well as in the hypolimnion**^{3,5}. The trends were related to climate signals such as the North Atlantic Oscillation (NAO) indicating teleconnections between weather situations across the Atlantic and effects on Central European lakes. We also observed changes the timing and extent of thermal stratification, ice conditions and the composition, timing and growth of algae. We also studied processes which might become increasingly important such as increased productivity due to increased erosion and nutrient transport from the catchment (**Climate induced Eutrophication**)^{1,2}. Measurements were made using a novel in-situ technique, the Fast Repetition Rate Fluorometry (FRRF)⁴.

During a short-term project financed by the *Burgenländische Landesregierung* in 2007 we studied the **impact of physical forcing on photosynthetic rates in a highly turbid environment**. During the observations on Neusiedler See we used high resolution, high frequency techniques such as FRRF, delayed fluorescence (DF), light sensors and multi-probe sensors to get in-sight into short term changes in phytoplankton composition, biomass and related physiological processes. Results indicate a very rapid fine tuning of the photosynthetic rates following rapid changes turbidity, wave action and algal re-suspension from the bottom.

We continued our long-term investigation of the River Danube¹. Participation in the **2nd Joint Danube Survey (JDS)** organized and financed by the ICPDR, Vienna in August and September 2007 allowed the detailed analysis of the river plankton. During the seven-week research trip from Regensburg in Germany down to the Danube Delta we investigated phytoplankton composition, biomass and photosynthetic rates at over 100 sites. Results show shifts in the composition and a reduction in the quantity of the phytoplankton indicating an improvement in water quality. Rates of primary production calculated from FRRF measurements are highest in the middle section of the Danube between Budapest and downstream Novi Sad.

Key publications

- ¹**Dokulil, M.T.** (2006). Short and long term dynamics of nutrients, potamoplankton and primary productivity in an alpine river (Danube, Austria). *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 158/4 (Large Rivers 16), 473 – 493.
- ²**Dokulil, M.T.**, Donabaum, K. & Pall, K. (2006). Alternative stable states in floodplain ecosystems. *Ecohydrology & Hydrobiology* 6, 37-42.
- ³**Dokulil, M.T.**, Jagsch, A., George, G.D., Anneville, A., Jankowski, T., Wahl, B., Lenhart, B., Blenckner, T. & Teubner, K. (2006). Twenty years of spatially coherent deep-water warming in lakes across Europe related to the North Atlantic Oscillation. *Limnol. Oceanogr.* 51, 2787-2793.
- ⁴Kaiblinger, C., Greisberger, J., Teubner, K. & **Dokulil, M.T.** (2007). Photosynthetic efficiency as a function of thermal stratification and phytoplankton size structure in an oligotrophic alpine lake. *Hydrobiologia* 578, 29-36.
- ⁵Livingstone, D.M. & **Dokulil, M. T.** (2001). Eighty years of spatially coherent Austrian lake surface temperatures and their relationship to regional air temperatures and to the North Atlantic Oscillation. *Limnol. Oceanogr.* 46: 1220-1227.

WG "Diversity and Ecology of Ciliates & Picocyanobacteria" – Thomas Weisse

(head); Technical Assistance: Ulrike Scheffel & Peter Stadler; Graduate Student: Michael Moser

Within the initial phase of MRP 2001-2006, we studied the **Distribution, diversity, and population dynamics of autotrophic picoplankton (APP) in the lakes of the 'Salzkammergut' area** (FWF Project). We used flow cytometry and cell sorting in combination with molecular techniques to characterize the genetic and ecological diversity of picocyanobacteria in our deep lakes. We recorded a highly diverse and dynamic assemblage¹. Some of the new strains and clusters were found in the Salzkammergut lakes only, others were hitherto known from very different environments such as shallow Japanese lakes. We found significant differences in growth and grazing rates among genetically closely related strains, i.e. there was no close match between the genetic identity and ecophysiological performance of the isolates. The results of this study demonstrated that the biodiversity of aquatic microorganisms is considerably higher than previously recognized.

More recently, we studied the **Ecological significance of phenotypic and genotypic variability in freshwater protists**, using the oligotrich ciliate *Meseres corlissi* as model organism for rare species (FWF project, in collaboration with colleagues from Salzburg, Konstanz, and Guelph, Ontario). We combined molecular genetic, morphological and ecophysiological methods to investigate the extent of genetic and phenotypic variability among isolates of *M. corlissi* originating from different habitats on 4 continents. Our results demonstrated that a low variability (0-4 %) of the genes studied corresponded to a moderate morphological (5-15 %) and to a high ecophysiological (10-100 %) variability^{4,6}. One *Meseres* clone isolated from China differed significantly at all study levels from all other isolates, while other clones, even between geographically distant localities such as Austria and Australia, were virtually identical. These findings suggest a potentially wide dispersal of some clones within this species, but also a locally limited dispersal and the establishment of habitat-specific, local adaptations of other clones.

We continued to study the **temperature and pH sensitivity⁵ of small prostome ciliates** and used them as model microbes for evolutionary aspects³ and for assessing the **likely consequences of global climate change on microbial food webs²**.

The current FWF project on **Patterns and processes of adaptation and tolerance to low pH of freshwater plankton** (in collaboration with U. Gaedke & G. Weithoff, Potsdam, and T. Berendonk, Leipzig) investigates the causes of strongly reduced biodiversity in acid mining lakes. We aim to differentiate between genetically fixed, physiological adaptation to acidic conditions (at the species level) and site-specific traits in similar habitats resulting from historic events, i.e. small-scale genetic shifts below the species level (microevolution).

Key publications

¹Crosbie, N.D., Pöckl, M. & Weisse, T. (2003). Dispersal and phylogenetic diversity of non-marine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and cpcBA-intergenic spacer sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5716-5721.

²Montagnes, D.J.S., Morgan, G., Bissinger, J.E., Atkinson, D. & Weisse, T. (2008). Short-term temperature change may impact freshwater carbon flux: a microbial perspective. *Global Change Biology* 14: (in press).

³Weisse, T. (2008) Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective. *Biodivers. Conserv.* 17:243-259.

⁴Weisse, T., Scheffel, U., Stadler, P. & Foissner, W. (2007). Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. II. Response to pH. *Aquat. Microb. Ecol.* 47: 289-297.

⁵Weisse, T. & Stadler, P. (2006) Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution. *Limnol. Oceanogr.* 51: 1708-1715.

⁶Weisse, T., Strüder-Kypke, M., Berger, H. & Foissner, W. (2008). Genetic, morphological, and ecological diversity of spatially separated clones of *Meseres corlissi* Petz and Foissner, 1992 (Ciliophora, Spirotrichea). *J. Eukaryot. Microbiol.* 55: 257-270.

WG “Molecular & Cytogenetic Evolution of Asexual Aquatic Organisms” –

Dunja K Lamatsch (head); Technical assistance: Maria Pichler

The coexistence of sexual and asexual reproduction is one of the long-standing problems in evolutionary biology. Asexual organisms are expected to have short evolutionary persistence due to the absence of recombination resulting in low genetic variation. However, recent studies have found evidence that asexual lineages may occasionally engage in sexual processes. This may be a way of increasing their genetic variation and reducing their reproductive isolation from their sexual relatives. The evolutionary importance of these processes on species integrity and formation is still little understood.

I have been working with sperm-dependent teleost fishes (*Poecilia formosa*), as well as with non-marine ostracods (*Eucypris virens*) to investigate some of the major questions regarding the evolution and maintenance of sexual and asexual reproductive modes. I am embedded in an EU Research Training network and have fruitful collaborations with highly recognized researchers throughout Europe.

Consequences of paternal leakage in sperm-dependent parthenogenetic organisms

I have been modelling the consequences of Muller’s ratchet (accumulation of slightly deleterious mutations due to absence of recombination) for the sperm-dependent teleost fish *Poecilia formosa*. The results show that the Amazon molly should have gone to extinction within the time of its existence. Therefore, a genomic decay paradox exists for this species when using a simple model of Muller’s ratchet with realistic values. This means that some escape mechanisms have evolved, and we hypothesize that one form of occasional sex - “paternal leakage” - might be the reason for the longevity of the species.¹

Under the assumption that paternal leakage might be an escape mechanism for the parthenogens, I have been investigating whether triploid asexuals would show higher fitness than diploid asexuals in clonal competition experiments. The additional genetic material from the sexual host is expected to result in heterosis and/or gene redundancy. We found, however, that the opposite is true: diploids outcompete triploids under laboratory conditions².

Under natural conditions triploids are actually found in mixed schools with diploids. Therefore, we have to assume that there are environmental conditions that stabilize this co-existence of different ploidy levels. We are currently testing for possible microhabitat segregation among the different types of females (Lamatsch & Schlupp et al. in preparation).

My research has led to the invitation to write two book chapters. One chapter reviews current hypotheses on the prevalence of sex in the eukaryotic world and presents examples of putative ancient asexuals. We evaluate theoretical and practical concepts on how to demonstrate long-term asexuality³. The other chapter resumes the different asexual teleost complexes and discusses the evolutionary consequences of paternal leakage⁴.

From Sex to Asex: a case study on interactions between sexual and asexual reproduction

The freshwater ostracod, *Eucypris virens*, is the primary model species in the current SexAsex Research Training Network (ends November 2008). SexAsex projects have concentrated on the relationship between sexual and asexual lineages and, in the process, have developed valuable tools including microsatellites, allozyme and mtDNA markers, cDNA libraries and an EST collection. I am currently continuing my work on mutation accumulation, allelic divergence and homogenizing effects in this cryptic species complex to explore the inter-related problems of describing the diversity within such a taxon and of understanding the evolutionary origins and ecological forces maintaining this diversity. Four publications are currently in preparation.

Based on the above mentioned research subjects, within the Institute for Limnology joint research projects are envisioned with working group Stelzer (Experimental Evolutionary Ecology).

Key publications

¹ Loewe L & Lamatsch DK. (2008) Muller's ratchet may threaten the Amazon molly and other ancient asexuals, *BMC Evolutionary Biology*, 8:88-108

² Lamatsch DK, Fischer P, Geiger M, Lampert KP, Schlupp I, Scharl M (in press): Diploids Amazon mollies (*P. formosa*) show a higher fitness than triploids in clonal competition experiments, *Evolutionary Ecology*

³ Schön I, Lamatsch DK, Martens K (2008). Lessons to Learn from Ancient Asexuals. In: *Genome Dynamics & Stability 3* (eds. D. Lankenau, R. Egel), Springer Berlin/Heidelberg.

⁴ Lamatsch DK & Stöck M (accepted). Paternal leakage in unisexual fishes. In: *Lost sex!* (eds. I. Schön, K. Martens & P. Van Dijk, Springer Berlin/Heidelberg).

WG "Experimental Evolutionary Ecology" - C.P. Stelzer (head); Technical

Assistance: J. Schmidt (since March 2007), A. Wiedroither (since Sept. 2008)

The working group "Experimental Evolutionary Ecology" focuses on evolutionary changes within populations and their feedback on ecological processes. Our main model organism is the rotifer *Brachionus calyciflorus*, a widespread zooplankter that occurs in small ponds and reservoirs. Rotifers of the genus *Brachionus* are sometimes called the "metazoan microbes", since their growth rates are among the highest of all metazoans. In that respect, our model system bridges the gap between microbial and animal studies of ecology and evolution.

Currently there are two main avenues in our research: First, in the recently funded FWF-project P20735-B17 we have started to investigate the mechanisms and evolutionary consequences of transitions from cyclical to obligate parthenogenesis. Such transitions have high general relevance as they occur in many other cyclical parthenogens (e.g. *Daphnia*) and because they provide a valuable model system to investigate the "paradox of sex", one of the big unsolved problems in evolutionary biology. Second, we are developing and refining the "toolbox" for experimental evolution using *Brachionus*. Such efforts comprise the development of automated counting systems, experimental setups for long-term evolution, cryopreservation, and the development of molecular markers. Such tools will allow, for the first time, to experimentally study evolution in a metazoan and will therefore provide a valuable extension to the existing microbial model systems.

Evolution of obligate parthenogenesis. Monogonont rotifers normally reproduce by cyclical parthenogenesis. However, some clones of *Brachionus calyciflorus* have completely lost their ability to reproduce sexually. Our preliminary results suggest that this may be caused by a recessive allele. Such a "loss-of-function mutation" would be consistent with our recent findings on sexual communication in Monogononts^{1,2} and the physiological mechanism of obligate asexuality³. To understand how cyclical parthenogenetic populations may be buffered against invasions by obligate parthenogens, we have started to analyze the fitness and population consequences of both reproductive modes. So far, our results indicate that obligate parthenogens enjoy a consistent reproductive advantage and can also reach higher carrying capacities, which indicates superior competitive performance under resource limitation. In the near future, we will examine fitness of obligate vs. cyclical parthenogens under more natural conditions (e.g., field enclosures) and screen for obligate parthenogens in the field.

Toolbox for experimental evolution. Rotifers are among the few multicellular organisms that are suitable for experimental evolution. Our goal is to add further tools to this advantage. Recently we have developed an image analysis system, which automatically samples up to 12 laboratory populations, counts rotifers, and detects males (i.e. sexual reproduction). This system allows to track chemostat populations over long periods of time, as well as to keep laboratory populations at a constant density (similar to turbidostats in bacteria). Both culture systems, chemostats and turbidostats, have interesting properties since they provide opposed selection regimes: Chemostats select for the most efficient resource use, whereas turbidostats select for high maximum growth rates. In addition to these tools, we are currently

refining methods for rotifer cryopreservation and develop microsatellites for *B. calyciflorus* (in collaboration with Prof. C. Schlötterer, Vienna). We also participate in a collaboration to establish a genomic library of *B. calyciflorus* (together with J. Logsdon, University of Iowa and D.B. Mark Welch, MBL, Woods Hole).

Within the Institute of Limnology, joint research projects are envisioned with the working group Lamatsch (Molecular and cytogenetic evolution of asexual aquatic organisms).

Key publications

- ¹ **Stelzer**, C.P. & T.W. Snell (2006) Specificity of the crowding response in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Limnology and Oceanography* 51: 125-130.
- ² Timmermeyer, N. & C.P. **Stelzer** (2006) Chemical induction of mixis in the rotifer *Synchaeta tremula*. *Journal of Plankton Research* 28: 1233-1239.
- ³ **Stelzer**, C.P. (2008) Obligate asex in a rotifer and the role of sexual signals, *J. Evol. Biol.*, 21: 287-293.

WG “Palaeolimnology” - Roland Schmidt (head); Technical Assistance: Johann

Knoll; Graduate Student: Kerstin Huber

Long-term series play an important role in the present intensive debate about the impact of climate change (global warming) on aquatic and terrestrial ecosystems and for the establishment of future climate impact scenarios. The palaeolimnology, using lake archives, provides long-term series on different time scales and proxies such as indicator species of siliceous algae (diatoms, chrysophytes), populations and processes.

Developments and modern innovative approaches

Palaeolimnology has a long tradition in Austria, especially at our institute. In the past, lake developments with respect to climate, eutrophication, and meromixis, were the primary interest of our working group^{3,4}. With the development of quantitative inference models for climatic and environmental variables and the application of multidisciplinary (multi proxy) approaches, the focus has changed, influenced also by the increasing interest on processes related to modern climate change starting in the 1990s⁵. Today we learn that we can understand climate dynamics only when we split down at least to seasonal patterns¹. Hence, we have developed calibration tools for siliceous algae, which now allow us to reconstruct seasonal (autumn, spring) lake mixing dates and their “translation” into seasonal temperature anomalies². This innovative approach is of importance when we know that the North Atlantic Oscillation (NAO) is mainly a winter signal and when we hypothesize that climate change is also a matter of changing long-term circulation patterns. Highlights, for example, were the reconstruction of spring temperatures for Roman and High Medieval warming close to present and the decoupling of both during the climate deterioration of Little Ice Age (LIA). When we combined these seasonal temperature signals with other proxies such as geochemistry, mineralogy and pollen, this multi proxy approach enabled us recently to disentangle the complex interactions between climate, catchment processes, and human impacts on alpine lakes during the past 4000 years.

Where can we go, how can we proceed, and how we can interfere within the MFP?

Ten years ago we have collected a huge data set of biological, water chemical and temperature measurements from 45 lakes in the Central Austrian Alps, which is worth re-investigating with respect to all the questions that are related to climate warming/change. In the recent project CLIM-LAND we started a joint-venture program with colleagues from our institute to relate chrysophyte resting stages with species using molecular genetic techniques. Molecular genetics tools gain also on importance when we go into morphological details of diatoms, as we do at present for selected “problematic” taxa (morphotypes) from this alpine data set, and their possible splitting. In sum, we suggest that combining the palaeolimnological (time series) and taxonomical (classical and molecular) data with recent ecology (field and cultures), this interdisciplinary approach could be helpful to improve substantially the understanding of evolutionary processes.

Key publications

- ¹**Schmidt R.**, M. Roth, R. Tessadri, K. Weckström 2008. Disentangling late-Holocene climate and land use impacts on an Austrian alpine lake using seasonal temperature anomalies, ice-cover, sedimentology, and pollen tracers. *J. Paleolimnol.* 40: 453-469.
- ²**Schmidt R.**, C. Kamenik, M. Roth 2007. Siliceous algae-based seasonal temperature inference and indicator pollen tracking ca. 4,000 years of climate/land use dependency in the southern Austrian Alps.
- ³**Schmidt R.**, C. Kamenik, R. Tessadri, K.A. Koinig 2006. Climatic changes from 12,000 to 4,000 years ago in the Austrian Central Alps tracked by sedimentological and biological proxies of a lake sediment core. *J. Paleolimnol.* 35: 491-505.
- ⁴**Schmidt R.**, C. Kamenik, C. Kaiblinger, M. Hetzel 2004. Tracking Holocene environmental changes in an alpine lake sediment core: application of regional diatom calibration, geochemistry, and pollen. *J. Paleolimnol.* 32: 177-196.
- ⁵Psenner R., **R. Schmidt** 1992. Climate-driven pH control of remote alpine lakes and effects of acid deposition. *Nature* 356: 781-783.

WG "Ecology of Freshwater Fish" – Josef Wanzenböck (head); Technical Assistance: Maria Pichler & Karl Maier; Graduate Students: Barbara Pamminger-Lahnsteiner, Martin Finster, Patrick Schöttl,.

During the early phase of MRP 2001-2006 the focus of our research was on **Temporal dynamics of fish communities and species diversity in Austrian lakes**. Lake wide quantification of fish stocks was realized by adopting modern hydroacoustic methodology and combined with active and traditional, passive netting methods we characterized the fish communities and species diversities encountered in Austrian lakes. These studies addressed basic methodological aspects, i.e. repeatability of hydroacoustically derived estimates of fish density and biomass within and between different echosounding systems³, which recently are becoming important for the standardisation of hydroacoustic methods within Europe (CEN-standard). Furthermore our studies addressed temporal changes in fish communities, identifying anthropogenic impacts as the main reason for diversity changes during the last centuries⁶ which connects to reference conditions for the ecological status of Austrian lakes according to the European Union Water Framework Directive.

During the later phase of the MRP our research was broadened by including the **individual behavioural variability of larval and juvenile fish** and its relationship with predation threat and with impacts on zooplankton prey. Close cooperation with guest scientists (Anna Pasternak and Victor Mikheev, Moscow, Russia) enabled us to highlight the role of "personality", i.e. individual behavioural differences in foraging when faced with various cues of predation threat. We showed that indirect cues of predation threat (daylight conditions associated with elevated predation risk) can elicit a more "cautious" foraging behaviour compared to twilight conditions (associated with low predation risk⁴) and this can have similar effects on foraging behaviour compared to direct (olfactory and visual) cues of predation risk¹.

Our recent research activities focus on the **relationship between genetic and ecological variability in Austrian whitefish populations** (FWF project L229-B12). The cooperation project with Steven Weiss (University of Graz, Austria) analyses the enormous phenotypic and ecological sub-specific variability of whitefish (*Coregonus lavaretus*) populations seen in Austrian lakes (and world-wide) in relation to genetic diversification. An important aspect is the possible human interference with microevolution by stocking non-native fish from Baltic populations. The basis for this analysis was laid by developing specific microsatellite markers⁵ as well as mitochondrial DNA markers to reveal genetic structuring in relation to ecological niche partitioning of adult and larval stages of whitefish².

Key publications

- ¹Mikheev, V.N., **J. Wanzenböck** & A.F. Pasternak (2006): Effects of predator-induced visual and olfactory cues on 0+ perch (*Perca fluviatilis* L.) foraging behaviour. *Ecology of Freshwater Fish* 15:111-117.
- ²**Pamminger-Lahnsteiner, B.**, K. Winkler, S. Weiss & **J. Wanzenböck** (submitted to *Hydrobiologia*): Screening lineage specific mtDNA haplo-groups in the larvae of putatively native and introduced stocks of whitefish (*Coregonus* sp.) in two Austrian lakes.
- ³**Wanzenböck, J.**, Mehner, T., Schulz, M., Gassner, H., and Winfield, I.J. (2003) Quality assurance of hydroacoustic surveys: Repeatability of fish abundance and biomass estimates in lakes within and between hydroacoustic systems. - *ICES Journal of Marine Science* 60: 486-492.
- ⁴**Wanzenböck, J.**, V.N. Mikheev & A.F. Pasternak (2006): Modification of 0+ perch foraging behaviour by indirect cues of predation risk. *Ecology of Freshwater Fish* 15:118-124.
- ⁵Winkler, K. & S. Weiss (2008) Eighteen new tetranucleotide microsatellite DNA markers for *Coregonus lavaretus* cloned from an alpine lake population. *Molecular Ecology Resources* 8, 1055–1058.
- ⁶Zick, D., H. Gassner, P. Filzmoser, **J. Wanzenböck**, **B. Pamminger-Lahnsteiner**, & **G. Tischler** (2006): Changes in the fish species composition of all Austrian lakes >50 ha during the last 150 years. *Fisheries Management and Ecology* 13: 103-111.

WG “Stream Ecology” - Maria Leichtfried (head), Technical assistance: Anneliese Wiedroither, with cooperative partners from outside)

Coming to Mondsee from the Biological Station Lunz, which was focusing on lotic ecosystems for 25 years, I was and am interested to continue my work on stream ecosystems. Through my coordination of the “Stream & River Ecology” module within IPGL, the most important long-term project of the Institute for Limnology (see next section), I developed valuable scientific friendships and research cooperations that led to the project

IRESA (Initiative in River Ecology in Sri Lanka: from Science to Application)

The ecologically diverse island of Sri Lanka is drained by 103 river systems and has a multitude of man-made lakes, both ancient and recent. Although ecological research on reservoirs started early, rivers and streams have received less attention in ecological studies with no adequate investigations into functional relationship of the aquatic fauna and the dynamics of their environment. IRESA was designed as a cooperation between the University of Kelaniya (Sri Lanka), ILIM in Mondsee and the University of Innsbruck (Austria); we intend to develop a) the installation of river ecology at an international scientific level, b) a nucleus for follow-up research and education in river ecology, c) a network between scientists and end-users involved in freshwater affairs, and d) awareness of endangering and conservation of natural resources in freshwater policies. In a pilot study we investigated the structure and function of two river ecosystems, including several trophic levels like organic matter food base, macroinvertebrates and fish, as well as the decomposition processes^{1,2,4,5}. The various trophic interactions will be explained in relation to catchment properties (land use, catchment and riparian vegetation), environmental dynamics and human impacts. As all the project activities involve the Sri Lankan scientific and social environment this initiative furthers public awareness on these precious tropical river systems. The project will be finished this year. Beside scientific publications, a TV film will be produced in Sri Lanka and made available to all local schools and educational institutions. We want to continue our research on tropical streams^{2,4}, where most of the basic research is still to be done.

Freshwater Fungi

Investigations on leaf litter decomposition processes in streams showed the generally high importance of biofilms and of aquatic hyphomycetes, in particular. In order to learn more about freshwater fungi, I want to apply, together with my expert colleague and teacher of the TU Berlin, for a project on “Freshwater fungi and interactions with bacteria in aquatic decomposition processes”. Nearly nothing has been done in this area in tropical countries.

Climate Change – Biodiversity Change – Genetic Change?

Long-term insect emergence and its relevancy to climatic change, insect populations or biodiversity changes questions is the matter of this planned project. A treasure of a long-term (25 years) series of insect emergence samples is stored in Austria and well maintained, but has not yet been analysed. It provides a unique basis to explore insect populations in relation to global warming, genetic changes and biodiversity in stream ecosystems. As an active member in the managing committee of the “Long-term Ecological Research Association”, I want to initiate a cooperation project within this framework in near future.

Key publications

¹Fleituch, T., **Leichtfried, M.** (2007) Electron Transport System (ETS) Activity in Alder Leaf Litter in Two Contrasting Headwater Streams. - *Internat. Rev. Hydrobiol.* 92 (4 - 5): 378 - 391

²**Leichtfried, M.** (2007) The Energy Basis of the Consumer Community in Streams Yesterday, Today and Tomorrow.... - *Internat. Rev. Hydrobiol.* 92 (4-5): 363 - 377

³Statzner, B., Mèrigoux, S., **Leichtfried, M.**, 2005: Mineral grains in caddisfly pupal cases and streambed sediments: Resource use and its limitation through conflicting resource requirements. - *Limnol. Oceanogr.* 50 (2): 713 - 721

⁴Weliange, W.S., **Leichtfried, M.**, Amarasinghe, U.S., Füreder, L. (in press) Structure and function of benthic invertebrates in two contrasting tropical streams in Sri Lanka. - *Aquatic Ecology*

⁵Weliange, W.S., Pogosa, J., Lankaadikara, C., **Leichtfried, M.**, Göltenboth, F. (2007) Guide to fresh water fishes in Tubod River, Lake Danao and Inawasan River in Leyte, Philippines. – Ann. Trop. Res. 29 (2): 1-27

⁶Weliange, W.S., Vijverberg J., Amarasinghe, U.S., **Leichtfried, M.**, Füreder, L. (in press) Potential effects of discharge in food web properties and trophic interactions in two Sri Lankan streams. – Hydrobiologia

IPGL-Office – Gerold Winkler (head), Regina Brandstätter

IPGL – (International Post-Graduate Training Programmes in Limnology) aims to strengthen scientific capacity of developing countries to support local in-house expertise on the conservation and sustainable management of inland aquatic ecosystems. Capacity building measures are implemented via a multi-level approach, from individual to institutional and international networking level. Support of research institutions in developing countries is done in terms of human resource development, improved research facilities and strengthened international networking, which will enable institutions in developing countries to develop and implement solutions adapted to local situations. IPGL concentrates on the Eastern African region to gear activities to local conditions and to maximize impact efficiency. More than 500 young scientists from developing countries have attended IPGL-training programmes. Training and research activities within IPGL-programmes include both fundamental and applied science, whereby the following subjects are prioritised:

- Biodiversity, Conservation Biology and Evolution Ecology,
- Fish Ecology and Aquaculture,
- Water Quality, Risk Assessment and Aquatic Resource Management.

An international network in freshwater ecology and freshwater ecosystem management has been established within the last 30 years. The global network is based upon the exchange of scientists, collaboration in M.Sc. and Ph.D. training programmes, joint organisation of workshops and conferences and joint research and development projects. A formalized network has been founded in 2003 (EAWA - Eastern African Water Association), which is interlinking 186 association members from research, management, private, NGO and policy-making sectors.

The European Union funded research project “BOMOSA” has been initiated by IPGL-M.Sc. research projects and is developing aquaculture techniques to utilize small water-bodies for sustainable fish production in Eastern Africa.

IPGL Milestones 2006-2008

- 91 young scientists have attended IPGL training programmes from 2006 to 2008.
- 13 M.Sc. theses have been co-supervised by Austrian/African scientists and organized by IPGL.
- The joint M.Sc. programme with UNESCO-IHE has been restructured and accredited in The Netherlands.
- The 3-weeks course module “Tropical Limnology” has been established at Egerton University, Kenya.
- Projects:
 - IPGL 2005-2007: OEZA-Project via Austrian Development Agency (ADA): International Post-Graduate Training Programmes in Limnology (Project duration 01.01.2005 – 31.03.2008; € 985,433.-).

- BOMOSA: EU-Project, FP-6, INCO-Dev, STREP: Integrating BOMOSA cage fish farming system in reservoirs, ponds and temporary water bodies in Eastern Africa (Project duration 01.10.2006 - 30.09.2009; € 1,499,998.-).
- Mombasa Workshop: OEZA-Project via Austrian Development Agency (ADA) and African Water Facility (AWF): “Mombasa Workshop – Bridging Research, Technology & Development - Sustainable Water Resource Management in Eastern Africa” (Project duration 01.08.2006 – 30.06.2008; € 160,000.-).
- IPGL 2008-2009: OEZA-Project via Austrian Development Agency (ADA): International Post-Graduate Training Programmes in Limnology (Project duration 01.04.2008 – 30.09.2009; € 699,700.-).
- Two trans-disciplinary conferences with 270 participants from 16 countries have been organized in Kenya with the goal of enhancing the impact of research and technology towards sustainable management of aquatic ecosystem resources in Eastern Africa (Conference titles: “Bridging research, technology & development: sustainable water resource management in Eastern Africa; “Bridging research, technology & development: initiating an interactive stakeholders’ partnership for sustainable water resource development”).

Core funding of IPGL is provided by the Austrian Development Cooperation for more than 30 years via 2 to 3-years project contracts. Specific project activities are funded by international agencies. The IPGL-Office is situated at the Institute for Limnology due to historical reasons (Prof. H. Löffler was both founder of the Institute for Limnology and IPGL). The competitive advantage of integrating IPGL into the Academy of Sciences is the autonomy to integrate various research institutions and universities into IPGL activities, whereas Austrian Universities would emphasize on its own staff-members, which may limit inter-institutional involvement in training and research.

Key publications (*IPGL students underlined and personnel of the Institute of Limnology in bold letters)

- Ajith Kumara P.A.D., Amarasinghe S.U., Schiemer F., **Winkler G.**, & M. Schabuss (in press): Distribution and abundance of unexploited fish species in three Sri Lankan reservoirs, Asian Fishery Science.
- Christiansen, G., Kurmayer, R., Liu, Q.** & T. Börner (2006). Transposons inactivate the biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix spp.* Appl. Environ. Microbiol. 72: 117-123.
- Liti D.M., Fulanda B., Munguti J.M., Straif M., Waidbacher H. & **G. Winkler** (2005). Effects of open-pond density and caged biomass of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on growth, feed utilization, economic returns and water quality in fertilized ponds, Aquaculture Research 36, 15, 1535-1543.
- Liti D., Munguti J., Kreuzinger N. & H. Kummer (2005). Effects of sodium chloride on water quality and growth of *Oreochromis niloticus* in earthen ponds, African Journal of Ecology 43, 3, 170-176.
- Schauer, M., J. Jing, & M.W. Hahn.** (2006). Recurrent seasonal variations in abundance and composition of filamentous SOL cluster bacteria (Saprospiraceae, Bacteroidetes) in oligomesotrophic Lake Mondsee (Austria). Appl. Environ. Microbiol. 72: 4704-4712.
- Sekadende B., Lyimo T. & R. Kurmayer (2005). Microcystin production in the Mwanza Gulf (Lake Victoria, Tanzania), Hydrobiologia 543, 299-304.
- Waidbacher, H., Liti, M.D., Fungomeli, M., Mbaluka, K.R., Munguti, M.J., M. Straif (2006). Influence of pond fertilization and feeding rate on growth performance, economic returns and water quality in a small-scale cage-cum-pond integrated system for production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture Research 37: 594-600.
- Winkler, G.** (2006). Sustainability as added-value of integrated capacity enhancement programmes for approaching MDG's: IPGL - freshwater ecosystem research & management in developing countries. Artikel in „Conference proceedings – A Critical Look at the Role of Research in Achieving the MDGs“, Editor B. Habermann, Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, ISBN 13: 978-3-7001-3770-2; http://www.oeaw.ac.at/kef/millennium_dev_goals.htm.

8.4 Collected Reprints

The following publications in alphabetical order are provided for somebody interested in specific aspects of our research. Please note that some recent publications are not available as pdf files or cannot be copied due to copyright restrictions. In some cases, you will find links to download the most recent papers from the Institute's homepage (<http://www.oeaw.ac.at/limno/publications.htm>).

8.4 Collected Reprints

The following publications in alphabetical order are provided for somebody interested in specific aspects of our research. Please note that some recent publications are not available as pdf files or cannot be copied due to copyright restrictions. In some cases, you will find links to download the most recent papers from the Institute's homepage (<http://www.oeaw.ac.at/limno/publications.htm>).

Improved Methodology for Identification of Protists and Microalgae from Plankton Samples Preserved in Lugol's Iodine Solution: Combining Microscopic Analysis with Single-Cell PCR^{∇†}

Barbara M. Auinger, Karin Pfandl, and Jens Boenigk*

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria

Received 3 August 2007/Accepted 13 February 2008

Here we introduce a method for quantitative analysis of planktonic protists and microalgae from preserved field samples combining morphological and small-subunit (SSU) rRNA gene sequence analysis. We linked a microscopic screening with PCR of single cells using field samples preserved with Lugol's iodine solution. Cells possessing a rigid cell wall were incubated with Viscozyme and subsequently with proteinase K for cell disruption; this was unnecessary for fragile cells. The addition of sodium thiosulfate to the PCR tube considerably decreased the inhibiting effect of the fixative (iodine) on the PCR and thus allowed for successful single-cell PCR even of long DNA fragments (up to as many as 3,000 base pairs). We further applied the protocol to investigate the dominant SSU rRNA genotypes in distinct flagellate morphospecies originating from different samples. We hypothesized that despite the morphological similarity, protist morphospecies in different habitats or sampled during different seasons are represented by different genotypes. Our results indicate species-specific differences: the two species *Ochromonas* sp. and *Dinobryon divergens* were represented by several different genotypes each, and for the latter species, the dominating genotype differed with habitat. In contrast, *Dinobryon pediforme*, *Dinobryon bavaricum*, and *Synura sphagnicola* were exclusively represented by a single genotype each, and the respective genotype was the same in different samples. In summary, our results highlight the significance of molecular variation within protist morphospecies.

Linking a specific protist or microalgal small-subunit (SSU) rRNA gene sequence from environmental surveys to a specific morphotype is often problematic. Molecular surveys do not usually provide any information on the morphology of the organism (see references 19, 25, and 27 but compare with reference 10), whereas morphological surveys concentrate on preserved samples, which are usually not considered for molecular analyses (7). One main way to overcome these problems is to link sequence analysis with morphological investigations from preserved plankton samples on a per cell basis.

Successful sequence analysis has already been demonstrated for preserved specimens, but it has various shortcomings. Most methods either require relatively large amounts of template DNA (i.e., cultured material, preserved tissues, or environmental DNA collected on filters or by centrifugation [18]) or amplification is limited to short fragments or both (2, 4, 6). It is therefore no coincidence that attempts to analyze the DNA sequence from preserved microplankton samples focused mainly on alveolate taxa, i.e., organisms presumably with a high copy number of the SSU rRNA gene (dinoflagellates [5, 11, 13, 29]; ciliates [9]). Still, despite the presumably high gene copy number in the alveolates investigated so far, success with field samples is usually low.

Among the most common fixatives for microalgae and pro-

toists are formaldehyde and Lugol's iodine solution (12, 20, 32). Formaldehyde-preserved samples are generally problematic for molecular analyses, as formaldehyde may cause severe cell loss (e.g., reference 20 and references therein). Formaldehyde may further reduce the PCR efficiency in a storage time-dependent manner (17) and can alter the DNA structure and may thus cause sequencing errors, specifically C-T and G-A mutations during PCR (8, 26).

Lugol's iodine solution seems less problematic with respect to sequence analysis but still seems to require at least a 10-fold-higher cell concentration in the PCR compared to unpreserved PCR (5, 13, 30; see reference 6 for successful amplification of short fragments of around 200 base pairs).

We propose an optimized protocol combining microscopic screening with direct PCR of single protist and microalgal cells using field samples preserved with Lugol's iodine solution. We also successfully applied the protocol to investigate the dominant SSU rRNA genotypes in distinct flagellate taxa affiliated with the same morphospecies but originating from different samples. We hypothesized that despite the morphological similarity, protist morphospecies in different habitats or sampled during different seasons would be dominated by different genotypes.

MATERIALS AND METHODS

Media and stock solutions. The following media, stock solutions, and chemicals were used in our study. NSY-IB medium is an inorganic basal medium for the maintenance of cultured strains. It contains the following substances: 75 mg of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ liter⁻¹, 1.43 mg of $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ liter⁻¹, 16 mg of $NaHCO_3$ liter⁻¹, 5 mg of KCl liter⁻¹, 2.8 mg of K_2HPO_4 liter⁻¹, 4.4 mg of Na_2EDTA liter⁻¹, 3.2 mg of $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ liter⁻¹, 1.0 mg of H_3BO_3 liter⁻¹, 0.2 mg of $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ liter⁻¹, 0.02 mg of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ liter⁻¹, 0.01 mg of $CuSO_4 \cdot 6H_2O$ liter⁻¹, 0.01 mg of $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ liter⁻¹, 0.006 mg of $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ liter⁻¹, 0.1 mg of $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ liter⁻¹ (15); thiosulfate stock solution (62 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ liter⁻¹);

* Corresponding author. Mailing address: Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria. Phone: 436232312545. Fax: 4362323578. E-mail: jens.boenigk@oew.ac.at.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 22 February 2008.

TABLE 1. PCR yield with different concentrations of Lugol's iodine solution and sodium thiosulfate in the PCR mix

Lugol's iodine solution concn (μl of stock solution ml^{-1})	PCR efficiency with the following sodium thiosulfate concn ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^a :					
	0	39	195	390	975	1,950
0	44.8 (100)	47.3 (105.6)	45.1 (100.9)	45.4 (101.5)	16.8 (37.6)	2.3 (5.2)
0.088	1.5 (3.3)	44.8 (100)	32.4 (72.4)	33 (73.7)	27.7 (61.8)	1.5 (3.4)
0.44	0 (0)	41.6 (92.9)	26.1 (58.3)	37.2 (83.2)	24.1 (53.9)	1.4 (3.1)
0.88	0.2 (0.5)	1.5 (3.3)	42.8 (95.6)	31.2 (69.6)	20 (44.7)	0.7 (1.5)
2.64	0.1 (0.1)	1.8 (4.1)	37.1 (82.8)	26 (58.1)	15.3 (34.3)	1.6 (3.6)
5.28	0.5 (1.1)	1.1 (2.5)	1.3 (2.8)	33.6 (75.1)	21 (47)	0.9 (2)
7.92	0.6 (1.3)	0.1 (0.3)	0.3 (0.6)	0.6 (1.4)	14.8 (33)	0.8 (1.8)
13.2	0.7 (1.5)	1.8 (3.9)	0.4 (0.8)	2.7 (6.1)	0.7 (1.6)	0.7 (1.5)

^a The efficiency or yield of the PCR is shown as the amount of PCR product (ng of DNA μl^{-1}) based on a constant amount of template DNA. The relative efficiency, i.e., the relative amount of DNA gained during PCR as a percentage of total DNA gained without the addition of the respective chemicals, is given in parentheses.

thiosulfate working solution (50 μl of thiosulfate stock solution added to 1 ml of NSY-IB medium); Lugol's iodine stock solution (100 g KI liter⁻¹ and 50 g I₂ liter⁻¹); Lugol's iodine working solution (2 ml of Lugol's iodine stock solution added to 98 ml of filtered NSY-IB medium (using 0.2- μm syringe filters).

Overcoming PCR inhibition caused by Lugol's iodine solution. We tested the concentration-dependent inhibition of the PCR by Lugol's iodine solution and the effect of thiosulfate. Thiosulfate is commonly used to remove the dark stain from organisms preserved with Lugol's iodine solution for better identification of inner cell structures (21, 24, 31). We suspect that molecular iodine embedded in DNA is (partly) removed as the thiosulfate reduces the molecular iodine. We expected, therefore, that the fixation-related inhibition of the PCR would be partly neutralized.

(i) **General setup.** Two axenic strains of chrysoomonad flagellates were used as test organisms during the development of the method: *Poteroiochromonas malhamensis* strain DS and *Spumella* sp. strain JBC07 (3). The flagellates were kept in axenic cultures. For the experiments, they were transferred to inorganic NSY-IB medium and fed with the bacterial strain *Listonella pelagia* CB5 (cf. reference 3). If not stated otherwise, 10 μl of dense flagellate cultures (corresponding to 100 to 200 cells) was used as the template for PCR without prior extraction of DNA.

In the first experiment, we tested for the effect of Lugol's iodine solution on the PCR at different thiosulfate concentrations: we investigated the effects of all combinations of 0, 0.09, 0.44, 0.88, 2.6, 5.3, 7.9, and 13.2 μl Lugol's iodine stock solution (corresponding to 0, 4.5, 22, 44, 130, 265, 395, and 660 $\mu\text{g I}_2 \text{ ml}^{-1}$, respectively) and 0, 39, 195, 390, 975, and 1,950 μg sodium thiosulfate ml^{-1} on the PCR.

In a second experiment, the final concentrations of iodine in the PCR mix ranged from 0.0009 to 13.2 μl Lugol's iodine stock solution ml^{-1} (corresponding to 0.045 and 660 $\mu\text{g I}_2 \text{ ml}^{-1}$, respectively); experiments were run in the absence and presence of 390 $\mu\text{g Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ ml}^{-1}$ (corresponding to the recommended concentration [see "Recommended protocol" below]). In addition, control treatments without fixative were tested.

(ii) **DNA amplification and sequence handling.** Flagellate 18S rRNA was amplified with the following broad eukaryotic SSU rRNA targeting primers: the forward primer EK82f (5'-GAAACTGCGAATGGCTC-3') and the reverse primer Proto5r (5'-GACGGCGGTGTGTAC-3').

Each PCR mixture contained 1.25 U of *Taq* polymerase (Qiagen), 5 μl of 10 \times PCR buffer, 200 nM of each primer, 200 μM of each deoxynucleoside triphosphate, 21.75 μl of water, and 20 μl of liquid containing the template DNA. The water for the PCR was distilled, then filtered using a 0.2- μm syringe filter, and finally autoclaved. Reactions were carried out in an Eppendorf Mastercycler gradient starting with a denaturation step of 3 min at 94°C, followed by 35 cycles, with 1 cycle consisting of denaturation (94°C for 1 min), annealing (52°C for 1 min), elongation (72°C for 2 min), and a final extension step of 5 min at 72°C. PCR products were checked on an agarose gel.

The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen), following the instructions of the supplier. Subsequently, the products were quantified (Spectrophotometer Nano Drop ND-1000; program ND-1000 V3.3.0) and commercially sequenced (SMB, Berlin, Germany). The sequences were processed as previously described in reference 3, using the program BioEdit 5.0.9. The SSU rRNA gene sequences have been deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (for accession numbers, see Table 2 and see Table S1 in the supplemental material). Sequences were submitted to the BLAST search program at the NCBI.

Application to field samples. (i) **Dealing with free DNA in plankton samples.** Preserved plankton samples often contain dissolved DNA due to disintegration of (some) cells during net sampling and sample processing (later on referred to

as free DNA). We tested several protocols to prevent amplification of such free DNA in the PCR, specifically washing the whole plankton sample, washing individual cells, and combinations of these two approaches. For description of the washing steps, see "Recommended protocol" below. After each washing step, 10 μl of the fluid was taken and handled as described for the single cell up to the seminested PCR.

(ii) **Quantitative analysis and applicability to different taxonomic groups.** An optimized protocol (see "Recommended protocol" in the Results and Discussion) was applied to organisms affiliated with different taxonomic groups in order to test for broad applicability of the proposed method. The main focus was on the Chrysophyceae and Synurophyceae (both stramenopiles) and the Dinzoa and Ciliophora (both alveolates) following the higher-level classification of Adl and coworkers (1). Field samples were taken from ponds and lakes in the Salzkammergut area in Austria, specifically from the ponds Loibersbacher Teich 1 and Loibersbacher Teich 2 and from the lakes Fuschlsee and Wallersee. Plankton samples were preserved with Lugol's iodine solution (20 μl Lugol's iodine stock solution ml^{-1}) and stored at 4°C in the dark until further processing.

Primers and PCR protocols were chosen based on the morphological analysis of video recordings taken before picking the cells. In general, we used the primers and PCR conditions as stated above (see "DNA amplification and sequence handling"). For organisms that are not targeted by broad eukaryotic primers, a preliminary test was included, i.e., several cells were picked, and different primers and PCR protocols were tested until suitable protocols for all target organisms were discovered. In all cases, an additional negative control was taken from the remaining 400- μl drop after the last washing step and tested to check for contamination by free DNA. If there was too little PCR product for sequencing, a subsequent seminested PCR was conducted using 1 μl of the initial PCR product and appropriate primers, i.e., usually the forward primer Sogin 2f (5'-AGGGTTCGATTCCGGAG-3') and the reverse primer Proto5r.

(iii) **SSU rRNA genotype distribution within and among samples.** We further applied the proposed method to investigate the dominant SSU rRNA genotype within distinct microalgal morphospecies. We compared the genotype composition in samples originating from different locations and/or seasons (see Table 2). Specifically, we selected the chrysophyte taxa *Dinobryon divergens* and *Dinobryon pediforme* for spatial comparisons and *D. pediforme*, *Dinobryon bavaricum*, *Synura sphagnicola*, and *Ochromonas* sp. for seasonal analysis. For each of these species, we analyzed at least three individuals per sample (if present). This was done in order to determine the dominant genotype of the respective morphospecies.

RESULTS AND DISCUSSION

Overcoming PCR inhibition caused by Lugol's iodine solution. Successful single-cell PCR from preserved plankton samples has been demonstrated for cultured strains using ethanol or methanol fixation (18), formalin or methanol fixation (13), osmium tetroxide fixation (29), and Lugol's iodine solution (14). All these methods are generally problematic for low concentrations of template DNA. The above studies therefore focused on alveolate taxa (dinoflagellates and ciliates), i.e., on taxa that presumably have a relatively high copy number of the SSU rRNA gene.

Accordingly, in our experiments, Lugol's iodine solution inhibited the PCR already at levels corresponding to less than 0.1

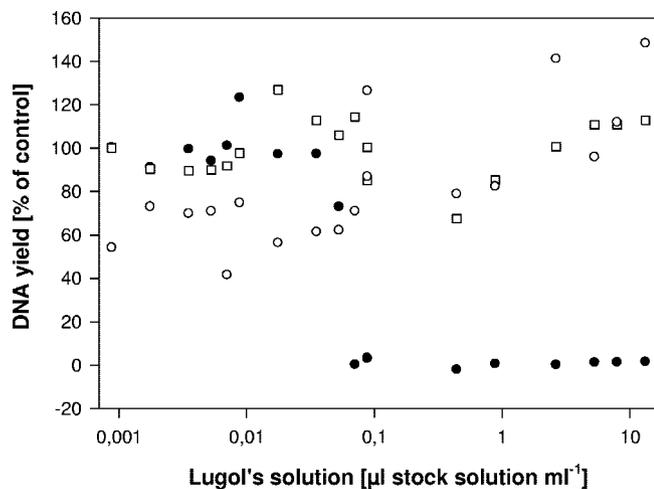


FIG. 1. Inhibition of the PCR by Lugol's iodine solution. The PCR yield is expressed as a percentage of the control treatment (DNA yield of the control without Lugol's iodine solution, 100%). The black circles indicate the PCR yield in the absence of thiosulfate, and the white symbols indicate the PCR yield in the presence of thiosulfate. Cultures of *Poterioochromonas* (circles) and *Spumella* (squares) were used as template in these experiments.

µl stock solution ml⁻¹ (Table 1). Simple dilution, i.e., repeated washing in sterile media did not solve this problem for two reasons. First, the preserved cells still did not allow for successful PCR unless high concentrations of template DNA were used (i.e., many cells per PCR), and second, particularly fragile cells tended to burst in medium free of Lugol's iodine solution (data not shown).

To solve this problem, we applied an alternative approach. By adding thiosulfate to the PCR master mix, the iodine fixation was (partly) reversed, allowing for successful PCR in the presence of much higher concentrations of Lugol's iodine solution (Table 1). A final concentration of 390 µg Na₂S₂O₃ ml⁻¹ in the PCR mix counterbalanced iodine concentrations of more than 600 µg I₂ ml⁻¹ (i.e., covering the usual range of iodine concentrations in preserved samples; Fig. 1). We did not observe any fixation artifacts during PCR, i.e., the SSU rRNA gene sequence using single cells of the flagellate strain JBC07 was identical for preserved and unpreserved cells and identical to the published sequence of that strain (GenBank accession number EF577165). The method was suitable for neutral, acidic, and alkaline Lugol's solution (data not shown).

Recommended protocol. Prior to the analysis, the plankton samples preserved with Lugol's iodine solution were washed as follows (Fig. 2). First, we washed the whole sample, i.e., 100-ml portions of the preserved samples were transferred to fresh flasks, and the cells were allowed to settle. Subsequently, the liquid was gently removed with a pipette, leaving roughly 5 ml of residual material (0.5 cm of the water column at the bottom). Afterwards, 95 ml of the washing solution was added, and the sample was mixed. This procedure was repeated a second time.

Afterwards, we washed individual target cells. One milliliter of the preserved sample was transferred to a cover slide and inspected for target cells at a total magnification of ×200 (Zeiss Axiovert 200). Target cells were then checked at a magnification of ×400 or ×630, and digital recordings were

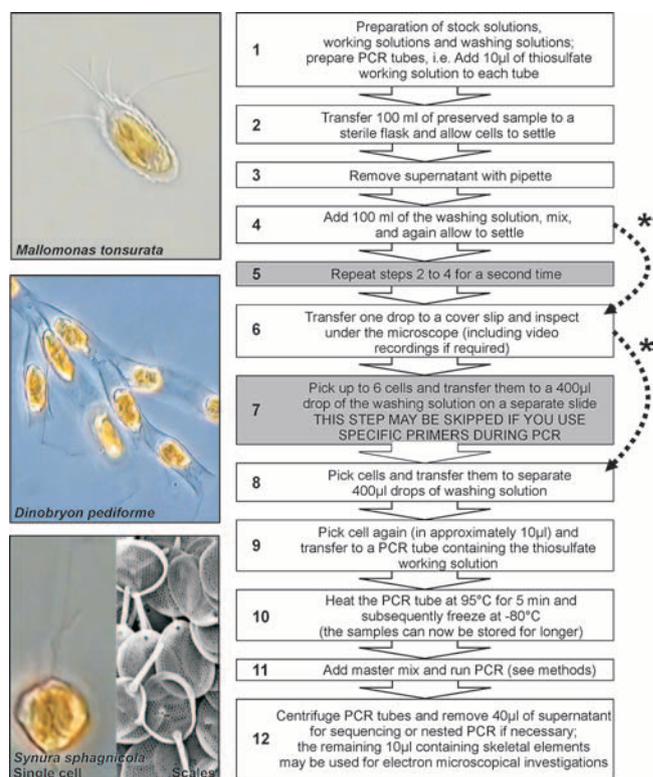


FIG. 2. Proposed protocol. The essential steps of the protocol are depicted with a white background, those with a gray background may be skipped depending on the level of contamination/cell concentrations in the original sample and the specificity of the primers used during PCR (indicated by the dotted arrows marked with an asterisk). For an explanation, see the text. Examples of the morphological analysis are shown on the left for three species. For *Synura sphagnicola*, a scanning electron microscopy image of the scales, which can be extracted from the PCR tubes after running the PCR, is also shown.

made for later morphological analysis (Panasonic KR222E with Dazzle Video Creator 150; program Pinnacle Studio Version 9.4.3.). After inspection and video recording, the single cells were picked at ×200 magnification with a glass pipette, and up to six cells (corresponding to 5 to 50 µl) were transferred to a 400-µl drop of Lugol's iodine working solution on a separate slide. These cells were picked again and separately transferred to one drop (400 µl) of Lugol's iodine working solution each. From this final drop, the cells were picked again and (in a drop of approximately 10 µl) transferred to a 200-µl PCR tube already containing 10 µl of the thiosulfate working solution (corresponding to 390 µg Na₂S₂O₃ ml⁻¹). For a negative control for free DNA, 10 µl of the remaining fluid was transferred to a second PCR tube and processed the same way. The PCR tubes were subsequently heated at 95°C for 5 min in an Eppendorf Mastercycler gradient and immediately afterwards shock frozen at -80°C in order to break cells and to denature proteins (Fig. 2).

Organisms possessing a rigid cell wall (e.g., dinoflagellates, cryptophytes, and diatoms) were treated in a slightly different way in order to break the cell wall. For the last washing step of the individual cells, we used NSY-IB medium instead of Lugol's iodine working solution. After the cells were picked,

TABLE 2. Genotypes of individual cells affiliated with selected morphospecies originating from different habitats or seasons^a

Species and strain	Genotype ^b	GenBank accession no.	Lake	Sampling date (day.mo.yr)	Abundance (no. of cells ml ⁻¹)
<i>Dinobryon bavaricum</i>					
FU28-11	Bavaricum 1	EU024971	Fuschlsee	10.07.06	1.7
FU28-13	Bavaricum 1	EU024972			
FU28-14	Bavaricum 1	EU024973			
FU44-4	Bavaricum 1	EU024979	Fuschlsee	30.10.06	5.9
FU44-14	Bavaricum 1	EU024982			
FU44-61	Bavaricum 1	EU076735			
<i>Dinobryon divergens</i>					
FU28-24	Divergens 1	EU024976	Fuschlsee	10.07.06	9.3
FU28-25	Divergens 1	EU024977			
FU28-27	Divergens 1	EU024978			
WA28-6	Divergens 2	EU025019	Wallersee	10.07.06	240
WA28-7	Divergens 3	EU076736			
WA28-8	Divergens 4	EU025020			
WA28-34	Divergens 4	EU076737			
WA28-35	Divergens 4	EU076738			
WA28-37	Divergens 4	EU076739			
<i>Dinobryon pediforme</i>					
LO128-14	Pediforme 1	EU005402	Loibersbacher Teich 1	10.07.06	3,650
LO128-16	Pediforme 1	EU024992			
LO128-17	Pediforme 1	EU024993			
LO134-9 ^c	Pediforme 1	EU024998	Loibersbacher Teich 1	21.08.06	820
LO134-19	Pediforme 1	EU025000			
LO134-20	Pediforme 1	EU025001			
LO228-51	Pediforme 1	EU025007	Loibersbacher Teich 2	10.07.06	27
LO228-76 ^c	Pediforme 1	EU025008			
LO228-77	Pediforme 1	EU025009			
LO234-1	Pediforme 1	EU025013	Loibersbacher Teich 2	21.08.06	7,750
LO234-4 ^c	Pediforme 1	EU025014			
LO234-5 ^c	Pediforme 1	EU025015			
<i>Ochromonas</i> sp.					
LO128-108	Ochromonas 1	EU024995	Loibersbacher Teich 1	10.07.06	7
LO128-155 ^c	Ochromonas 1	EU024996			
LO128-157	Ochromonas 1	EU076740			
LO128-158	Ochromonas 2	EU076741			
LO128-159	Ochromonas 3	EU076742			
LO128-160 ^d	Ochromonas 1	EU076743			
LO128-161 ^c	Ochromonas 1	EU076744			
LO128-162	Ochromonas 1	EU076745			
LO134-4	Ochromonas 4	EU024997	Loibersbacher Teich 1	21.08.06	5,720
LO134-15 ^c	Ochromonas 1	EU024999			
LO134-23	Ochromonas 5	EU025002			
LO134-25	Ochromonas 1	EU025003			
<i>Synura sphagnicola</i>					
LO228-6	Sphagnicola 1	EU025004	Loibersbacher Teich 2	10.07.06	525
LO228-7	Sphagnicola 1	EU025005			
LO228-33	Sphagnicola 1	EU025006			
LO234-7	Sphagnicola 1	EU025016	Loibersbacher Teich 2	21.08.06	1,470
LO234-8	Sphagnicola 1	EU025017			
LO234-9	Sphagnicola 1	EU025018			

^a The strain number of the isolated cells, genotype, and GenBank accession number are shown for each investigated cell. The place of origin (lake) and the respective abundance is given for each morphospecies in the respective sample.

^b The same genotype number corresponds to 100% similarity between the investigated cells, different genotype numbers within a morphospecies indicate a difference of a single base pair (within the analyzed sequence) from the sequences of other cells of the same morphospecies. Only the sequences of *Dinobryon divergens* cells originating from Lake Fuschlsee differed in two positions from sequences of *D. divergens* cells originating from Lake Wallersee.

^c The sequences obtained from these strains have one mixed base site, but we assume that the base in question corresponds to that present in the other strains at the respective position.

^d This strain represents probably a different genotype, but the three base positions in question could not be unequivocally identified (i.e., K instead of A, R instead of T, and N instead of A).

they were incubated in a 200- μ l PCR tube with 1 μ l of 1:100 diluted Viscozyme L solution (Sigma-Aldrich) in a total volume of \sim 20 μ l at 37°C for 2 h in an Eppendorf Thermomixer comfort. Afterwards, 1 μ l of 1:10 diluted proteinase K solution

(proteinase K [$>600 \times 10^{-3}$ absorbance units/ml]; Qiagen) was added. The tubes were incubated at 55°C for 50 min and subsequently heated at 95°C for 10 min (16). Afterwards, the samples were further processed as described above.

Application to field samples. (i) Dealing with free DNA in plankton samples. As most eukaryotic cells contain many copies of the rRNA genes (specifically, ciliates and dinoflagellates may contain up to several hundred or thousand copies), even the disintegration of only a few cells may cause a serious contamination of the sample. The application of the two washing methods as applied in our protocol sufficiently excluded such background contamination even when broad eukaryotic primers were applied. Using more specific primers circumvented the amplification of free DNA even without washing single cells (data not shown). However, we recommend picking several cells from any morphospecies under investigation as an internal control and testing a negative control from the surrounding fluid of the cell.

(ii) Quantitative analysis and applicability to different taxonomic groups. We recommend the proposed method for a quantitative analysis of protist and microalgae communities combining morphological and molecular investigations. Our protocol allowed for amplification of the nearly full-length SSU rRNA gene from single cells for any protist and algal taxon tested (see Table S1 in the supplemental material). We successfully and quantitatively analyzed DNA fragments of up to 3,000 (data not shown) even though we concentrated on a fragment of between 1,200 and 1,500 base pairs for analysis. All tested morphospecies, including several fragile taxa, were successfully investigated by the proposed method (GenBank accession numbers EU005402, EU024970, EU024971, EU024974, EU024975, EU024977, EU024980 to EU024984, EU024986 to EU024991, EU024994, EU025002, EU025010 to EU025012, EU025018, EU025021, and EU025022 [see Table S1 in the supplemental material]). The combination of washing protocols with the addition of thiosulfate in the PCR therefore significantly improved the single-cell PCR from preserved plankton samples.

Other molecular standard methods are limited in linking morphology and full sequence information; while providing sequence data, clone libraries provide mostly presence-absence information and are severely biased by primer specificity and taxon-specific differences in gene copy number (28). In contrast, fluorescence in situ hybridization targets only short oligonucleotide sequences and requires a detailed a priori knowledge of the sequence and probe specificity.

In contrast to conventional molecular surveys, the proposed method allows the linking of morphological and molecular screening approaches directly and quantitatively based on preserved plankton samples (see Table S1 in the supplemental material). Further, not only abundant taxa but also comparatively rare ones, taxa with a low gene copy number and taxa that are negatively selected by broad eukaryotic primers, can easily and quantitatively be analyzed by the proposed method (see Table S1 in the supplemental material).

(iii) SSU rRNA genotype distribution within and among samples. The proposed method is particularly well suited to detect minute genotypic differences between individuals of the same morphospecies. Genotypic variation within nominal protist taxa is of special interest with respect to the debate on microbial distribution and biogeographies (3, 22, 23, 33). We applied our method to check for differences in the dominant genotypes in protist taxa affiliated with the same morphospecies but originating from different habitats or seasons. We tested specifically for spatial differences for *Dinobryon pedi-*

forme and *Dinobryon divergens* (both Chrysophyceae) and, in addition, for seasonal differences for *Ochromonas* sp., *D. pediforme*, *Dinobryon bavaricum* (Chrysophyceae), and *Synura sphagnicola* (Synurophyceae). The results indicate considerable differences between the tested morphospecies (Table 2). For some species, i.e., *Dinobryon bavaricum*, *Dinobryon pediforme*, and *Synura sphagnicola*, we found no intraspecific variation in the SSU rRNA gene sequence between individuals. This was independent of the time and place of origin.

In contrast, for other species, e.g., *Ochromonas* sp. and *Dinobryon divergens*, the morphospecies were represented by different SSU rRNA genotypes. For these latter morphospecies, our data indicate a different genotype composition in the different samples. For instance, the dominant genotype of *D. divergens* from Lake Fuschlsee was not found in Lake Wallersee. A high molecular variation has also been demonstrated for other nominal nanoflagellate taxa (e.g., for *Spumella* sp. [K. Pfandl et al., submitted for publication], *Paraphysomonas vestita* [2], *Neobodo designis* [33], and *Rhynchomonas nasuta* [22]). A conclusive judgment would require in-depth investigation of the respective morphospecies, which was, however, not in the scope of this study. It remains a future challenge to identify those species in which the morphotype corresponds to a specific phylotype and to separate those in which this is not the case.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Cronberg and H. Preisig for their help with the morphological analyses and L. Eisl and A. Wiedroither for their technical assistance. We further thank G. Cronberg for providing the scanning electron microscopy image of *S. sphagnicola*.

The Austrian Science Fund (project 18315) and the Alpine Research Program of the Austrian Academy of Sciences (CLIME project) provided financial support for this work.

REFERENCES

- Adl, S. M., A. G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Frederico, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, Ø. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel, and M. F. J. R. Taylor. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52:399–451.
- Bertozzi, E., A. Penna, E. Pierboni, I. Bruce, and M. Magnani. 2005. Development of new procedures for the isolation of phytoplankton DNA from fixed samples. *J. Appl. Phycol.* 17:223–229.
- Boenigk, J., K. Pfandl, P. Stadler, and A. Chatzinotas. 2005. High diversity of the “*Spumella*-like” flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environ. Microbiol.* 7:685–697.
- Bonin, S., F. Petrera, J. Rosai, and G. Stanta. 2005. DNA and RNA obtained from Bouin’s fixed tissues. *J. Clin. Pathol.* 58:313–316.
- Bowers, H. A., T. Tengs, H. B. Glasgow, J. M. Burkholder, P. A. Rublee, and D. W. Oldach. 2000. Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfisteria piscida* and related dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4641–4648.
- Connell, L. 2002. Rapid identification of marine algae (Raphidophyceae) using three-primer PCR amplification of nuclear internal transcribed spacer (ITS) regions from fresh and archived material. *Phycologia* 41:15–21.
- Cronberg, G., and R. Laugaste. 2005. New species of *Uroglena* and *Ochromonas* (Chromulinales, Chrysophyceae) from Estonia. *Nova Hedwigia Beih.* 128:43–63.
- Douglas, M. P., and S. O. Rogers. 1998. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat. Res.* 401:77–88.
- Dyal, P. L., S. Hope, D. M. Roberts, and T. M. Embley. 1995. Use of the PCR and fluorescent-probes to recover SSU ribosomal-RNA gene-sequences from single cells of the ciliate protozoan *Spathidium*. *Mol. Ecol.* 4:499–503.
- Edvardsen, B., K. Shalchian-Tabrizi, K. S. Jakobsen, L. K. Medlin, E. Dahl, S. Brubak, and E. Paasche. 2003. Genetic variability and molecular phylog-

- eny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *J. Phycol.* **39**:295–408.
11. Galluzzi, L., A. Penna, E. Bertozzini, M. Vila, E. Garcés, and M. Magnani. 2004. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a dinoflagellate). *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1199–1206.
 12. Gifford, D. J., and D. A. Caron. 2000. Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton, p. 193–221. *In* R. P. Harris, P. H. Weibe, J. Lenz, H. R. Skjoldal, and M. Huntley (ed.), ICES zooplankton methodology manual. Academic Press, London, United Kingdom.
 13. Godhe, A., D. M. Anderson, and A.-S. Rehnstam-Holm. 2002. PCR amplification of microalgal DNA for sequencing and species identification: studies on fixatives and algal growth stages. *Harmful Algae* **1**:375–382.
 14. Guillou, L., E. Nezan, V. Cuff, E. E. L. Denn, M. A. Cambon-Bonavita, P. Gentien, and G. Barbier. 2002. Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French coasts. *Protist* **153**:223–238.
 15. Hahn, M. W., H. Lünsdorf, Q. L. Wu, M. Schauer, M. G. Höfle, J. Boenigk, and P. Stadler. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1442–1451.
 16. Ki, J. S., G. Y. Jang, and M. S. Han. 2004. Integrated method for single-cell DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of the ribosomal DNA from harmful dinoflagellates *Cochlodinium polykrioides* and *Alexandrium catenella*. *Mar. Biotechnol.* **6**:587–593.
 17. Koppelstaetter, C., P. Jennings, K. Hocegger, P. Perco, R. Ischia, H. Karkoszka, and G. Mayer. 2005. Effect of tissue fixatives on telomere length determination by quantitative PCR. *Mech. Ageing Dev.* **126**:1331–1333.
 18. Marin, L., A. Aguilera, B. Reguera, and J. Abad. 2001. Preparation of DNA suitable for PCR amplification from fresh and fixed single dinoflagellate cells. *BioTechniques* **30**:88–93.
 19. Massana, R., J. Castresana, V. Balagué, L. Guillou, K. Romari, A. Groisillier, K. Valentin, and C. Pedrós-Alió. 2004. Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3528–3534.
 20. Modigh, M., and S. Castaldo. 2005. Effects of fixatives on ciliates as related to cell size. *J. Plankton Res.* **27**:845–849.
 21. Pomroy, A. J. 1984. Direct counting of bacteria preserved with Lugol iodine solution. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:1191–1192.
 22. Scheckenbach, F., C. Wylezich, M. Weitere, K. Hausmann, and H. Arndt. 2005. Molecular identity of strains of heterotrophic flagellates isolated from surface waters and deep-sea sediments of the South Atlantic based on SSU rDNA. *Aquat. Microb. Ecol.* **38**:239–247.
 23. Shankle, A. M., X. Mayali, and J. S. Franks. 2004. Temporal patterns in population genetic diversity of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). *J. Phycol.* **40**:239–247.
 24. Sherr, E. B., and B. F. Sherr. 1993. Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists, p. 207–212. *In* P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole (ed.), Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publishers, London, United Kingdom.
 25. Slapeta, J., D. Moreira, and P. Lopez-Garcia. 2005. The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proc. Biol. Sci.* **272**:2073–2081.
 26. Srinivasan, M., D. Sedmak, and S. Jewell. 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* **161**:1961–1971.
 27. Stoeck, T., and S. Epstein. 2003. Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2657–2663.
 28. Stoeck, T., B. Hayward, G. T. Taylor, R. Varela, and S. S. Epstein. 2006. A multiple PCR-primer approach to access the microeukaryotic diversity in environmental samples. *Protist* **157**:31–43.
 29. Takano, Y., and T. Horiguchi. 2005. Acquiring scanning electron microscopical, light microscopical and multiple gene sequence data from a single dinoflagellate cell. *J. Phycol.* **42**:251–256.
 30. Tengs, T., H. A. Bowers, A. P. Ziman, D. K. Stoecker, and D. W. Oldach. 2001. Genetic polymorphism in *Gymnodinium galatheanum* chloroplast DNA sequences and the development of a molecular detection assay. *Mol. Ecol.* **10**:515–523.
 31. Throndsen, J. 1978. Preservation and storage, p. 69–74. *In* A. Sournia (ed.), Phytoplankton manual. UNESCO, Paris, France.
 32. Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* **9**:1–38.
 33. von der Heyden, S., and T. Cavalier-Smith. 2005. Culturing and environmental DNA sequencing uncover hidden kinetoplastid biodiversity and a major marine clade within ancestrally freshwater *Neobodo designis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:2605–2621.

FROM THE ARCHIVES

The Past and Present Classification Problem with Nanoflagellates Exemplified by the Genus *Monas*

Jens Boenigk¹

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestr. 9, 5310 Mondsee, Austria

During the period of protistology, i.e., from the first descriptions of microorganisms by van Leeuwenhoek in 1674 until today, the classification of nanoflagellates (and protists in general) changed several times depending on the available methodology (Corliss 1986, 2001). Scientific dispute focused on the general relationship of nanoflagellates with multicellular organisms, specifically regarding the plant–animal distinction, and the differentiation of distinct nanoflagellate species. I will briefly outline the advances in the conceptual background, i.e., protist megasystematics and species concept, and further portray the past and present classification problem in heterotrophic nanoflagellates. I will pay special attention to the genus *Monas* Müller 1773, as this genus can be considered the ‘oldest’ nanoflagellate genus and is therefore specifically better suited to illustrate the historical development of nanoflagellate classification than any other taxon.

Conceptual Background

Megasystematics

Regarding protist megasystematics, motility was the main or only criterion for the first observers to place these organisms within the animal kingdom; any signs of internal organization were also considered sufficient proof of the animal nature of these organisms (e.g. Ehrenberg 1838; von

Gleichen 1778; Table 1). In general, the scientists of the early 19th century were still mostly convinced of the animal nature of these organisms (see also Bory (1824a, b), ‘animals invisible to the naked eye’; Dujardin (1841)). However, from the mid 19th century onwards the mode of nutrition, i.e. heterotrophy and specifically particulate food uptake versus autotrophy, became the dominating criterion in differentiating animals from plants (e.g. Bütschli 1880–82; Kent 1880–81; Stein 1878; Table 1).

Perty (1852) was one of the first who discussed the problem of animal/plant affiliation thoroughly and his proposal of the order Phytozoa illustrates the problem of the animal–plant distinction. He increasing problems in differentiating animal-like and plant-like forms, i.e., to place microorganisms within the historic kingdoms Animalia and Plantae (cf. Linnaeus 1758), provided a basis for the proposal of the kingdoms’ Protoctista (Hogg 1860) and Protista (Haeckel 1866). However, most of the time zoologists and botanists followed, and still follow, separate approaches, largely ignoring alternative concepts (cf. the Flagellata/Protozoa of Kent (1880–81), Bütschli (1880–89), and Doflein (1916) with the microalgae of Pascher and Lemmermann (1914) and Pringsheim (1963).

Whereas similar suggestions to expand the historic kingdom system succeeded in separating the prokaryotes (first suggested by Chatton (1925) and formally accepted in the 1960s (e.g. Stanier and van Niel 1962)), it is only recently and based largely on molecular evidence that the general view on the higher level taxonomy of protists has become largely harmonized, i.e., Unikonts

¹fax +43 6232 3578.
 e-mail jens.boenigk@oeaw.ac.at

Table 1. Protist megasystematics and the animal–plant distinction in the course of time. Angular brackets are used for either the omission of text [...] or for additional comments, numbers in rounded brackets refer to page numbers in the original document.

Original text	Translation
<p>von Gleichen 1778</p> <p>Man vermisset aber die vorzüglichen Eigenschaften, die der Herr Professor und die Erfahrung, als untrügliches Kennzeichen der Animalität des Thieres bestimmen, nemlich: „die freiwillige Bewegung; die Kraft der Bewegung Einhalt zu thun; sich zu widersetzen; Ueberlegung anzuzeigen; Leidenschaften zu offenbahen u. d. gl.“keineswegs auch an diesen Thierchen nicht, dann es ist ihre eigenthümliche freiwillige Bewegung, wie wir gesehen haben, so wenig als bei den Fischen zu läugnen, und sie haben die Kraft, mitten in ihrer Fahrt Halt zu machen, sich um, und von der einen Seite zur anderen, zu werfen und zu wenden, wovon man verschiedene Beispiele bei den Beobachtungen finden wird; einen anderen Weg zu nehmen; das Vermögen sich den hindernden Schleimtheilchen zu widersetzen, sie zu bewegen und fortzustossen; Ueberlegung, ihren Körper zusammen zu ziehen, und schmärer zu machen, wenn sie einen engen Durchgang zwischen zweien Schleimtheilchen antreffen; sich zu krümmen, wenn ihnen hervorstehende Theile derselben, im Weg kommen, endlich Leidenschaften zu erkennen zu geben, wenn sie sich truppweise versammeln, gesellschaftlich miteinander fortgehen, und sich wieder trennen, oder sich paarweise vereinigen (98/99)</p> <p>Aber das wichtigste Unterscheidungszeichen der Pflanze von dem Thiere ist wohl ihr fester Stand auf und ihre Verbindung mit der Erde durch ihre Wurzeln, und bei den Wasserpflanzen, durch diese mit dem Wasser. Dahingegen das sich von diesen Elementen losgerissene Thier, das Vermögen hat, Stand und Ort nach Willkühr zu verändern. (100)[...]</p> <p>[Wir] wollen alle ein thierisches Leben durch freiwillige Bewegung und thierische Handlungen, zu erkennen gebende Wesen, für dasjenige, was sie sind, nemlich für Thiere halten. (101)</p>	<p>One does not miss at all in these animalcules the excellent characters, which the Professor [meant is Phillip Ludwig Stanius Müller] and the experience determine without any doubt the characteristics of the animal nature of animals, i.e., “voluntary movement; the power to stop movement; to resist; to show consideration; to reveal passion and so on”. Their peculiar voluntary movement cannot be more denied than for fish, and they have the power, to stop on the move, to turn and throw themselves from one side to the other — several examples will be found in the observations, to take another route; the ability to defy hindering slime particles, to move them and to push them away; the consideration to contract and to thin their body whenever they come across a narrow passage between two slime particles; to bend themselves around protruding parts of these particles, finally to show passion when they assemble in groups, corporately go away together, and separate again, or unite pairwise (99/98)</p> <p>But the most important differential character of plants (from animals) is probably their firm stand on and their connection with the earth by their roots, and in the case of water plants, the connection of their roots with water. In contrast, the animal (which is cut loose from these elements) has the ability to change site and place deliberately. (p. 100) [...]</p> <p>We will regard all beings, which show animal-like life by voluntary movement and animal-like action, for that what they are, i.e. animals. (101)</p>
<p>Ehrenberg 1838</p> <p>Alle Infusorien sind organisierte, zum grossen Theil, wahrscheinlich alle, hoch organisierte Thiere. Dass alle mikroskopischen Organismen nur Thiere, nicht Pflanzen wären, wie Buffon meinte, ist irrig; viele Pflanzen bestehen deutlich aus mikroskopischen Einzelformen (XIII)</p> <p>Alle selbstbewegten Körperchen, welche das Mikroskop im Wasser zeigt (1)</p>	<p>All Infusoria are organised, most and possibly all of them, highly organised animals. Buffon’s view that all microscopic organisms are animals is erroneous; many plants are composed of microscopic items (XII)</p> <p>All particles, which move on their own and which a microscope shows in the water (1, [referring to the Monadina as animals])</p>

Table 1. (continued)

Original text	Translation
<p>Wo keine innere Organisation nachzuweisen, fehlt es jedem Urtheil über Aehnlichkeit mit Thieren am ersten und wichtigsten Grunde (38)</p>	<p>Where an internal organisation can not be demonstrated, any judgement (regarding the first and most important case) about the similarity with animals is missing (38)</p>
<p>Perty 1852 Die zweite Ordnung [der Infusorien] kann den Namen Phytozoidia erhalten, weil unter ihnen sehr viele Formen sich befinden, welche in ihrem Lebenscyklus in Wahrheit bald dem Thier- bald dem Pflanzenreiche angehören, zwischen beiden oscilliren, während andere, bei denen dies nicht der Fall ist, so sehr in Gestalt, Bau, Bewegung und sonstigem Verhalten mit ihnen übereinstimmen, dass an eine völlige Trennung nicht zu denken ist. (22) Wenn Ciliata und Phytozoidia hier zu einer Klasse der Infusionsthierchen vereinigt werden, so scheint dieses bei all ihrer Verschiedenheit doch durch einige gemeinschaftliche Merkmale gerechtfertigt zu sein. Alle bestehen aus zarter protoplasmatischer Substanz, alle ermangeln differenzirter organischer Systeme, alle können sich durch Theilung fortpflanzen, allen ist Spiralbewegung eigen. Wer solche Zusammenfassung der einfachsten, in diesen höchst wichtigen Merkmalen übereinstimmenden organischen Wesen schlechterdings nicht annehmen will, der mag die Ciliata zum Thierreich, die Phytozoidia (aber dann alle) zum Pflanzenreich stellen. (136)</p>	<p>The second order [of the Infusoria] may get the name Phytozoidia as it contains many forms, which in their life cycle truly belong at times to the animal — at times to the plant kingdom; they either oscillate between both, or, when this is not the case, are that similar to the former in shape, structure, motion, and other behavior, that they cannot be separated. (22) The combination of Ciliata and Phytozoidia in the class Infusoria, despite all differences, seems justified due to several shared characters: All are composed of a delicate protoplasmatic substance, all lack differentiated organ systems, all can reproduce by division, all show spiral movement. Whoever does not want to accept this combination of the simplest and in these most important characters corresponding organic beings may assign the Ciliata to the animal kingdom, the Phytozoidia (but then all of them) to the plant kingdom. (136)</p>
<p>Bütschli 1880—82 Als Protozoen bezeichnen wir die Organismen, welche einfache Zellen oder Verbände gleichgebildeter, einfacher Zellen sind und sich in ihren physiologischen Lebensäusserungen (Ernährung und Stoffwechsel überhaupt, Reizbarkeit und Beweglichkeit) den typischen mehrzelligen Thieren ähnlich verhalten. (II) Dass nun gerade für die Umgrenzung der Protozoen ein physiologischer Charakter nothwendig wurde, beruht auf dem Umstand, dass von allen Eigenthümlichkeiten der höheren Thierwelt nur die physiologischen verwerthbar erscheinen, um zwischen Lebewesen wie den Einzelligen [...] und jenen Höheren eine Vermittlung herzustellen. (III—IV)</p>	<p>We name those organisms as protozoa, which are simple cells or aggregations of alike and simple cells and which physiologically (nutrition and metabolism in general, sensitivity and motility) behave like the typical multicellular animals. (II) The fact that specifically a physiological character became necessary for the specification of the protozoa is based on the circumstance, that from all the peculiarities of the higher animals only the physiological ones seem utilisable for connecting living beings such as the single cell organisms [...] with those higher ones. (III—IV)</p>
<p>Pascher and Lemmermann 1914 Vielmehr setzen sich die derzeitigen Flagellaten aus mehreren Reihen zusammen, von denen nur wenige einigermaßen verwandtschaftliche Züge zueinander zeigen. (19) Die möglichen Zusammenhänge der Flagellaten mit Organismen, die derzeit gewohnheitsmäßig von den Zoologen behandelt werden [...] fiele aus dem Rahmen des ganzen zu weit hinaus. (21)</p>	<p>Moreover, the flagellates are currently composed of several lineages and only a few of these show characters of a certain relatedness. (19) The possible connections between flagellates and organisms, which are currently consuetudinarily adressed by the zoologists [...] would exceed the present framework by far. (21)</p>

Table 1. (continued)

Original text	Translation
Baldauf et al. 2004	<p>The integrity of the three domains of life, Archaea, Bacteria, and Eucarya, is now confirmed by a tremendous body of data, including 100 completely sequenced genomes. The identities of most of the major groups within these domains are also confirmed by many different data. (44) [...] Fourteen major eukaryotic groups are currently defined based on molecular phylogenetic data. (60)</p>

(split into the Amoebozoa and Opisthokonta by some), Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata (split into Chromista and Alveolata by some), and Excavata are considered equally important major taxonomic groups (see Adl et al. 2005; Baldauf et al. 2004; Keeling 2004).

Species Concept

Similar to the conceptual changes in protist megasystematics, the theoretical background of the concept of nanoflagellate species underwent constant dramatic change. The historical idea of species as unchanging, eternal, and separate units increasingly came under fire — a process culminating in the formulation of the evolutionary theory (Darwin 1859). As early as 1682 (i.e., only 6 years after van Leeuwenhoek reported the first microorganisms in his famous letter to the Royal Society of London), Ray departed from the logical philosophical view of species, defining them genealogically as a group originating from the same seed (*generatio continuata*; Ray 1682).

Following the basic ideas outlined by Ray and later by Linné, Mayr (1942) proposed the biological species concept (i.e., groups of actually or potentially interbreeding natural populations that are reproductively isolated from other such groups). As reproductive isolation is rarely investigated for most nanoflagellates, species were, in practice, largely defined based on morphological characteristics. However, mating experiments in sexual protist lineages in combination with the advent of molecular methods in recent years pushed the discussion towards concepts corresponding to Mayr's biological species concept.

From Pool to Pool: The Nanoflagellates' Fate of being Lumped

The Onset of Protistology

The era of protistology saw major methodological advances starting with the invention of simple microscopes, which allowed for the first visualization of individual microbes by Leeuwenhoek in 1674 (cf. Dobell 1932). In general, the diminutiveness of nanoflagellates and the sparseness of morphologically distinct features contributed to the tentativeness of nanoflagellate classification and taxonomy. Early observers pooled the small microorganisms, for instance as “*Vermis* [...] *punctiformis*” (cf. the genus *Monas* Müller 1773), as “*Punktthierchen*”, “*Kugelthierchen*” and “*Ovalthierchen*” (von Gleichen 1778; compare also *Monas punctum* Ehrenberg 1838), or in the genus *Chaos* (Linnaeus 1758). When Linné introduced the modern binary nomenclature (first in *Species Plantarum* (Linnaeus 1753) and later in various editions of *Systema Naturae* (Linnaeus 1758)), he doubted the living nature of these organisms and considered them as artifacts such as oil drops. However, he introduced *Chaos* Linnaeus 1758 as an aggregate “genus” for microbial organisms. Despite the introduction of some further taxa in later editions of his *Systema Naturae*, Linné largely neglected microorganisms.

From *Chaos* to Complexity: Flagellate Classification after Linné

The taxonomic resolution improved significantly with the introduction of new methodologies such as the development of achromatic lenses and their

application in compound microscopes during the 18th to early 19th centuries (cf. Table 2). These changes accounted for shifts that were no less dramatic in classification and diversity estimates, specifically as they pertained to the nanoflagellates. Müller (1773, 1786) was the first who applied the Linnéan system to microorganisms. Still, the smaller forms (including the nanoflagellates) were pooled by Müller in the newly erected genus *Monas* (*Vermis inconspicuus*, *simplicissimus*, *pellucidus*, *punctiformis* [inconspicuous, most simple, transparent, and punctiform worm]). Most of the organisms which are the focus of this review have been combined in this genus and were later successively separated or described as independent forms (Fig. 1). The taxonomic history of the genus *Monas* is therefore a key for understanding the development of taxonomy and the system of the nanoflagellates and for illuminating scientific advances in this important group of organisms.

The genus *Monas* sensu Müller (1773) roughly corresponds to the family Monadales of Bory (1824a,b). Still, Bory defined the Monadales exclusively negatively as having no caudiform appendages. He already differentiated four genera within the Monadales with genus *Monas* comprising spherical forms. Bory shifted the oblong forms to the genus *Lamellula* and other forms such as *Monas ocellus* to the genus *Ophthalmoplanis*.

Ehrenberg, in his pioneering work of 1838, further split this group in the Monadina and Cryptomonadina (Ehrenberg 1838) families, defining the family Monadina as motile organisms without visible appendages and external organs at a magnification of at least 300 \times . The genus *Monas* sensu Ehrenberg was much narrowly defined as the original genus of Müller, but it was still a compilation of organisms of small size and insufficient morphological features. Ehrenberg's genus *Monas* comprised all Monadina, which lack a tail ("Schwanz"), a lip ("Lippe"), an eye ("Auge") and do not build clusters and do not aggregate (one or two flagella [misidentified as "Rüssel"(trunk) by Ehrenberg] may be present). As the differentiation to Ehrenberg's aggregated genera *Uvella* and *Polytoma* is not strict, several species most probably belonging to *Monas* were also placed in the former genera.

With the increasing quality of microscopes, taxon descriptions of nanoflagellates became generally narrower (Table 2), and for the first time positive criteria were used for the taxon diagnoses in these smallest of eukaryotes. In 1841, Dujardin not only allowed for the presence of flagella in *Monas* and in

the family Monadiens, but also explicitly defined this genus and the family by the possession of flagella (Dujardin 1841). With that, he changed the original negative criterion (no appendages) to a positive criterion (flagella present in the Monadiens, and specifically one single anterior flagellum in the genus *Monas*). The increased taxonomic resolution had already led to the segregation of some of the most prominent of the 'ubiquitous' nanoflagellate taxa, specifically of the genera *Bodo* Ehrenberg (1832) and *Cercomonas* Dujardin (1841).

The Tentative Classification Concept at the Turn of the Century

With the increasing differentiation of organisms formerly lumped together, the morphological identity of the nanoflagellate taxa became increasingly doubtful. Pritchard (1861) had already raised a question regarding to what extent the named forms were really different and distinguishable.

Regarding the genus *Monas*, Stein restricted the family Monadina to unpigmented forms (Stein 1878) and considered that all reddish *Monas* species belonged to fungi while brownish Monadines of Ehrenberg belonged to the newly established family Chrysomonadina. Despite the increasingly narrower definitions of the nanoflagellate taxa (and specifically of the Monadina and the genus *Monas*), these taxa were still criticized as being a collection of indifferently intermingled flagellate forms. Kent (1880–81) provided a more detailed subdivision of these simple nanoflagellates. He differentiated the organisms according to the number of flagella, with the Monadinae (within the Pantostomata-Monomastiga) having, by definition, only one flagellum. Therefore, many organisms formerly affiliated with the Monadinae or even the genus *Monas* were excluded, specifically the genera *Physomonas* Kent 1880–81, *Heteromita* Dujardin 1841, *Polytoma* Ehrenberg, 1832, *Goniomonas* Stein 1878 (all described as having two flagella) and the genera *Spumella* Cienkowsky, 1870 and *Trichomonas* Donné, 1836 (described as having three flagella).

In summary, by the end of the 19th century most of the abundant and ubiquitous nanoflagellate genera were described including, for instance, the genera *Ciliophrys* Cienkowsky, 1875, *Petalomonas* Stein 1878, *Goniomonas* Stein 1878, *Ancyromonas* Kent 1880–81, *Actinomonas* Kent 1880–81, *Rhynchomonas* Klebs, 1892, and *Pseudobodo* Griessmann, 1913. Furthermore, prominent genera were later segregated but were already known

Table 2. Nanoflagellate taxon diagnoses since the onset of protistology. The examples provided are restricted to the model genus *Monas* and all diagnoses and descriptions are provided in the language of the original publication. Please note the significant improvements in the taxon diagnoses during the 19th century as compared to the slight changes during the early 20th century. Despite the limited quality of the original descriptions, many of them are linked to well-known taxa: For instance, *M. pulvisculus* is assumed to be the type species of *Chlamydomonas reinhardtii* and *M. truncata* to be that of *Goniomonas truncata*. Please refer to Figure 1 for further information. The affiliation of the organism described by Leeuwenhoek is less clear but has been synonymised with *Spumella vulgaris* by Dobell (1932) and with either *Monas minima*, *Bodo parvus*, or *Bodo minimus* by Schierbeek (1960). Many of the early descriptions can, however not be linked to known species with any certainty.

An English translation of the species descriptions is provided. In order to largely avoid subjective interpretations, this translation is as literally as possible. As a side aspect of this approach, technical terms are usually avoided in favor of circumscriptives, which are closer to the original descriptions.

The description of *M. ochracea* was taken from Ehrenberg 1838; the descriptions by Meyer correspond to his summarizing descriptions, the original description is somewhat longer, the translation is close to the summarizing description but includes some remarks taken from the full description to be more distinct.

Leeuwenhoek 1676

De vierde soort van diertgens die ick ook sag bewegen, waren so kleijn, dat voor mijn geen figuer te geven sijn, dese diertgens waren meer als 1000 mael cleijnder, als het oog van een volwassen Luijs want ik oordeel de axe van het oog vande Luijs, meer als 10 mael soo lang als de axe van hetgeseijde schepsel, deselve gingen in snelheijt, de voorverhaelde diertgens to boven, ik heb verscheide malen gesien, dat deselve als op een punct bleven staen, en draeijden haer in sulken snelte om, als of wij voor ons Oog, een sweeptol sagen draeijen, en dan weder een circulare bewegingh, welkers circumferentie min grooter was, dan de circumferentie van een cleijn santge, en dan weder soo regt uijt, als crom gebogen (Letter 18, reprinted in Schierbeek 1960)

No figure

Translation: The fourth sort of animalcules, which I also saw a-moving, were so small, that for my part I can't assign any figure to 'em. These little animals were more than a thousand times less than the eye of a full-grown louse (for I judge the diameter of the louse's eye to be more than ten times as long as that of the said creature), and they surpassed in quickness the animalcules already spoken of. I have divers times seen them standing still, as 'twere, in one spot, and twirling themselves round with a swiftness such as you see in a whip-top a-spinning before your eye; and then again they had a circular motion, the circumference whereof was no bigger than that of a small sand-grain; and anon they would go straight ahead, or their course would be crooked. (translation following Dobell 1932)

Müller 1773, 1786

***Monas mica* Müller 1773:** Lenticula 3. microsc. simplicis punctulum lucidum conspicitur, aucta vero magnitudine animalculum ovale vel sphaericum, nam utramque figuram pro lubitu assumit, exhibetur. Hyalina est, circulo ovali intus inscripta; hic mobilis est, & in medio, vel versus antica vel versus postica videtur. Motus vacillatorius; saepe eodem in loco, assumata figura sphaerica, diu gyrat, tumque impressio reniformis oculo in medio corporis sistitur, animalculumque halone, absque dubio e ciliis vibrantibus invisibilibus



***Monas pulvisculus* Müller 1786:** Granula, & in vivis & in mortuis, sphaerica, pellucida margine viridi, minora & majora; in his medio pellucet lineola arcuata virescens, instantem partitionem indicans. Quaedam ex septem conflata, quaedam quatuor mentientia, seu divisionem quadripartitam molientia, ope microscopii compositi vidi. Motus vacillando cursorius. Mensum totum Martium perduravit. Unica guttula myriades exhibet; plurima coacervata, uti quoque Enchelis pulvisculus, membranulum viridem in margine superficiei aquae diu in vasculo



orto, pulchre cingitur.

In aquis purioribus passim

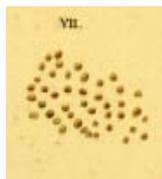
Translation: Under the lens 3 of a simple microscope it is seen as a bright dot, yet at higher magnification as oval or spherical animalcule, because it adopts at times the one, and at times the other shape. It is hyaline, with an oval shape inside, here it is motile and seen either in the centre or anteriorly or posteriorly.

With trembling movement; often rotating in one place, then with a spherical shape but with a persisting kidney shaped depression near the centre of the body, and the animalcule is surrounded by a nice halo, which arises without doubt from trembling invisible cilia. In pure water.

Ehrenberg 1831, 1835

***Monas ochracea* Ehrenberg 1831:** M. corpore subgloboso, perparvo, 1/500 lineae partem vix superante, dilute ochraceo, motu et habitu Monadis Termonis

Description taken from 1838
Translation: Monade with almost spherical shape, very small, hardly exceeding 5 µm, colour ochre, movement and shape like *Monas termo*



fervatae constituunt, parietique ab aqua derelicto adhaerent, pauciora circumnatant. Huc pertinent phoenomenon a clariff.

Goeze, Neue Mannigfaltigkeiten 4. Band p. 323 indicatum. Acervulos similium granulorum viridium Naidis Excrementorum adinstar excernere vidi, hinc iisdem animalculis nutrirri verosimile est. In aqua palustri passim primo vere.

Translation: Granula, in living as well as in dead, spherical, with a greenish margin, smaller and larger; within shines a greenish arch line, which indicates the immediately forthcoming division. By means of a compound microscope I have seen a certain one confluent from seven, a certain one appearing as four, or initiating a division into four parts. The movement is more vacillating than trembling. Persisting through the whole of March. A single drop holds a myriade, most of which are seen aggregated, as *Enchelis pulvisculus*, in a greenish film at the margin of the surface of water, which has been stored in a vessel for a long time, and adhering to the wall of an emptied one, a minor number swimming around. The phenomenon mentioned by the much renowned Goeze (Neue Mannigfaltigkeiten, issue 4, p. 323) corresponds to this. I have seen *Naides* excreting similar greenish granules like faeces, therefore they probably feed on these animalcules
Common in boggy water during spring.

***Monas vivipara* Ehrenberg 1835:** Diese neue Form der bekannten Gattung hat das schon oben erwähnte Interesse, dass sie lebendige Junge mit sich führt, was keine der früheren zeigte. Sie hat übrigens alle Charaktere der Gattung, auch den fadenförmigen einfachen Rüssel und eine kugelförmige Samendrüse, welche bei der Selbsttheilung sich spaltet. Formen, welche,

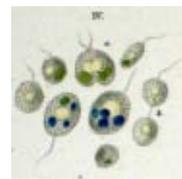
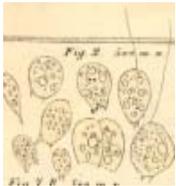


Table 2. (continued)

		<p>zur Selbsttheilung vorbereitet, oft nur erst leicht eingeschnürt sind, zeigen schon, anstatt eines Rüssels am Munde, deren zwei. Sie ist größer als <i>Monas guttula</i> und kleiner als <i>Monas grandis</i>, misst 1/96 bis 1/52 Linie und hat eine kugelige Form <i>Translation</i>: This new form of the familiar genus is of the above mentioned interest, that it carries along alive offspring, which is not the case in any of the former forms. This form has, by the way, all characters of the genus, including the thread-like proboscis and a spherical sperm gland, which splits during self-division. Forms, which, prepared to self-division, are often only slightly constricted, show already two instead of one proboscis. The form is larger than <i>Monas guttula</i> and smaller than <i>Monas grandis</i>, measures 23–43 μm and has a spherical form.</p>	
<p>Dujardin 1841 <i>Monas globulus</i> Dujardin 1841: Corps globuleux, de forme presque constante. — Filament naissant d'un amincissement antérieur. — Longueur 9–14 μm <i>Translation</i>: Body spherical, body shape nearly constant, — filament originating from an anterior dimunition, 9–14 μm in length</p>		<p><i>Monas fluida</i> Dujardin 1841: Corps mou, demi-fluide, de forme variable, irrégulièrement ovoïde, quelquefois rétréci en arrière, creusé de larges vacuoles. Long. 10 μm. <i>Translation</i>: body soft and semifluid, variable in shape; irregular contour ovate, sometimes constricted posteriorly, hollowed by large vacuoles. 10 μm in length.</p>	
<p>Perty 1852 <i>Monas cordata</i> Perty 1852: Gestalt von der breiten Seite herzförmig, von der schmälern verkehrt oval, abgestutzt, vom Vorderende gesehen rund;hyalin oder graulich von innern Molekülen. L. 1/95 — 1/90^{'''}. Bern, in Sumpfwässern, Januar, September, Dezember. Immer selten und einzeln. Schwimmt mässig schnell unter zitternder Bewegung und sehr seltener Axendrehung.</p>		<p><i>Monas succisa</i> Perty 1852: Oval, oft hinten abgestutzt, seltener zugespitzt, manchmal mit 1-2 kurzen Schwänzchen; farblos, durchsichtig, mit grossen Blastien; Bewegungsfaden doppelt körperlang. L. 12–15 μm. Sehr zahlreich in einem Wasser, worin Anodonten faulten, Februar, März. In einem faulen Sumpfwasser von Genf, Juli. Der dicke Theil des Ovals, welches der</p>	

Faden äusserst schwer zu sehen, mehr als doppelt körperlang.

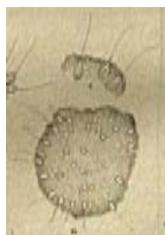
Translation: Shape cordate as seen from the broad side, oval and truncate as seen from the narrow side, rounded anteriorly, hyaline or granulate from internal molecules. Length 23–25 μm . Bern, in swamp ponds, January, September, December. Always rare and single. Swims moderately fast with an oscillating motion, seldom revolving, thread difficult to discern, more than double the length of the body.

Fresenius 1858

***Monas consociata* Fresenius 1858:**

Einzelne Monade ohne den Faden 1/100 — 1/75 mm lang, eiförmig, in eine schnabelförmige Spitze verschmälert, welche in einen Flimmerfaden von mehr als doppelter Körperlänge ausgeht; die untere Hälfte dieses Fadens wird gewöhnlich steif gesehen, und nur der obere, deshalb ohne Jod schwer sichtbare Theil beweglich. Der Körper ist farblos, zeigt gleichfalls farblose feine Körnchen und am hinteren Ende meist eine runde, optisch-röthliche, Vacuole, welche aber nicht contractil gefunden wurde. Zahlreiche Monaden dieser Art sind in einem glashellen Schleim eingebettet, welcher durch farblose Körnchen granuliert erscheint. Eine Bewegung einer solchen Monadengesellschaft, welche wohl nicht zweifelhaft seyn dürfte, habe ich bis jetzt nicht wahrgenommen. Im gestandenen Wasser aus dem Walldorfer Sumpfe, Juni und Juli.

Translation: Single Monade without thread 10–13 μm in length, ovoid, narrowed to a



Körper darstellt, nach vorn gekehrt. Manche hinten durch Ausfransung wie bewimpert oder offen. Schwimmt schnell, unter rascher Längsdrehung, bleibt manchmal auf derselben Stelle, sich fortwährend um die Längsachse drehend.

Translation: oval, usually truncate, rarely pointed behind; sometimes with one or two short tails, colorless, transparent, with large vacuoles; agitation thread twice the length of the body. Length 1/180 — 1/150^m. Very abundant in water with rotting Anodonta spp., February, March. In a fouling swamp water near Geneva, July. The thick part of the oval, which represents the body, turned anteriorly. Some appearing frayed out or open. Swimming fast and rapidly revolving, stays sometimes at the same place while permanently revolving.

***Monas truncata* Fresenius 1858:** [...] in verschiedenen gestandenen Wässern, mitunter häufig in stehendem Wasser mit Conferven [...] farblos, hyalin, 1/150-1/100 mm groß, im Umfang oval-rundlich, vorn abgestutzt, von zwei Seiten comprimiert; in der Mitte des Körpers oft ein grösseres Bläschen (Kernchen), auch mehrere kleine. Am vordern abgestutzten Ende sitzen, meist seitlich, zwei Fäden an, welche von der Länge des Körpers sind oder denselben wenig übertreffen. Dicht unter dem vordern Rand sieht man meist ein schmales querlaufendes Körperchen, welches schwach (wohl nur optisch) grünlich gefärbt ist. Unterhalb dieses Querbändchens, dasselbe fast berührend, findet sich auf der einen Seite eine kleine deutliche kontraktile Vacuole. Die Seitenansicht zeigt, dass der Körper durch einen leisen Eindruck in der Mitte schwach gekrümmt ist. Schwimmt unter einem Zittern des Körpers ohne Drehung um die Längsachse nicht rasch und ruht bald aus,



Table 2. (continued)

beak-shaped cusp ending in a thread of twice the length of the body, the lower part of this thread is usually considered to be inflexible and only the upper (and therefore without iodine hardly visible) part agile. The body is colorless, containing colorless granules and posteriorly a spherical reddish vacuole, which was found to be not contractile. Many monads of this species are embedded in a lucid slime, which appears granulated by numerous granules. I have not yet noted any movement of such a monad community, which should not be considered questionable. In aged water originating from the walldorfer swamp, June and July.

nachdem es von der geraden Richtung öfter abbog und umwendete.

Translation: [...] in various aged water, sometimes abundant in standing water with *Conferva* sp. [...] colourless, hyaline, 6–10 µm, oval to spherical in shape, truncate anteriorly, compressed, in the center of the body a larger vesicle, sometimes several smaller ones. Two threads, which are as long or slightly longer than the body, originate laterally from the anterior, truncate end. A greenish, band-like body transversely placed near the anterior border. Located on one side below this band, and nearly in contact, is a clearly visible contractile vacuole. In side view the body is slightly bent. Swims not fast with an oscillating motion without revolving, resting in little while after turning several times.

De Fromental 1874

***Monas globosa* De Fromental 1874:** Corps sphérique, blanc avec quelques granulations rouge. Vésicule contractile très-visible dans la partie moyenne. Bouche située à la base du flagellum.

Translation: Body spherical, transparent with several red granules; contractile vesicle clearly visible subcentral, oral aperture situated at the base of the flagellum.



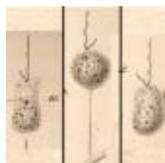
***Monas ovata* De Fromental 1874:** Corps ovale, plus large à la base qu'au sommet; couleur blanche avec des granulations jaunâtres à la partie inférieure. Sommet rétréci, hyalin, et donnant naissance à un flagellum long, mince et ondulant.

Translation: body oval, widest posteriorly; transparent with yellow granulations towards the posterior part. The anterior end constricted, hyaline, with a long, slender, and undulating flagellum.



Meyer 1897

***Monas minima* Meyer 1897:** 3–5, 2–3 µm. Rund bis oval, hinten körnig. Cilien sehr dick, etwas kürzer als der Körper und ein Drittel des Körpers. Vakuole vorn, 8 Sekunden, Kern vor der Mitte. Mundstrich? Bewegung rasch, oft doppelt. Ernährung durch Blasen neben der Geissel. Teilung meist in rascher Bewegung, 10 Minuten. *Translation:* 3–5 × 2–3 µm. Spherical to



***Monas sociabilis* Meyer 1897:** Chromatophoren 12 u. 8 µm. Hauptcilie über Körperlänge, Nebencilie ein Drittel des Körpers. fett. Leukosin. Koloniebildung durch Zusammentreten ursprünglich getrennter Individuen.

Translation: Length 12 µm, width 8 µm, main cilia somewhat longer than the body, second flagellum one third of the body.

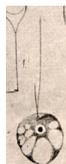


oval, Posteriorly granulated. Cilia very thick, somewhat shorter than 1.3 times the body. Contractile vacuole anteriorly (pulsation: 8 s), nucleus nearly central. Thickened area posterior which is possibly an oral structure. Fast swimming, often oscillating. Nutrition by means of vesicles near the flagellum. Division mostly during fast movements and completed within 10 min.

Valkanov 1926

***Monas bureschii* Valkanov 1926:** Zellen mit kugelige bis eiförmige Umriß. Die Geisseln springen von einem Grübchen herför. Hauptgeißel $1\frac{1}{2}$ mal und Nebengeißel $\frac{1}{2}$ mal Körperlang. Die Vakuole und der Kern liegen in der vorderen Hälfte der Belle. Länge $6\ \mu\text{m}$.

Translation: Cells with spherical to ovate shape. The flagella arise from a groove. Main flagellum 1.5 times and second flagellum 0.5 times the length of the body. The vacuole and the nucleus are situated in the anterior part of the cell. Length: $6\ \mu\text{m}$.



fat and leucosine. Formation of colonies through aggregation of up to 50 originally separated individuals.

***Monas sphaericus* Valkanov 1926:**

Körperform kugelig. Hauptgeißel $2\frac{1}{2}$ —3 mal und Nebengeißel fast einmal körperlang. Der Kern befindet sich im Vorderende in der Nähe der Basis der Geisseln. Durchmesser 4 — $6\ \mu\text{m}$.

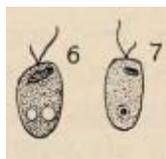
Translation: Cell shape spherical. Main flagellum 2.5—3 times and second flagellum nearly 1 times the length of the body. The nucleus is situated at the anterior end near the basis of the flagella. Diameter 4 — $6\ \mu\text{m}$.



Skvortow 1932, Dangeard 1934

***Monas abrupta* Skvortzow 1932:** Zellen breit oval oder verkehrt eiförmig, 7 — $12\ \mu\text{m}$ lang, vorn etwas gestutzt, freischwimmend. Hauptgeißel $\frac{1}{2}$ mal körperlang. Augenfleck fehlt. Kontraktile Vakuole neben dem Kern. Ernährung animalisch. In verschmutztem Wasser.

Translation: Cell shape broad oval or ovate. 7 — $12\ \mu\text{m}$ in length, anteriorly truncate, freely swimming. Main flagellum 0.5 times the length of the body. Eyespot absent. Contractile vacuole besides nucleus. Animal nutrition. In polluted water.



***Monas longicilia* Dangeard 1934:** L'espèce est très voisine du *Monas vulgaris*, mais la longueur inusitée du flagellum principal nous a conduit à la distinguer sous le nom de *M. longicilia*: la longueur de ce flagellum atteignait 3 ou 4 fois la longueur du corps. Cette espèce, de forme sphérique, est dépourvue de stigma et d'échancrure antérieure: son diamètre est de 10 à $16\ \mu\text{m}$: à l'avant se trouvent deux vacuoles contractiles, dont l'une disparaît brusquement alors que la seconde apparaît: parfois, il s'en forme une troisième: le noyau nucléolé est visible à l'avant sans l'aide d'aucune réactif. (...) Dans une infusion de foin. Marine.

Translation: The species is very close to *Monas vulgaris*, but the exceptional length

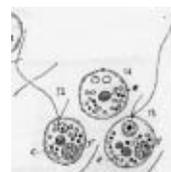
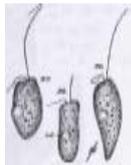


Table 2. (continued)

Skuja 1948, Bourelly 1987

***Monas affinis* Skuja 1948:** Monada sat metabolica, \pm cylindricea, ellipsoidea vel clavata, antice oblique truncato-rotundato cum depressione lata et vadosa, postice rotundata, acute rotundata vel protracta extremo subacute rotundato, 17–22 μm longa, 5–8 μm lata. Flagella bina in depressione apicali inserta: flagellum unum cellulae ad sesquialongius, alterum 1/3 – 1/5 cellulae longitudinis. Periplastis tenuis, hyalinus levisque. Cytoplasma granulatum, granulis majoribus sparsis. Vacuolum contractile unum medio in latere dispositum. Nucleus nucleolatus in parte anteriore.

Translation: Monade of quite variable shape, more or less cylindric, ellipsoid or clavate, anteriorly oblique truncate-rounded with a broad and less deep depression, posteriorly rounded, pointedly rounded or elongated and half-pointed rounded. 17–22 μm in length, 5–8 μm in width. Two flagella insert in the apical depression: one flagellum is around 1.5 times as long as the cell, the other 1/5 to 1/3 of the cell length. The periplast is thin, hyaline, and plane. The cytoplasm is granulated with scattered coarser granules. One contractile vacuole is located laterally in the middle. The nucleus is located in the anterior part



of the main flagellum was the reason for us to distinguish it under the name *M. longicilia*: The length of this flagellum is up to 3 or 4 times the length of the body. This species, of a spherical form, has no stigma and no anterior groove: its diameter is between 10 and 16 μm : two contractile vacuoles anteriorly, one of which abruptly disappearing while the second appears: sometimes a third vacuole is forming: the nucleus is visible in the front part without the help of chemicals. (...). In a hay infusion. Marine.

***Monas captiva* Bourelly 1987:** Cellulae posterior pars longe elongata. Cellula cum duobus inaequalibus flagellis (longitudo 22–24 μm ; diametros 3–4 μm). Cytoplasma incolor, cum uno stigmate et una anteriore contractile vacuola. Colonia cum 16–64 cellulis (18–20 \times 4–10 μm) posterioribus partibus conjugatis. Nutricatio animalis cum pseudopodiale captura. In statione 42, Lunz.

Translation: The posterior part of the cell is long elongated.

Cell with two unequal flagella (length 22–24 μm ; diameter 3–4 μm). Cytoplasm colorless, with one stigma and one anterior contractile vacuole. Colony with 16–64 cells (18–20 \times 4–10 μm) posteriorly connected. The animal ingests through capture with pseudopodia. In station 42, Lunz.



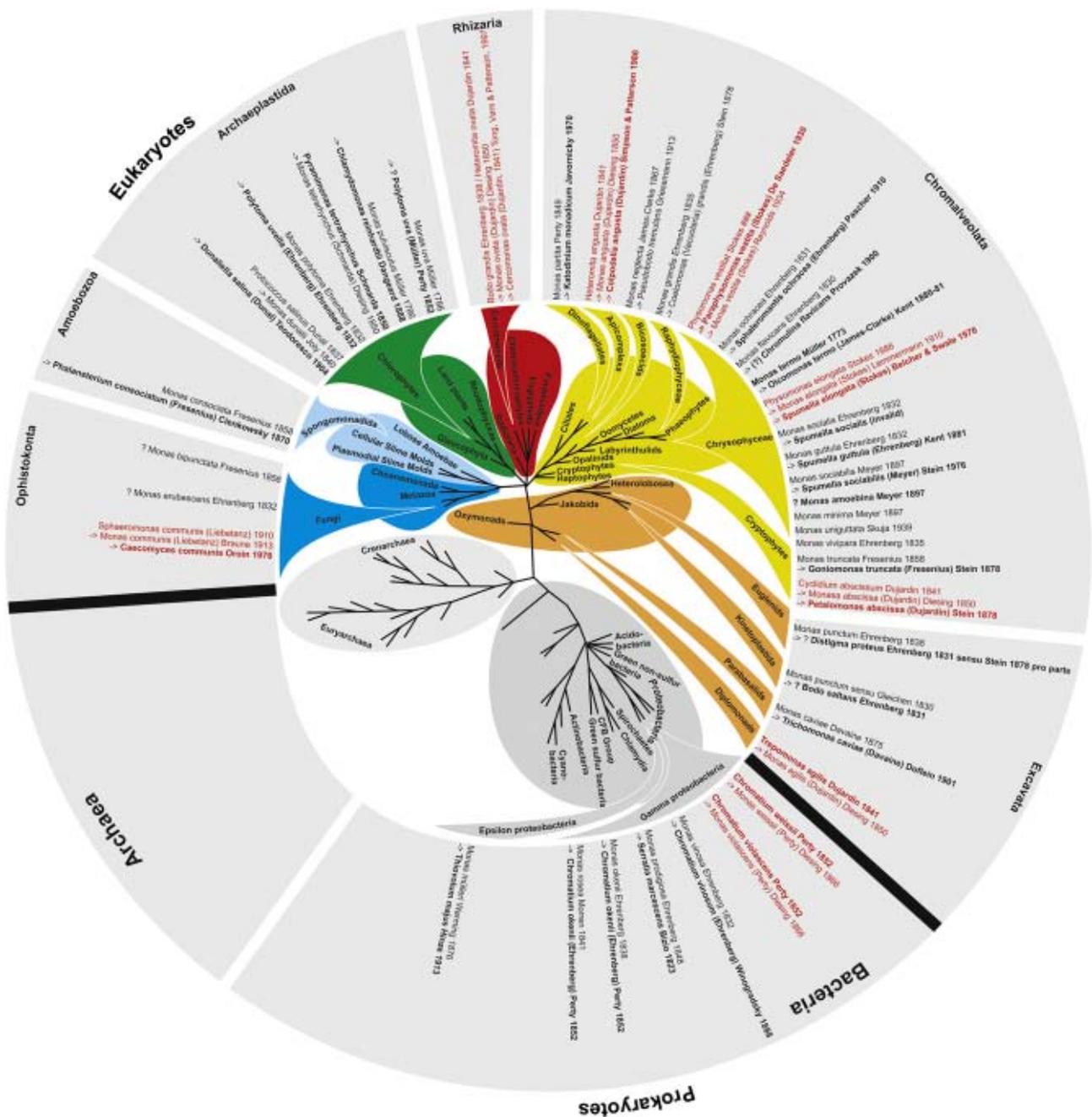


Figure 1. Species associated with the ‘oldest’ nanoflagellate genus, i.e., the genus *Monas*, in the tree of life. All *Monas* spp., for which the taxonomic affiliation seems clarified, are shown. The majority of existing binomen is, however, not included in this tree, as the cellular identity of the respective organisms is unclear. Most *Monas* spp. have meanwhile been synonymised with or integrated in other genera: Those organisms, which have originally been described as *Monas* sp. are shown in black letters. Those, which have been transferred to this genus but have been originally described with a different generic affiliation are shown in red letters. The respective binomen, which is currently most commonly used, is printed in bold. Please note that the latter binomen is not necessarily the correct taxonomic designation (modified after Baldauf et al. 2004).

under different names, for instance the genera *Caecitellus* Patterson et al., 1993 and *Metromonas* Larsen and Patterson, 1990. According to Patterson and Lee (2000), species belonging to all of these genera are now among the most commonly reported nanoflagellate species. Still (and possibly due to the older and thus less detailed taxon diagnosis), the formerly described taxa *Monas*, *Bodo*, and *Cercomonas* were the most abundant, the most commonly reported and the most widely distributed genera.

The Contribution of Electron Microscopy

The general system achieved by the end of the 19th century (cf. Bütschli 1880–89; Doflein 1916; Kent 1880–81; Pascher and Lemmermann 1914) remained in place for most of the 20th century. The classification and general quality of the taxon diagnoses of nanoflagellates improved little during this time and was largely based on light microscopy until the 1980s (Table 2), even though the invention of electron microscopy in the 1930s (cf. Agar 1996) further increased taxonomic resolution. Specifically, the flagellar apparatus and the fine structure of the flagella, data on mitosis and cytokinesis, and the organization of mitochondrial cristae and plastids helped to resolve the confusion of flagellate classification (e.g. Andersen 2004; Karpov 2000; Preisig 1995). Electron microscopic evidence triggered the rejection of the zoological taxon Mastigophorea (Flagellata) in favour of many distinct flagellate groups (such as the alveolates, Euglenozoa, and stramenopiles: Karpov 2000; Patterson 2000), and thus initiated a certain approximation of the zoological and botanical points of view on flagellate classification.

Electron microscopy further provided morphological characteristics allowing for a clear separation of some taxa formerly linked to the genus *Monas* (such as *Paraphysomonas* spp. cf. Preisig and Hibberd 1982 a, b, 1983). More and more taxa came into question or were shifted to other genera. Whereas Reynolds (1934) still accepted 13 species of *Monas*, only three of the more than 100 binomina affiliated with the genus *Monas* were considered to be valid by Silva (1960). Silva (1960), and later Preisig et al. (1991), proposed the generic name *Spumella* instead of *Monas*, as the type species of the latter genus is questionable. But even the genus *Spumella* is problematic, for two reasons: first, only very few strains of *Spumella* were subject to electron microscopic investigations (Belcher and Swale 1976; Bruch-

müller 1998; Preisig and Hibberd 1983; Mignot 1977; Tanichev 1993), and second, it remained unclear whether the strains investigated were identical or even related to the original type species of *Spumella* (or *Monas*). The strains of *Spumella* investigated so far were all characterized by a naked cell surface; heterokont flagella emerging from an apical depression with mastigonemes on the long flagellum, while the short flagellum is naked; and mitochondria with tubular cristae. A number of other structures differed between strains; for instance, they may or may not possess a leucoplast, a flagellar swelling, an eyespot or mucocysts (Bruchmüller 1998; Preisig and Hibberd 1983).

However, as a result of the breakdown of the taxon Mastigophorea, affiliation with the genus *Monas* became even less clear, as different taxa formerly affiliated with the genus *Monas* were now related to different major taxonomic groups. Largely due to the observation of siliceous cysts in *Spumella* (and in related *Monas* spp.: e.g. Scherffel 1924) and the increasing synonymous use of both generic names (Preisig et al. 1991; Reynolds 1934; Silva 1960), a consensus view emerged placing the genus *Monas* within the chrysophytes/chrysoomonads despite the lack of taxonomic evidence.

In summary, electron microscopic studies confirmed the great diversity of protists and were thus a major step towards a separation and characterization of major eukaryotic lineages; the phylogenetic relationships between these lineages and their evolution remained, however, ambiguous (Karpov 2000). Similarly, on the species and genus level, electron microscopy contributed to the designation of (new) taxa. However, regarding the genus *Monas/Spumella* (and a number of other flagellate taxa) electron microscopy neither proved the monophyly of the respective genus nor clarified the identity of the type species. Even though electron microscopy may have had the potential to sufficiently separate paraphyletic lineages within these aggregate genera, the sparseness of ultrastructural studies and the predominance of light microscopic analyses in environmental studies did not provide a sufficient database for sound conclusions about phylogenetic relationships.

Flagellate Classification in the Molecular Era

The advent of molecular methods and their establishment as standard tools in recent years again pushed microbial diversity estimates.

Specifically the invention of the polymerase chain reaction (PCR) by Mullis in 1983 (cf. Mullis 1990) yielded considerable advances in estimating the evolutionary relationships (cf. Adl et al. 2005; Baldauf 2003; Keeling 2004). Most of the major protist lineages, which were proposed based on ultrastructural evidence, could be confirmed by molecular data. Further, some formerly uncertain relationships such as the close relationship between animals and fungi were established and confirmed by molecular methods (Patterson 2000).

It is now clear that organisms originally affiliated with *Monas* spp. truly belong to all major eukaryotic lineages sensu Adl et al. (2005) (Fig. 1): the Opisthokonta (e.g. *Monas communis* Braune, 1913 that is now known as *Caecomyces communis*), the Amoebozoa (e.g. *Monas consociata* Fresenius, 1858 now known as *Phalansterium consociatum* (Fresenius) Cienkowski, 1870), the Rhizaria (e.g. several taxa now affiliated with *Heteromita* spp.), the Archaeplastida (e.g. *Monas pulvisculus* Müller 1786 that is probably identical to *Chlamydomonas reinhardtii* cf. Pröschold et al. 2001), the Chromalveolata (e.g. the strains now considered to be affiliated with colorless chrysophyte taxa such as *Spumella* spp.) and the Excavata (e.g. *Monas abscissa* Diesing 1850 that has been transferred to *Petalomonas*). Even prokaryotic lineages were originally included in the genus *Monas* (e.g. *Monas okenii* Ehrenberg 1838 and *Monas vinosa* Ehrenberg, 1832 (now *Chromatium okenii* and *Chromatium vinosa*), and *Monas prodigiosa* Ehrenberg, 1848 (now included in *Serratia marcescens*).

The General Picture

Looking back, the ongoing transfer of species affiliated with the genus *Monas* to other taxa led to a nearly complete change of meaning of this generic name. Originally including all small organisms with a simple organization, the genus was increasingly restricted to small unpigmented flagellates (eukaryotes) and later to flagellates possessing a single flagellum. This change of meaning was, however, largely based on the exclusion of taxa with distinct morphological features rather than on an increase in scientific insight about the identity of the genus *Monas*. From the early 20th century onwards, the (questionable) synonymisation of the genus *Monas* with the genus *Spumella* (originally defined as having three flagella), restricted the genus *Monas* in practice increasingly to chryso-

flagellates. The synonymous use of the generic names *Spumella* and *Monas* as unpigmented biflagellate chrysophytes without surface scales still reflects the current practice. However, evidence about the synonymy of both genera and about the identity of the type species of *Monas* is missing. Despite the ongoing refinement of flagellate taxon diagnoses, the genus *Monas* represented an aggregate genus throughout time. Even the present-day taxon *Monas* (mostly used in the east-Asian literature, cf. Shen et al. 1990)/*Spumella* (synonymously used in the European and American literature, cf. Boenigk 2005) is polyphyletic comprising at least three to five lineages (Boenigk et al. 2005, 2006).

Due to the limitations of light microscopy, many further stramenopile taxa are presumably also still included in this taxon in morphological surveys, for instance organisms affiliated with several of the marine stramenopile clusters (MAST). Based on the morphological similarity (cf. Boenigk 2005; Massana et al. 2006), many of these organisms have probably been placed within the colorless chrysophyte taxa *Monas/Spumella* or *Oikomonas* in morphological surveys. This may explain the abundance of *Monas/Spumella* in some marine surveys (Bharati et al. 2001; Børsheim and Bratbak 1987, Dorothy et al. 2003, Kuylenstierna and Karlson 1994) that could, to date, not be confirmed by molecular methods (e.g. Massana et al. 2006).

Similar to the case of *Monas/Spumella* that was outlined above, many of the current nanoflagellate genera and species comprise broad phylogenetic groups of a certain morphological similarity or may even be paraphyletic or polyphyletic, for instance *Bodo* and *Cryptobia* (Hughes and Piontkivska 2003), and specifically the morphospecies *Paraphysomonas vestita* (Boenigk et al. 2005), *Neobodo designis* (von der Heyden and Cavalier-Smith 2005; Koch and Ekelund 2005), *Neobodo curvifilus*, *Neobodo saliens* (Scheckenbach et al. 2006), and *Goniomonas* spp. (von der Heyden et al. 2004). These problems are generally more pronounced in the first taxa named, i.e., are most pronounced in *Monas* Müller 1773 followed by genera such as *Bodo* Ehrenberg, 1832 and *Cercomonas* Durjardin 1841. In turn, many of the newly discovered and quantitatively important phylotypes were formerly probably included in one of the “ubiquitous” taxa. The current evidence implies that an enormous ‘Chaos’ of possibly convergent phylotypes affiliated with very similar morphotypes needs to be resolved in the future.

Current Perspectives

Diversity and Classification of Nanoflagellates

Whereas protist megasystematics may approach a general consensus view in the near future for most lineages (cf. Adl et al. 2005; Baldauf et al. 2004; Keeling 2004), the process of refinement in nanoflagellate classification is far from complete and remains problematic because of the exceptional degree of paraphyly displayed by these organisms (Leadbeater and McCready 2000). The fact that past centuries of intense research efforts did not yield sound taxon diagnoses for many flagellate taxa reflects the overwhelming diversity of flagellates (and protists in general), which could not be or could be only partly resolved using previous methods. In turn, each (historical) methodological progress yielded a new and formerly unknown diversity within taxa, thus rendering many of the existing taxa paraphyletic or unsuitable. However, the molecular data in the genomic era may presumably set a tentative end-point for the persistent increase in flagellate diversity estimates.

The coming years will most certainly provide a basis for flagellate classification and taxonomy which qualitatively differs from that of the past centuries. Whereas flagellate classification in past centuries largely reflected the limitations of available methods, the future will most probably be hallmarked by a conceptual dispute over the concept and methods of taxon diagnoses, which — for the first time — may not be restricted by limitations regarding methodological resolution. We are already facing an intense and controversial discussion on the relevant taxonomic and phylogenetic resolution in protist taxa, which is, however, based on too little data (cf. Boenigk et al. 2006; Fenchel and Finlay 2006; Foissner 2006, 2007; Slapeta et al. 2006). Linking molecular and morphological investigations, both for cultivated strains and for cultivation-independent environmental surveys, will be one of the most important research tasks for future advances.

Towards a Concept of Nanoflagellate Species

A promising way forward are the attempts to extend the concept of biological species to asexual lineages based on the degree of molecular similarity. Even though the biological species

concept does not apply to organisms without sexuality or parasexuality, the degree of molecular similarity between sexual conspecifics is increasingly used as a yardstick for asexual ones from comparable evolutionary lineages (Behnke et al. 2004; Coleman 2000; Denboh et al. 2003; Hoef-Emden 2007). However, the biological species concept itself has its weaknesses, e.g., specifically the postulated separation of the gene pool between distinct species (even metazoan species) may not be strict (e.g. Mallet 2007). Further, owing to the tremendous diversity of protists, it seems unlikely that a single concept will be applicable to all of the protist groups.

Despite these uncertainties, the current attempts may at least contribute to a species resolution in protists comparable to that of higher eukaryotes. Adjusting the concepts is a necessary precondition for drawing conclusions about derived theories such as flagellate biogeography and the 'everything is everywhere' debate. The predominant view of a low to moderate number of nanoflagellate taxa, most of which seem to be globally distributed and ubiquitous (e.g. Fenchel 2005; Finlay and Fenchel 2004), may well be replaced by the view of a tremendous number of taxa with a much more restricted distribution, both with respect to habitat type and geographic distance (Boenigk et al. 2006; Slapeta et al. 2006; von der Heyden and Cavalier-Smith 2005).

In summary, the conceptual progress in flagellate (and protist) biology may exceed by far that of the past decades. The long research tradition, despite the too often lacking conceptual progress, should therefore not discourage, but in contrast stimulate future research on aspects related to the basic 'units of biodiversity' (Claridge et al. 1997) in the smallest but most abundant eukaryotes on earth.

Acknowledgements

I thank Q. Wu and F. Chen for their help with Chinese literature and G. Cronberg, R. Medinger, K. Pfandl, and A. Chatzinotas for their helpful comments. I further thank the Editor-in-Chief and four anonymous reviewers for commenting on an earlier version of this manuscript. This work was financially supported by the Austrian Science Fund (FWF project P 19706) and the Austrian Academy of Sciences' Alpine Research Programme (CLIM-Land).

References

- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Frederico S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MFJR (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**: 399–451
- Agar AW (1996) The Story of European Commercial Electron Microscopes. In Mulvey T (ed) *The Growth of Electron Microscopy. Advances in Imaging and Electron Physics*, vol. 96. Academic Press, London, pp 415–584
- Andersen RA (2004) A historical review of heterokont phylogeny. *Jap J Phycol* **52**: 153–162
- Baldauf SL (2003) The deep roots of eukaryotes. *Science* **300**: 1703–1706
- Baldauf SL, Bjattacharya D, Cockrill J, Hugenholtz D, Pawlowski J, Simpson A (2004) The Tree of Life. An Overview. In Cracraft J, Donoghue MJ (eds) *Assembling the Tree of Life*. Oxford University Press, Oxford, pp 43–75
- Behnke A, Friedl T, Chepurinov VA, Mann DG (2004) Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *J Phycol* **40**: 193–208
- Belcher JH, Swale EMF (1976) *Spumella elongata* (Stokes) nov. comb., a colourless flagellate from soil. *Arch Protistenkd* **118**: 215–220
- Bharati VR, Kalavati C, Raman AV (2001) Planktonic flagellates in relation to pollution in Visakhapatnam Harbour, east coast of India. *Ind J Mar Sci* **30**: 25–32
- Boenigk J (2005) Some remarks on strain specificity and general patterns in the ecology of *Spumella* (Chrysophyceae). *Nova Hedwigia Beih* **128**: 167–178
- Boenigk J, Pfandl K, Stadler P, Chatzinotas A (2005) High diversity of the “*Spumella*-like” flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environ Microbiol* **7**: 685–697
- Boenigk J, Pfandl K, Garstecki T, Novarino G, Chatzinotas A (2006) Evidence for geographic isolation and signs of endemism within a protistan morphospecies. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5159–5164
- Børsheim KY, Bratbak G (1987) Cell-volume to cell carbon conversion factors for a bacterivorous *Monas* sp. enriched from seawater. *Mar Ecol Progr Ser* **36**: 171–175
- Bory de Saint Vincent J-B (1824a) Microscopiques. In *Encyclopédie Méthodique: Histoire Naturelle des Zoophytes*. Tome 2, Paris, pp 515–543
- Bory de Saint Vincent J-B (1824b) Monade. In *Encyclopédie Méthodique: Histoire Naturelle des Zoophytes*. Tome 2, Paris, pp 548–550
- Bruchmüller I (1998) Molekularbiologische Charakterisierung und phylogenetische Einordnung heterotropher Nanoflagellaten und prostomatider Ciliaten des Süßwassers. Thesis, Universität Kiel
- Bütschli O (1880–89) Protozoa, Bronns Klassen und Ordnungen im Tierreich. CF Winter, Leipzig
- Bütschli O (1880–82) Protozoa, Bronns Klassen und Ordnungen im Tierreich. Erster Band. Protozoa. I. Abteilung: Sarkodina und Sporozoa. CF Winter, Leipzig
- Chatton E (1925) *Pansporella perplexa*, amoebien a spores protégées parasite des daphnies. Réflexions sur la biologie et la phylogénie des protozoaires. *Ann Sci Nat Zool* **8**: 5–84
- Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR (1997) *Species – the Units of Biodiversity*. Chapman & Hall, London
- Coleman AW (2000) The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist* **151**: 1–9
- Corliss JO (1986) Progress in Protistology During the First Decade Following Reemergence of the Field as a Respectable Interdisciplinary Area in Modern Biological Research. In Corliss JO, Patterson DJ (eds) *Progress in Protistology*, vol. 1. Biopress Ltd., Bristol, pp 11–63
- Corliss JO (2001) Protozoan Taxonomy and Systematics. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group
- Darwin C (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, London
- Denboh T, Ichimura T, Hendrayanti D, Coleman AW (2003) *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Charophyceae, Chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group I intron and ITS2 of nuclear rDNA. *J Phycol* **39**: 960–977
- Diesing CM (1850) *Systema Helminthum*, vol. I. Wilhem Braumüller, Vindobonae
- Dobell C (1932) *Antony van Leeuwenhoek and his ‘little animals’*. Bale & Danielsson, London
- Doflein F (1916) *Lehrbuch der Protozoenkunde*. Fischer, Jena
- Dorothy KP, Satyanarayana B, Kalavati C, Raman AV, Dehairs F (2003) Protozoa associated with leaf litter degradation in Coringa Mangrove Forest, Kakinada Bay, east coast of India. *Ind J Mar Sci* **32**: 45–51
- Dujardin MF (1841) *Histoire naturelle des zoophytes. La physiologie et la classification de ces animaux*. Librairie encyclopédique de roret, Paris
- Ehrenberg CG (1838) *Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen*. Voss, Leipzig
- Fenchel T (2005) Cosmopolitan microbes and their ‘cryptic’ species. *Aquat Microb Ecol* **41**: 49–54
- Fenchel T, Finlay BJ (2006) The diversity of microbes: resurgence of the phenotype. *Phil Trans R Soc B* **361**: 1965–1973
- Finlay BJ, Fenchel T (2004) Cosmopolitan metapopulations of free-living microbial eukaryotes. *Protist* **155**: 237–244
- Foissner W (2006) Biogeography and dispersal of microorganisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozool* **45**: 111–136

- Foissner W** (2007) Dispersal and biogeography of protists: recent advances. *Jpn J Protozool* **40**: 1–16
- Haeckel EHPA** (1866) *Generelle Morphologie der Organismen*, vol. 2. Reimer, Berlin
- Hoef-Emden K** (2007) Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae) II: incongruences between the classical morphospecies concept and molecular phylogeny in smaller pyrenoid-less cells. *Phycologia* **46**: 402–428
- Hogg J** (1860) On the distinction of a plant and an animal, and on a fourth kingdom of nature. *The Edin New Phil J* **12**: 216–225
- Hughes AL, Piontkivska H** (2003) Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Mol Biol Evol* **20**: 644–652
- Karpov SA** (2000) Flagellate Phylogeny: an Ultrastructural Approach. In Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The Flagellates*. Taylor & Francis, London, pp 336–360
- Keeling P** (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *Am J Bot* **91**: 1481–1493
- Kent WS** (1880–81) *A Manual of the Infusoria*, Vols 1–3. David Bogue, London
- Koch TA, Ekelund F** (2005) Strains of the heterotrophic flagellate *Bodo designis* from different environments vary considerably with respect to salinity preference and SSU rRNA gene composition. *Protist* **156**: 97–112
- Kuylentierna M, Karlson B** (1994) Seasonality and composition of picoplanktonic and nanoplanktonic cyanobacteria and protists in the Skagerrak. *Bot Mar* **37**: 17–33
- Leadbeater BSC, McCready SMM** (2000) The Flagellates: Historical Perspectives. In Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The Flagellates*. Taylor & Francis, London, pp 1–26
- Linnaeus C** (1753) *Species plantarum*. Stockholm, Laurentii Salvii
- Linnaeus C** (1758) *Systema naturae*, 10th Ed. Stockholm, Laurentii Salvii
- Mallet J** (2007) Hybrid speciation. *Nature* **446**: 279–283
- Massana R, Terrado R, Forn I, Lovejoy C, Pedrós-Alió C** (2006) Distribution and abundance of uncultured heterotrophic flagellates in the world oceans. *Environ Microbiol* **8**: 1515–1522
- Mayr E** (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York
- Mignot J-P** (1977) Etude ultrastructurale d'un flagele du genre *Spumella* Cienk. (= *Heterochromonas* Pascher; = *Monas* O.F. Mueller), chrysomonadine leucoplastidiee. *Protistologica* **13**: 219–231
- Müller OF** (1773) *Vermium terrestrium et fluviatilium*. Haunia et Lipsiae
- Müller OF** (1786) *Animalcula infusoria fluviatilia et marina*. Hafnia
- Mullis KB** (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* **262**: 56–65
- Pascher A, Lemmermann E** (1914) *Die Süßwasserflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Band 1: Flagellatae. Gustav Fischer, Jena
- Patterson DJ** (2000) Changing Views of Protistan Systematics: The Taxonomy of Protozoa – an Overview. In Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds) *An Illustrated Guide to the Protozoa*, 2nd Ed, vol. 1, Allen Press, Lawrence, Kansas, pp 2–9
- Patterson DJ, Lee WJ** (2000) Geographic Distribution and Diversity of Free-Living Heterotrophic Flagellates. In Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The Flagellates: Unity, Diversity and Evolution*. Taylor & Francis, London, pp 269–287
- Perty M** (1852) *Zur Kenntniss kleinster Lebensformen nach Bau, Funktion, Systematik, mit Specialverzeichnis der in der Schweiz beobachteten*. Jent & Reinert, Bern
- Preisig HR** (1995) A Modern Concept of Chrysophyte Classification. In Sandgren CD, Smol JP, Kristiansen J (eds) *Chrysophyte Algae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 46–74
- Preisig HR, Hibberd DJ** (1982a) Ultrastructure and taxonomy of *Paraphysomonas* (Chrysophyceae) and related genera 1. *Nord J Bot* **2**: 397–420
- Preisig HR, Hibberd DJ** (1982b) Ultrastructure and taxonomy of *Paraphysomonas* (Chrysophyceae) and related genera 2. *Nord J Bot* **2**: 601–638
- Preisig HR, Hibberd DJ** (1983) Ultrastructure and taxonomy of *Paraphysomonas* (Chrysophyceae) and related genera 3. *Nord J Bot* **3**: 695–723
- Preisig HR, Vørs N, Hällfors G** (1991) Diversity of Heterotrophic Heterokont Flagellates. In Patterson DJ, Larsen J (eds) *The Biology of Free-Living Heterotrophic Flagellates*. Clarendon Press, Oxford, pp 361–400
- Pringsheim EG** (1963) *Farblose Algen*. Gustav Fischer, Jena
- Pritchard A** (1861) *A history of Infusoria, including the Desmidiaceae and Diatomaceae, British and foreign*. Whitaker & Co, London
- Pröschold T, Marin B, Schlösser UG, Melkonian M** (2001) Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist* **152**: 265–300
- Ray J** (1682) *Methodus plantarum nova*. Amsterdam
- Reynolds BD** (1934) Studies on monad flagellates. *Arch. Protistenkd* **81**: 400–411
- Scheckenbach F, Wylezich C, Mylnikov AP, Weitere M, Arndt H** (2006) Molecular comparisons of freshwater and marine isolates of the same morphospecies of heterotrophic flagellates. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6638–6643
- Scherffel A** (1924) Über die Cyste von *Monas*. *Arch. Protistenkd* **48**: 187–195
- Schierbeek A** (1960) De Leeuwenhoekbrief van 9 okt. 1676. Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabrik N.V. Delft

- Shen Y, Zhang Z, Gong X, Gu M, Shi Z, Wei Y** (1990) Modern Biomonitoring Techniques using Freshwater Microbiota. China Architecture and Building Press, Beijing
- Silva PC** (1960) Remarks on algal nomenclature. III. *Taxon* **9**: 18–25
- Šlapeta J, López-García P, Moreira D** (2006) Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. *Mol Biol Evol* **23**: 23–29
- Stanier RY, van Niel CB** (1962) The concept of a bacterium. *Arch Mikrobiol* **42**: 17–35
- Stein F Ritter von** (1878) Der Organismus der Infusionsthierie nach eigenen Forschungen in systematischer Reihenfolge bearbeitet. III. Abteilung. Die Naturgeschichte der Flagellaten oder Geisselinfusorien. I. Hälfte. Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig
- Tanichev AI** (1993) Morphology of the baikal chrysoomonads *Spumella termo* (Müller) (Hänel) and *S. gregaria* sp. n. (Protozoa, Chrysoomonadida). *Zool Zhurnal* **72**: 23–29
- von der Heyden S, Cavalier-Smith T** (2005) Culturing and environmental DNA sequencing uncover hidden kinetoplastid biodiversity and a major marine clade within ancestrally freshwater *Neobodo designis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 2605–2621
- von der Heyden S, Chao EE, Cavalier-Smith T** (2004) Genetic diversity of goniomonads: an ancient divergence between marine and freshwater species. *Eur J Phycol* **39**: 343–350
- von Gleichen WF, Freiherr** (1778) Abhandlung über die Saamen- und Infusionsthierchen, und über die Erzeugung. Winterschmidt, Nürnberg

Available online at www.sciencedirect.com



Differential thermal adaptation of clonal strains of a protist morphospecies originating from different climatic zones

Jens Boenigk,^{1*} Steffen Jost,² Thorsten Stoeck² and Tobias Garstecki^{3†}

¹Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria.

²School of Biology, TU Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger Straße 14, D-67663, Kaiserslautern, Germany.

³Natural Environment Research Council, British Antarctic Survey, High Cross, Madingley Road, Cambridge, CB3 0ET, UK.

Summary

Eco-physiological variation and local adaptation are key issues in microbial ecology. Here, we investigated the thermal adaptation of 19 strains of the same *Spumella* morphospecies (Chrysophyceae, Heterokonta). In order to test for local adaptation and the existence of specific ecotypes we analysed growth rates of these strains, which originated from different climate regions. We applied temperature-adaptation as an eco-physiological marker and analysed growth rates of the different *Spumella* strains at temperatures between 0°C and 35°C. The temperatures allowing for maximal growth of strains from temperate and warm climatic zones ranged between 19.9°C and 33.4°C. Phylogenetically, most of these 'warm'-adapted strains fall into two different previously defined 18S rDNA *Spumella* clusters, one of them consisting of mostly soil organisms and the other one being a freshwater cluster. As a rule, the 'warm'-adapted strains of the soil cluster grew slower than the 'warm'-adapted isolates within the freshwater cluster. This difference most probably reflect different strategies, i.e. the formation of cysts at the expense of lower growth rates in soil organisms. In contrast, as expected, all isolates from Antarctica were cold-adapted and grew already around melting

point of freshwater. Surprisingly, optimum temperature for these strains was between 11.8°C and 17.7°C and maximum temperature tolerated was between 14.6°C and 23.5°C. Our data indicate that despite the relatively high optimal temperature of most Antarctic strains, they may have a relative advantage below 5–10°C only. Based on the thermal adaptation of the flagellate strains the Antarctic strains were clearly separated from the other investigated strains. This may indicate a limited dispersal of flagellates to and from Antarctica. Even if the latter assumption needs support from more data, we argue that the high levels of eco-physiological and molecular microdiversity indicate that the current species concepts do not sufficiently reflect protist eco-physiological differentiation.

Introduction

In most protists the species definitions are still largely based on morphological characters, mostly external characters visible in the light or/and the electron microscope (morphospecies concept). Even though recent molecular studies provide increasing evidence for a high microdiversity and even polyphylie of many of these morphospecies (e.g. Boenigk *et al.*, 2005; von der Heyden and Cavalier-Smith, 2005; Koch and Ekelund, 2005) and thus increasingly question the appropriateness of this concept, the morphospecies still is the most widely used basic units in protist ecology. Current knowledge about the ecology of flagellate (morpho-)species is largely based on three approaches: first, field surveys of heterotrophic nanoflagellate (HNF) diversity (e.g. Arndt *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Weitere and Arndt, 2003); second, enclosure experiments based on morphologically defined taxonomic or functional groups (e.g. Jürgens *et al.*, 1994; Jürgens and Jeppensen, 2000; Garstecki and Wickham, 2001), and third, laboratory studies conducted with single species, mostly with monoclonal cultures (e.g. Eccleston-Parry and Leadbeater, 1994; Rothhaupt, 1996; Boenigk and Arndt, 2000; Pålsson and Daniel, 2004; Boenigk *et al.*, 2006a). With the morphospecies concept in mind, the former two approaches have led to the conclusion that protist species can be found in geographically distant

Received 5 October, 2006; accepted 5 October, 2006.
*For correspondence. E-mail jens.boenigk@oeaw.ac.at; Tel. (+43) 6232 312545; Fax (+43) 6232 3578. †Present address: Programme Coordinator, IUCN – The World Conservation Union, Programme Office for the Southern Caucasus, c/o Georgian Center for the Conservation of Wildlife, PO Box 56, Tbilisi 1060, Georgia.

habitats (Fenchel, 1993; Tong *et al.*, 1997; Butler, 1999; Finlay, 2002). Based on the seemingly ubiquitous distribution of many of these protist morphospecies and on the assumption that morphology also largely defines ecological function (Finlay, 1998), the latter approach (i.e. generalizations about the ecology of protist species based on laboratory studies conducted with single populations or clonal isolates) has become common practice in the field of protist eco-physiology and food-web ecology (e.g. Caron, 1990; Ekelund, 1996; Boenigk and Arndt, 2000; Sanders *et al.*, 2001).

As a consequence, current knowledge about the ecology of protists is, besides field surveys, largely based on generalizations from laboratory studies on a very few species; for these species only single populations or even clonal strains have been investigated. Within the chrysophytes (= chrysoomonads), for instance, the vast majority of controlled laboratory studies were conducted with *Potterioochromonas malhamensis* (type strain), *Ochromonas danica* (type strain), *Spumella* sp. (few different strains) and *Paraphysomonas vestita*. Considering the estimated number of chrysophyte species [sensu stricto at least 864 species following a conservative estimate (Kristiansen and Preisig, 2001)], only a miniscule fraction of chrysophyte diversity has been subjected to eco-physiological investigations. On top of this the ecology of the taxa under study is based on single or very few (clonal) cultures.

To date, generalizations of protist ecology become increasingly doubtful as, in addition to the low percentage of investigated morphospecies, molecular studies suggested that protist diversity exceeds the estimated morphospecies diversity for several orders of magnitude. First indications for such a high diversity were gained from cultivation-independent molecular SSU rRNA field surveys that yielded a higher-than-expected diversity (Diez *et al.*, 2001; Moreira and López-García, 2002; Stoeck *et al.*, 2003). This was confirmed later by the analysis of phylogenetic marker genes of cultivated strains that also indicated polyphyly in many morphologically defined taxa [for instance *Neobodo designis* (von der Heyden and Cavalier-Smith, 2005; Koch and Ekelund, 2005), *Ochromonas* sp. (Andersen *et al.*, 1999) and *Spumella* sp. (Boenigk *et al.*, 2005)]. Even within 18S sequence clades and between strains affiliated with the same 18S ribotype eco-physiological and molecular variation (i.e. microdiversity) is high (Boenigk *et al.*, 2004; Jost, 2006). These findings made general conclusions of protist ecology based on the study of few putatively representative strains even more questionable.

Eco-physiological investigations have given increasing evidence for a high functional diversity below the level of morphospecies (Boenigk *et al.*, 2005; 2006b; Koch and Ekelund, 2005; Lowe *et al.*, 2005). The investigated strains differed clearly with respect to habitat preferences,

for instance marine versus freshwater (*N. designis*: von der Heyden and Cavalier-Smith, 2005) or freshwater versus soil (*Spumella* sp.: Boenigk *et al.*, 2005). In a previous study we could demonstrate local adaptation and a certain geographic isolation in ecotypes of *Spumella* (Boenigk *et al.*, 2006b). Most of the so far investigated *Spumella* strains are affiliated with different subclusters of the Chrysophyceae *sensu stricto* and, most probably, are polyphyletic (Andersen *et al.*, 1999; Boenigk *et al.*, 2005; 2006b): The subcluster C1 comprises mostly soil isolates (mainly from temperate to warm habitats) whereas the subcluster C3 comprises exclusively freshwater isolates from temperate to warm habitats. The subcluster C2 comprises soil and freshwater isolates originating mainly from cold sites or early succession stages (Boenigk *et al.*, 2006b).

Thus far, however, eco-physiological and molecular variation within a morphospecies are rarely correlated. Here we investigate the temperature adaptation of 19 selected strains of *Spumella* to further support the hypothesis of local adaptation and to test for the suitability of molecular signatures as markers of eco-physiological traits.

Because a general correlation between thermal adaptation and environmental temperatures has been suggested for protists (Choi and Peters, 1992; Boenigk *et al.*, 2006b), we hypothesize that: (i) the optimum temperature and the maximum growth rate at optimal temperature increase with decreasing latitude of the sampling site; (ii) the slopes of growth rates versus temperature are lower for isolates from cold habitats; and (iii) eco-physiological adaptation reflects local adaptation of strains. Based on the hitherto lack of correlation between molecular data and growth rates of protists in former studies (Koch and Ekelund, 2005; Lowe *et al.*, 2005) we further hypothesize that (iv) the resolution of SSU rRNA gene sequences will not suffice to resolve eco-physiological variation. Thus, we expect that thermal adaptation eventually will render generalizations on the function of a given morphospecies in habitats other than the isolation site impossible. In order to test these hypotheses we investigated the temperature adaptation of strains affiliated with the *Spumella* morphotype.

Results

General pattern

Growth decreased below and above the optimal temperature and the change in growth rates was slower below than above the optimal temperature. Linear regression yielded in a T_{\min} between -3.49°C (Antarctic strain 376) and 6.26°C (strain JBNA45 from Hawaii), T_{\max} between 14.6°C (Antarctic strain 1031) and 38.4°C (strain JBC07

from China), a T_{opt} between 11.7°C (Antarctic strain 1031) and 33.4°C (strain JBAF32 from Africa), and a μ_{max} at T_{opt} between 1.03 day⁻¹ (Antarctic strain 1031) and 6.72 day⁻¹ (strain JBAF32 from Africa) (Table 1, Fig. 1A–C).

Below T_{opt} the growth rate increased with temperature by 0.04 °C⁻¹ (Antarctic strain 376) to 0.22 °C⁻¹ (strain JBAF32 from Africa). These slopes were significantly different between the isolates (ANOVA, $P < 0.001$) and were negatively correlated with the latitude of the sampling site (Pearson product moment, $r = -0.709$, $P = 0.001$). Likewise, T_{min} , T_{opt} , T_{max} and μ_{max} at T_{opt} were negatively correlated with the latitude of the sampling site (Pearson product moment, $r = -0.715$, $P = 0.001$; $r = -0.719$, $P = 0.001$; $r = -0.667$, $P = 0.003$; and $r = -0.805$, $P < 0.001$ for T_{min} , T_{opt} , T_{max} and μ_{max} at T_{opt} respectively).

The strain of *Cafeteria* showed a very similar thermal adaptation to strains of *Spumella* originating from a similar latitude. The strain grew between 1.6°C and 35.2°C with an optimum temperature of 30.1°C (Table 1). The maximal growth rate of the *Cafeteria* strain was low, but still in the range of growth rates as observed for *Spumella* (Fig. 1A–C).

Isolates from temperate and warm regions

For flagellate isolates from temperate to warm regions, the molecular affiliation based on SSU rRNA gene sequence data allowed to differentiate eco-physiologically different groups. Strains affiliated with the different clusters (see Boenigk *et al.*, 2005) differed significantly in growth characteristics (ANOVA: $P = 0.003$, $P < 0.001$ and $P = 0.014$ for T_{min} , T_{opt} and the slope of the regression line). Specifically, strains affiliated with cluster C3 showed generally higher growth rates as those affiliated with cluster C1 (Fig. 1A–C).

Antarctic isolates

Irrespective of the molecular affiliation, all the Antarctic strains showed a similar pattern, i.e. they were psychrophilic with T_{min} between -3.5°C and 1.2°C, T_{max} between 14.6°C and 23.5°C, T_{opt} between 11.7°C and 17.7°C and μ_{max} at T_{opt} between 1.03 day⁻¹ and 1.93 day⁻¹. Most of the Antarctic strains grew at the lowest temperature tested (0.7°C) and interpolation showed that they also would grow at freezing point (Table 1). Accordingly, the Antarctic isolates were clearly separated from strains of temperate to warm regions based on their eco-physiological characteristics (cluster analysis, Fig. 2). All these parameters were significantly lower as compared with strains from temperate to warm regions. Maximal growth rates of the Antarctic flagellates exceeded those of the other isolates tested only for temperatures below 5–10°C. The regression analysis supports high relative maximal growth rates

Table 1. Origin of strains, GenBank sequence accession number and key variables of their thermal adaptation.

Isolate	Accession number	Place of origin	Latitude/longitude	Mean ambient monthly air temperature (°C)	T_{max} (°C)	T_{min} (°C)	T_{opt} (°C)	μ at T_{opt} (day ⁻¹)	μ at 0°C (day ⁻¹)	Slope (μ °C ⁻¹)
JBAF32	AY651076	Uganda, freshwater	0°37'N/30°16'E	20.7	36.1	2.6	33.4	6.72	-0.63	0.22
JBNA45	DQ388541	Hawaii, freshwater	19°33'N/154°53'W	22.3	31.3	6.3	26.7	4.31	-1.30	0.21
JBC07	AY651097	China, Taihu, freshwater	31°30'N/120°20'E	11.1	38.4	2.1	33.0	5.31	-0.31	0.17
JBC/S24	AY651082	China, Shanghai, soil	31°6'N/121°22'E	13.9	31.2	1.0	27.3	3.44	0.16	0.12
JBC/S23	AY651081	China, Badaling, soil	40°20'N/115°58'E	0.6	29.1	3.2	24.9	3.10	-0.39	0.14
JBNZ41	AY651075	New Zealand, Aviemore, freshwater	44°40'S/170°22'E	13.8	36.8	1.3	32.3	5.52	-0.30	0.18
JBNZ39 ^a	AY651088	New Zealand, Karangarua, freshwater	43°37'S/169°46'E	8.0	36.7	2.1	32.7	4.59	-0.31	0.15
JBM10	AY651074	Austria, Mondsee, freshwater	47°52'N/13°20'E	9.2	36.7	2.2	34.3	5.73	-0.45	0.18
JBM/S12	AY651085	Austria, Mondsee, soil	47°52'N/13°20'E	9.2	38.2	3.1	32.9	4.18	-0.43	0.14
JBM08	AY651098	Austria, Mondsee, freshwater	47°52'N/13°20'E	9.2	-	-	-	-	-	-
JBM18	AY651092	Austria, St Gilgen, freshwater	47°47'N/13°23'E	2.8	25.8	3.5	19.9	2.22	-0.17	0.12
JBL14	AY651086	Austria, Lunz, freshwater	47°51'N/15°3'E	5.3	33.8	1.6	20.7	3.61	-0.02	0.16
Got20	EF027354	Baltic Sea, Gotland Basin, marine	57°18'N/19°0'E	5.9 ^b	33.8	1.2	30.1	2.80	0.09	0.09
1031	DQ388563	Antarctica, Signy Island, freshwater	60°42'S/45°36'W	1.0	14.6	-1.5	11.8	1.03	0.32	0.06
1006	DQ388558	Antarctica, Signy Island, soil	60°42'S/45°36'W	0.3	19.8	1.2	17.7	1.55	0.13	0.08
194f	DQ388551	Antarctica, Alexander Island, freshwater	71°00'S/68°00'W	0.6	23.5	-0.7	16.4	1.67	0.19	0.09
391f	DQ388557	Antarctica, Davis Valley, freshwater	82°27'S/51°21'W	-2.6	20.6	-1.1	13.2	1.93	-0.19	0.16
376hm	DQ388553	Antarctica, Davis Valley, freshwater	82°28'S/50°56'W	-3.3	22.1	-3.5	17.7	1.15	0.44	0.04
199hm	DQ388552	Antarctica, Davis Valley, freshwater	82°28'S/50°56'W	-3.3	22.3	0.9	16.2	1.75	0.13	0.10
Got180 (<i>Cafeteria</i>)	EF027355	Baltic Sea, Gotland Basin, marine	57°18'N/19°0'E	5.9 ^b	35.2	1.6	30.1	3.54	-0.07	0.12

a. This strain showed high growth rates at 35°C but high mortality at 37.5°C, i.e. the strain did not grow at the latter temperature. Therefore the mean of these temperatures was assumed as T_{max} .
b. As the ambient air temperature is little meaningful for deep-sea organisms, we provide the actual water temperature at the respective depth for these strains.

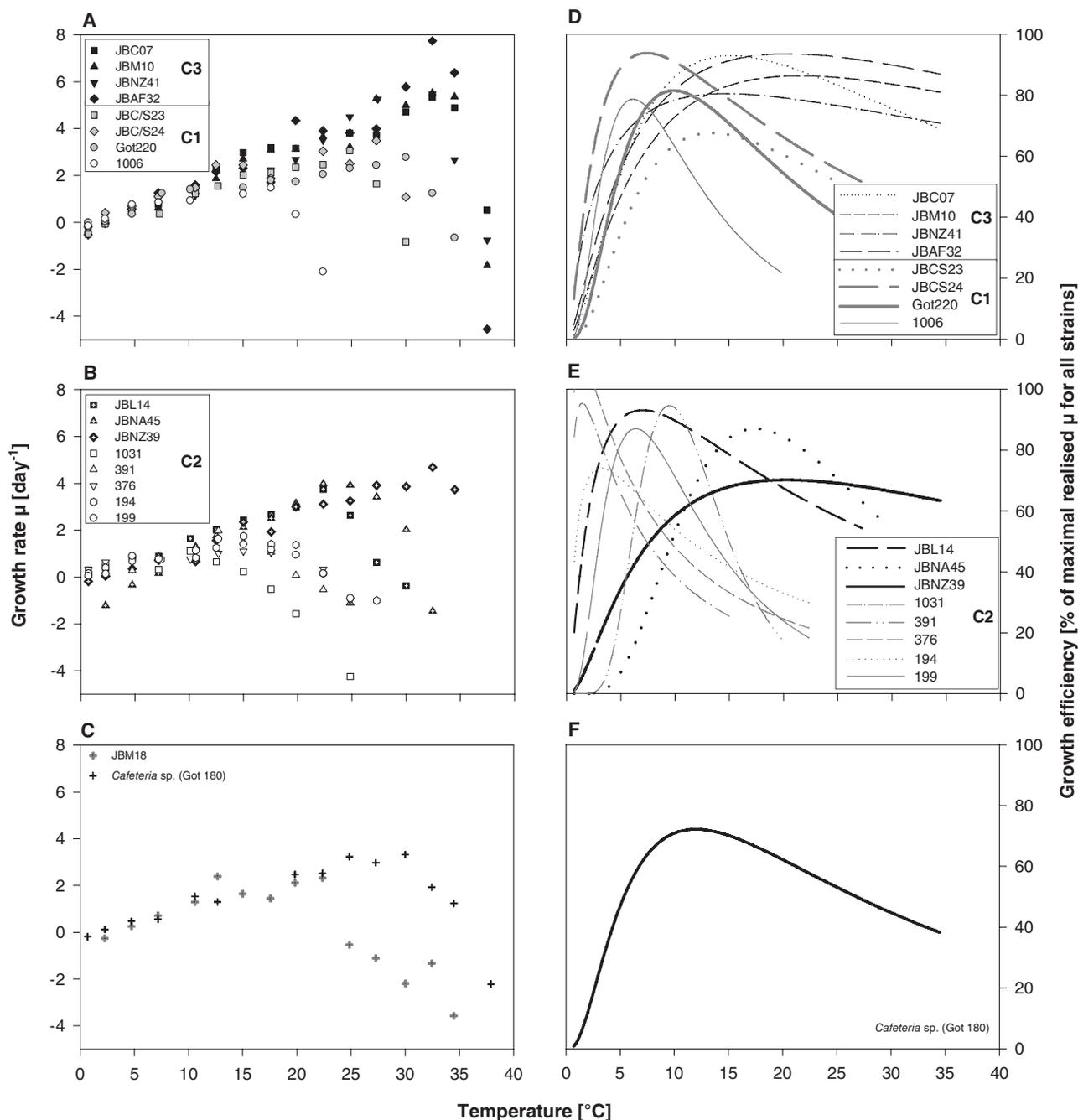


Fig. 1. Absolute and relative growth rates.

A–C. Growth rates of the investigated strains as a function of temperature.

D–F. Relative growth rates of the strains tested. The regression lines indicate optimum conditions with respect to relative growth. Relative optimum growth conditions as inferred from these figures differ considerably from the absolute optimum growth conditions, i.e. the Antarctic strains have optimum relative growth conditions at temperatures below 5–10°C. As the relative growth rates depicted are regression lines they may occasionally exceed the theoretical maximum value of 100%.

for Antarctic strains below 5–10°C and high relative maximal growth rates at warm temperatures for C3 isolates (Figs 1D, E and 3). The C1 isolates show generally low maximal growth rates but perform best at temperatures around 10°C.

Discussion

The thermal adaptations of the investigated strains covered the whole range of published growth rates for colourless chrysophytes (Fig. 4). Thermal adaptation was

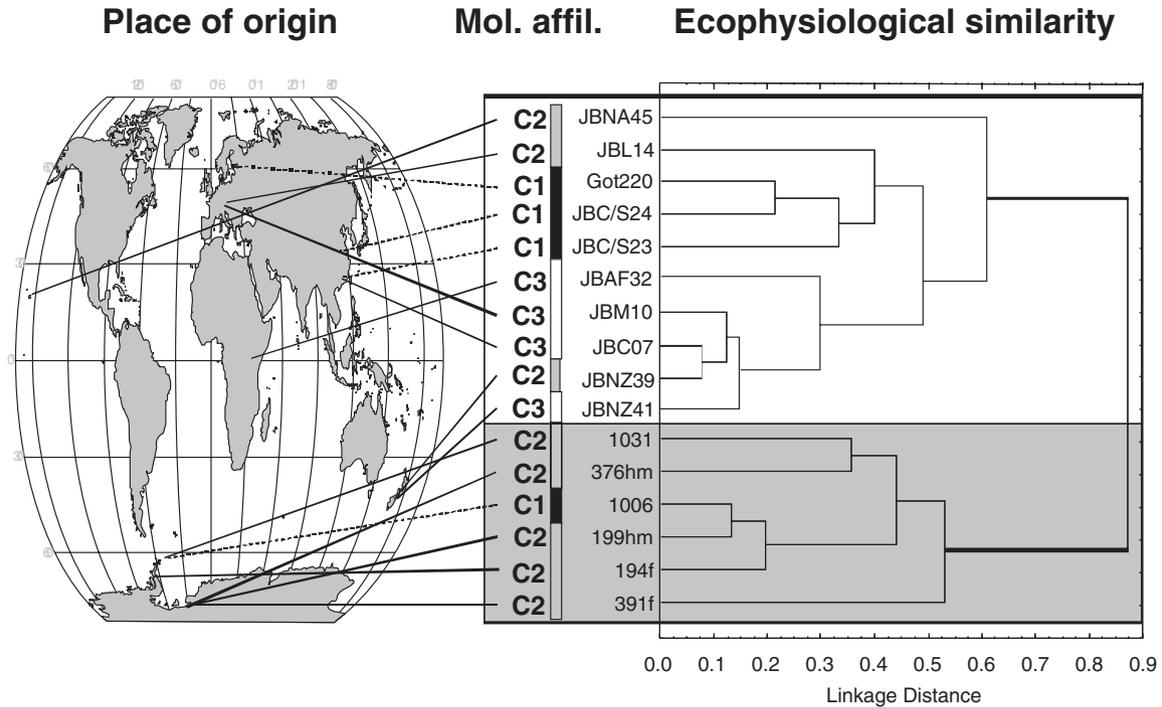


Fig. 2. Eco-physiological similarity. The cluster analysis was based on key variables of the thermal adaptation of strains (see text for explanation) and it is depicted in connection with the molecular affiliation of strains and their place of origin. Eco-physiology is most distinct between Antarctica and temperate to warm sites. Within the temperate to warm sites isolates affiliated with the C1 and C3 cluster are separated based on their eco-physiological adaptation. The freshwater isolates are connected to their place of origin by a straight line, soil and marine isolates by a dashed line.

mainly related to the geographic origin of the strains. The direct relationship of protozoan growth rates to temperature has been repeatedly documented (Sherr *et al.*, 1983; Caron *et al.*, 1986; Choi and Peters, 1992). It is, however, controversial whether the increase of growth rate with temperature is exponential or linear (Montagnes and Franklin, 2001). An exponential or Q10 concept may be a

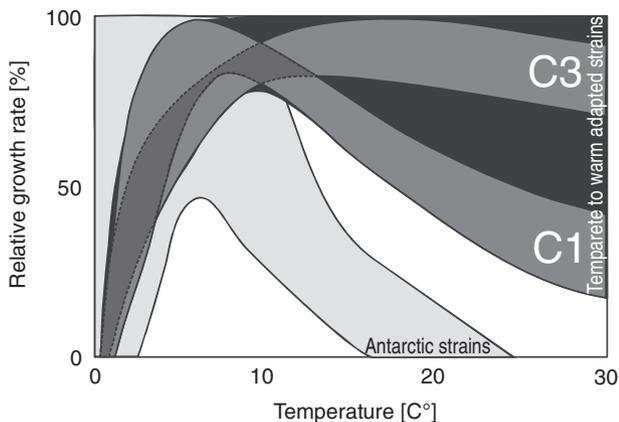


Fig. 3. Relative maximal growth of strains originating from Antarctic (light grey area) and from temperate to warm regions (black and dark grey area). The dark grey area indicates the relative growth of strains from temperate to warm regions affiliated with the C1 and C3 cluster respectively.

good approximation for certain processes such as photosynthesis or ingestion rate (Berges *et al.*, 2002). The dependence of growth rates on temperature is, however, more complex as it reflects an integration of several processes, which become limiting at different temperatures. Therefore the Q10 concept may be inadequate (Montagnes and Franklin, 2001; Berges *et al.*, 2002; Clarke and Fraser, 2004). Usually, such complex temperature dependencies cannot be distinguished from linear relationships in experimental studies. In sum, even though the temperature response probably is due to several interfering exponential functions, the linear model may be a close approximation of the net result (cf. Montagnes and Franklin, 2001).

One of the strains tested, i.e. strain JBM08, did not grow with the food bacteria provided. Similarly, this food source turned out to be suboptimal for the strain JBM18 as this strain did not grow in several subsets during pre-cultivation (data not shown). Preliminary tests with other food bacteria provided evidence that *Listonella pelagia* was probably too large as prey organism. We infer that the relatively low growth rate of strain JBM18 at temperatures exceeding 22.5°C is caused by this basic problem. The size relation between predator and prey may indeed be a more pronounced problem at higher temperatures as the food bacterium had a similar size in all experiments

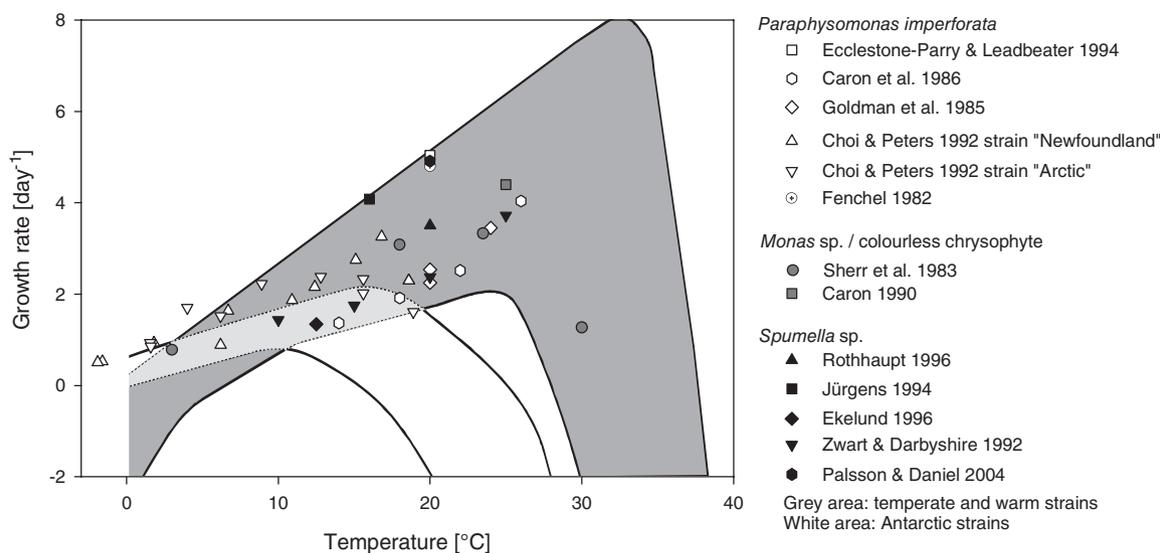


Fig. 4. Thermal adaptation of colourless chrysophytes. Literature data on *Paraphysomonas* (white), *Spumella* (black) and colourless chrysophytes of unclear affiliation (grey) are shown [either growth rates at (near) satiating food conditions or μ_{\max} as calculated from numerical response data]. The grey shading indicates the spectrum of thermal adaptation of strains originating from temperate to warm sites in this study, the white area indicates the thermal adaptation of Antarctic strains tested in this study.

(J. Boenigk and S. Jost, unpubl. data) but the flagellate must be assumed to be smaller at higher temperatures, according to general temperature–cell size relations (Atkinson, 1994; Atkinson, 1995; Montagnes and Franklin, 2001). We did not use a different bacterium for these flagellate strains in order to yield a comparable data set but these strains were excluded from the comparative analysis as the observed growth rates are likely to be related to food suitability rather than temperature.

Intraspecific differentiation

Molecular affiliation with respect to the SSU rRNA gene indicates eco-physiological differentiation as long as Antarctic isolates are excluded from the analysis. Even though the temperature range yielding positive growth rates was similar, isolates affiliated with the C1 cluster (Boenigk *et al.*, 2005) generally grew slower than isolates affiliated with the C3 cluster. The isolates within the C1 cluster were mainly isolates from soil samples and most of these isolates produced cysts in cultures initially. The difference in observed growth rates may therefore reflect different survival strategies: production of cysts at the expense of lower growth rates for those flagellates, which live in a relatively unstable environment (soil) versus high growth rates but no or low encystment rates for those flagellates living in a more stable environment (freshwater). However, irrespective of encystment pattern, the observed lower growth rates of terrestrial than aquatic strains is in accordance with generally higher carbon conversion efficiency and mass-specific growth rates of

aquatic organisms than terrestrial organisms (Elser *et al.*, 2000; Shurin *et al.*, 2006).

The above correlations were, however, only detectable on a regional scale as (bio-)geographic pattern overlaid the differentiation between phylogenetic clades: all Antarctic isolates were psychrophilic with optimum temperatures around or below 15°C. The Antarctic strains further showed relatively high growth rates at 0°C whereas most strains from other sites seized to grow below 1.5–6°C. Thus, the Antarctic strains can already grow at the melting point of freshwater. Overall, the Antarctic strains performed better below 5–10°C than strains from warmer habitats. Even though maximal growth rates of the Antarctic strains increased with temperature up to between 11°C and 17°C, strains originating from temperate to warm habitats showed generally higher growth rates at temperatures above 5–10°C. This indicates that although the Antarctic strains can successfully grow at temperatures typical of many temperate lakes they may only successfully compete in cold environments. Correspondingly, a competitive advantage up to c. 15°C has been suggested for psychrophilic *Paraphysomonas* strains (Choi and Peters, 1992).

It is currently an open question to what extent these patterns of regional eco-physiological adaptation reflect a biogeographic separation. Eco-physiological local adaptation may be a much faster process than detectable changes in the SSU rRNA gene – this may explain for the general cold adaptation of the Antarctic isolates irrespective of the molecular affiliation. However, the study of Boenigk and colleagues (2006b) indicates that geo-

graphic isolation may support the development of pronounced eco-physiological differences (and thus possibly support a biogeographic differentiation). Accordingly, a number of cultivation-independent molecular surveys indicate a certain isolation of Antarctica (Vincent, 2000; Taton *et al.*, 2003; Lawley *et al.*, 2004), notwithstanding the possibility that future surveys might find related sequences from geographically distant sites. However, strains and samples originating from other cold environments need to be analysed in future studies and molecular markers allowing for a higher phylogenetic resolution may prove necessary to entirely resolve the question of biogeographic restriction in protists.

Inferring the ecology of protist species from studies on single populations or strains

The different studies on molecular and eco-physiological variation of protist morphospecies (Boenigk *et al.*, 2005; 2006b; Koch and Ekelund, 2005; Lowe *et al.*, 2005; this study) imply that generalizations on protist ecology can only be made on the basis of several investigated populations/strains and that these generalizations probably only hold true for habitats corresponding to the places of origin of the respective strains. Generalizations beyond these limits may be possible but must be assumed to be highly speculative and should therefore be regarded with care. Specifically, the optimum conditions as inferred from laboratory studies may strongly deviate from the realized niche. For instance, the thermal adaptation of the Antarctic strains would indicate optimal growth conditions similar to those found in temperate lakes (Fig. 1A–C). However, in these lakes they most likely would be outcompeted by strains adapted to higher temperatures (Fig. 1D and E). This highlights the importance of comparative studies to infer the ecology of protist species in laboratory experiments.

Conclusions

The following trends may be inferred from our data: (i) the optimum temperatures increase with decreasing ambient air temperature (and more generally with latitude) of the collection sites; (ii) the maximum growth rates at optimal temperature also increase with ambient air temperature/decreasing latitude; and (iii) the growth rates decrease more slowly with decreasing temperature for isolates from cold sites – thus isolates from cold waters grow faster below a certain temperature (cf. Choi and Peters, 1992). In general, the temperature yielding at maximal growth is misleading, particularly for cold-adapted strains: these strains showed the highest relative growth below 5–10°C whereas optimum growth conditions were between 10°C and 20°C. Soil strains showed generally lower growth

rates as compared with aquatic strains. Whether the high relative growth rates of soil strains at temperatures around 10°C are typical for these flagellates or rather an artefact due to undersampling of flagellate taxa well-adapted to temperatures around 10°C remains open for future studies.

In conclusion, SSU rRNA gene sequence data are capable of a higher resolving of eco-physiologically distinct protist groups than morphospecies. However, also in phylogenetically resolved clades the eco-physiological variation between the isolates remained high and differentiation between phylogenetic clusters is overlaid by geographic pattern.

Experimental procedures

Origin of strains and culture conditions

Eighteen flagellate strains affiliated with the *Spumella* morphotype (Boenigk *et al.*, 2006b) were selected for in-depth investigation. Based on light and electron microscopical investigations these strains belong to the same morphospecies (data not shown; cf. Boenigk *et al.*, 2004). Because of the current confusion regarding the classification of 'Spumella-like' flagellates we abstain from affiliating a more or less meaningless binomen but refer to these flagellates as *Spumella* sp. furtheron. The selection comprised flagellates affiliated with different SSU rRNA gene sequence clades as defined earlier (C1, C2, C3 and E; cf. Boenigk *et al.*, 2005; 2006b). Further selection criteria were the place of origin (strains from distant sampling sites), different habitat types (soil, freshwater, marine) and different temperature tolerances (Boenigk *et al.*, 2006b). We also included a *Cafeteria* sp. strain, which was isolated from the same sampling site as the marine *Spumella* strain used in this study. This should help to evaluate if eco-physiological characters may differ between similar HNF types originating from a highly similar environment. In a former study we found the mean ambient air temperature during the month of isolation to be the most suitable approximation to predict temperature adaptation (cf. Boenigk *et al.*, 2006b). This environmental temperature was estimated as outlined by Boenigk and colleagues (2006b) and the data are provided in Table 1. Only for the strains Got180 and Got220 we used the measured environmental temperatures as the ambient air temperature seems less suitable for marine waters at 180 m and 220 m depth.

We used NSY inorganic basal medium for cultivation of freshwater and soil strains (Hahn *et al.*, 2003). The marine strains were cultivated in Schmaltz–Pratt medium (0.01 g l⁻¹ K₂HPO₄·3H₂O, 0.1 g l⁻¹ KNO₃, 1.45 g l⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 6.92 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 5.51 g l⁻¹ MgCl₂·6H₂O, 0.67 g l⁻¹ KCl and 28.15 g l⁻¹ NaCl). The gammaproteobacterium *L. pelagia* strain CB5 (GenBank synonym *Vibrio pelagius*) originating from Lake Constance (Hahn and Höfle, 1998) was supplied as food source. Cell volume of this large bacterium was 0.38 ± 0.2 µm³. In former studies the bacterium proved to be a good prey organism that supports a high flagellate growth rate (Boenigk *et al.*, 2004; 2006a). The bacteria were grown in NSY medium (3 g organic matter per litre; Hahn *et al.*,

2003) prior to the experiments. During permanent culture the flagellate strains were held on a mixed bacterial community on a wheat grain at 16°C but transferred to fresh medium supplemented with *L. pelagia* 1 week before the experiments started.

Growth of *Spumella* at different temperature

The flagellates were characterized with regard to their thermal adaptation. During permanent culture, all strains were acclimatized to the same conditions, i.e. NSY inorganic basal medium at 16°C and pH 7.8, for at least 3 months. Prior to the experiments the strains were acclimatized to the respective temperature in steps of 2.5°C for at least 3 days at each temperature and eventually transferred to the experimental temperatures 24 h before the start of the experiment. This general set-up was followed for all temperature conditions at which the flagellates showed growth or low mortality rates (below 0.5–1 day⁻¹). For temperature treatments at which the flagellates died at high rates the respective strains were precultured at lower/higher temperatures and transferred to the experimental temperature only 12 h prior to the experiments in order to prevent complete extinction during precultivation. *Listonella pelagia* CB5 served as a food source at near satiating concentrations (above 1–2 × 10⁶ bacteria per millilitre) during acclimatization. Cultures of the strain JBM08 were supplemented with a wheat grain as it does not grow on *L. pelagia* alone.

Total flagellate abundance at the start of the experiment was around 1000 flagellates per millilitre. Bacterial abundance was adjusted to values representing satiating food concentrations, i.e. 2–3 × 10⁷ bacteria per millilitre [preliminary experiments proved that an abundance of above 2 × 10⁶ *L. pelagia* per millilitre produced a (near) maximal growth rate]. All experiments were run in triplicate in 50 ml Erlenmeyer flasks. Initial experimental volume was 30 ml and experiments were run in continuous light. We tested the temperature tolerance between 0.7°C and 37.5°C in steps of approximately 2.5°C. Subsamples of 5 ml were fixed with 100 µl of Lugol solution every 3–8 h, depending on the temperature treatment, for a total of five subsamplings. Flagellates were counted in Lugol-fixed samples using Sedgewick-Rafter and a ZEISS Axiovert 200 at 200× total magnification and phase contrast. At least 100 flagellates were counted per sample except for some samples with extremely low flagellate abundances (high mortality treatments). Cell densities were ln-transformed and the growth rates were calculated by regressing the linear section of the ln-transformed densities versus time assuming exponential growth.

Non-linear regression and statistics

For the calculation of the optimal temperature (T_{opt}) we applied linear regression separately for growth rates below and higher than the highest growth rate observed and calculated T_{opt} from the intersection of both regression lines. Even though a linear model may not reflect the actual biological processes, it was found to be a suitable approximation to describe the data (see *Discussion*). The maximal tempera-

ture (T_{max}), i.e. $\mu = 0$, was calculated as the intersection of the latter regression with the abscissa; the minimal temperature (T_{min}), i.e. $\mu = 0$, was calculated in a similar way but regression in this case was restricted to the four data points closest to the intersect. If growth was also positive at the lowest temperature tested we used only three data points for regression analysis.

For comparison of the eco-physiological characteristics we performed a cluster analysis based on key variables characterizing the thermal adaptation of strains. As the food bacteria were suboptimal for the flagellate strains JBM08 and JBM18 and the growth rate estimates for these strains therefore probably biased, they were excluded from this analysis. For cluster analysis, we used the variables T_{min} , T_{opt} and the slope of the regression line. Prior to the calculation of the Euclidian distances via UPGMA [unweighted pair-group option, Sneath and Sokal (1973)] using the program package Statistica, all variables were normalized to values between 0 and 1. T_{max} and μ_{max} were excluded from these analyses as the variation of T_{max} was largely similar to that of T_{opt} , and μ_{max} is a function of T_{min} and the slope.

For comparison of the relative maximal growth rates of different strains we recalculated growth rates as relative fraction of the maximal realized growth rate in any strain tested and performed a log-normal regression analysis using the software package SigmaPlot. This analysis gives an estimate of the optimal temperature in terms of competitive strength. Again, the strains JBM08 and JBM18 were excluded for reasons mentioned earlier. Regression analysis, ANOVA, *t*-tests and descriptive statistics were carried out using the software package SigmaStat.

Acknowledgements

This work was funded by the Austrian Science Fund Project FWF P18767, by the Natural Environmental Research Council through the B. A. S. Terrestrial and Freshwater Biodiversity Programme and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant STO414/2-3). We are also grateful for financial support of the Nachwuchs-Förderungsgesellschaft of the German Society of Protozoology.

References

- Andersen, R.A., van de Peer, Y., Potter, D., Sexton, J.P., Kawachi, M., and LaJeunesse, T. (1999) Phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the chrysophyceae. *Protist* **150**: 71–84.
- Arndt, H., Dietrich, D., Auer, B., Cleven, E.J., Gräfenhan, T., Weitere, M., and Mylnikov, A.P. (2000) Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems. In *The Flagellates*. Leadbeater, B.S.C., and Green, J.C. (eds). London, UK: Taylor and Francis, pp. 240–268.
- Atkinson, D. (1994) Temperature and organism size – a biological law for ectotherms? *Adv Ecol Res* **25**: 1–54.
- Atkinson, D. (1995) Effects of temperature on the size of aquatic ectotherms: exceptions to the general rule. *J Therm Biol* **20**: 61–74.
- Berges, J.A., Varela, D.E., and Harrison, P.J. (2002) Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitro-

- gen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Mar Ecol Prog Ser* **225**: 139–146.
- Boenigk, J., and Arndt, H. (2000) Particle handling during interception feeding by four species of heterotrophic nanoflagellates. *J Euk Mic* **47**: 350–358.
- Boenigk, J., Stadler, P., Wiedroither, A., and Hahn, M.W. (2004) Strain-specific differences in the grazing sensitivity of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5787–5793.
- Boenigk, J., Pfandl, K., Stadler, P., and Chatzinotas, A. (2005) High diversity of the 'Spumella-like' flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environ Microbiol* **7**: 685–697.
- Boenigk, J., Pfandl, K., and Hansen, P.J. (2006a) Survival strategies for flagellates living in a 'wet desert'. *Aquat Microb Ecol* **44**: 71–83.
- Boenigk, J., Pfandl, K., Garstecki, T., Harms, H., Novarino, G., and Chatzinotas, A. (2006b) Evidence for geographic isolation and signs of endemism within a protist morphospecies. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5159–5164.
- Butler, H.G. (1999) Seasonal dynamics of the planktonic microbial community in a maritime antarctic lake undergoing eutrophication. *J Plankton Res* **21**: 2393–2419.
- Caron, D.A. (1990) Growth of two species of bacterivorous nanoflagellates in batch and continuous culture, and implications for their planktonic existence. *Oecologia* **4**: 143–159.
- Caron, D.A., Goldman, J.C., and Dennett, M.R. (1986) Effect of temperature on growth, respiration, and nutrient regeneration by an omnivorous microflagellate. *Appl Environ Microbiol* **52**: 1340–1347.
- Choi, J.W., and Peters, F. (1992) Effects of temperature on two psychrophilic ecotypes of a heterotrophic nanoflagellate, *Paraphysomonas imperforata*. *Appl Environ Microbiol* **58**: 593–599.
- Clarke, A., and Fraser, K.P.P. (2004) Why does metabolism scale with temperature? *Funct Ecol* **18**: 243–251.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., and Massana, R. (2001) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2932–2941.
- Eccleston-Parry, J.D., and Leadbeater, B.S.C. (1994) A comparison of the growth kinetics of 6 marine heterotrophic nanoflagellates fed with one bacterial species. *Mar Ecol Prog Ser* **105**: 167–177.
- Ekelund, F. (1996) Growth kinetics of five common heterotrophic soil flagellates. *Eur J Soil Biol* **32**: 15–24.
- Elser, J.J., Fagan, W.F., Denno, R.F., Dobberfuhl, D.R., Folarin, A., Huberty, A., et al. (2000) Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature* **408**: 578–580.
- Fenchel, T. (1982) Ecology of heterotrophic microflagellates. II. Bioenergetics and growth. *Mar Ecol Prog Ser* **8**: 225–231.
- Fenchel, T. (1993) There are more small than large species? *Oikos* **68**: 375–378.
- Finlay, B.J. (1998) The global diversity of protozoa and other small species. *Int J Parasitol* **28**: 29–48.
- Finlay, B.J. (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**: 1061–1063.
- Garstecki, T., and Wickham, S.A. (2001) Effects of resuspension and mixing on population dynamics and trophic interactions in a model benthic microbial food web. *Aquat Microb Ecol* **25**: 281–292.
- Goldman, J.G., Caron, D.A., Andersen, O.K., and Dennett, M.R. (1985) Nutrient cycling in a microflagellate food chain: I. Nitrogen dynamics. *Mar Ecol Prog Ser* **24**: 231–242.
- Hahn, M.W., and Höfle, M.G. (1998) Grazing pressure by a bacterivorous flagellate reverses the relative abundance of *Comamonas acidovorans* PX54 and *Vibrio* strain CB5 in chemostat cocult. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1910–1918.
- Hahn, M.W., Lunsdorf, H., Wu, Q.L., Schauer, M., Hofle, M.G., Boenigk, J., and Stadler, P. (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1442–1451.
- von der Heyden, S., and Cavalier-Smith, T. (2005) Culturing and environmental DNA sequencing uncover hidden kinetoplastid biodiversity and a major marine clade within ancestrally freshwater *Neobodo designis*. *Int J Sys Evol Microbiol* **55**: 2605–2621.
- Jost, S. (2006) Ökophysiologische und molekulare Charakterisierung heterotropher Nanoflagellaten des *Spumella*-Morphotyps. Thesis. Kaiserslautern, Germany: TU Kaiserslautern.
- Jürgens, K. (1994) Die Bedeutung heterotropher Nanoflagellaten als Bakterienkonsumenten sowie deren Regulation durch Prädation und Ressourcen. PhD Thesis. Kiel, Germany: Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Jürgens, K., and Jeppensen, E. (2000) The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake. *J Plankton Res* **22**: 1047–1070.
- Jürgens, K., Arndt, H., and Rothaupt, K.O. (1994) Zooplankton-mediated changes of bacterial community structure. *Microb Ecol* **27**: 27–42.
- Koch, T.A., and Ekelund, F. (2005) Strains of the heterotrophic flagellate *Bodo designis* from different environments vary considerably with respect to salinity preference and SSU rRNA gene composition. *Protist* **156**: 97–112.
- Kristiansen, J., and Preisig, H.R. (2001) *Encyclopedia of Chrysophyte Genera*. Berlin, Germany: J. Cramer.
- Lawley, B., Ripley, S., Bridge, P., and Convey, P. (2004) Molecular analysis of geographic patterns of eukaryotic diversity in antarctic soils. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5963–5972.
- Lee, W.J., Brandt, S.M., Vors, N., and Patterson, D.J. (2003) Darwin's heterotrophic flagellates. *Ophelia* **57**: 63–98.
- Lowe, C.D., Day, A., Kemp, S.J., and Montagnes, D.J.S. (2005) There are high levels of functional and genetic diversity in *Oxyrrhis marina*. *J Eukaryot Microbiol* **52**: 250–257.
- Montagnes, D.J.S., and Franklin, D.J. (2001) Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: reconsidering some paradigms. *Limnol Oceanogr* **46**: 2008–2018.
- Moreira, D., and López-García, P. (2002) The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends Microbiol* **10**: 31–38.

- Pålsson, C., and Daniel, C. (2004) Effects of prey abundance and light intensity on nutrition of a mixotrophic flagellate and its competitive relationship with an obligate heterotroph. *Aquat Microb Ecol* **36**: 247–256.
- Rothhaupt, K.O. (1996) Laboratory experiments with a mixotrophic chrysophyte and obligately phagotrophic and phototrophic competitors. *Ecology* **77**: 716–724.
- Sanders, R.W., Caron, D.A., Davidson, J.M., Dennett, M.R., and Moran, D.M. (2001) Nutrient acquisition and population growth of a mixotrophic alga in axenic and bacterized cultures. *Microb Ecol* **42**: 513–523.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B., and Berman, T. (1983) Grazing, growth, and ammonium excretion rates of a heterotrophic microflagellate fed with four species of bacteria. *Appl Environ Microbiol* **45**: 1196–1201.
- Shurin, J.B., Gruner, D.S., and Hillebrand, H. (2006) All wet or dried up? Real differences between aquatic and terrestrial food webs. *Proc: Royal Soc B* **273**: 1–9.
- Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy*. San Francisco, CA, USA: Freeman.
- Stoeck, T., Taylor, G.T., and Epstein, S.S. (2003) Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea). *Appl Environ Microbiol* **69**: 5656–5663.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R., and Wilmotte, A. (2003) Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5157–5169.
- Tong, S., Vors, N., and Patterson, D.J. (1997) Heterotrophic flagellates, centrohelid heliozoa and filose amoebae from marine and freshwater sites in the Antarctic. *Polar Biol* **18**: 91–106.
- Vincent, W.F. (2000) Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Sci* **12**: 374–385.
- Weitere, M., and Arndt, H. (2003) Structure of the heterotrophic flagellate community in the water column of the river Rhine (Germany). *Eur J Protistol* **39**: 287–300.
- Zwart, K.B., and Darbyshire, J.F. (1992) Growth and nitrogenous excretion of a common soil flagellate *Spumella* sp. – a laboratory experiment. *J Soil Sci* **43**: 145–157.

Evidence for Geographic Isolation and Signs of Endemism within a Protistan Morphospecies†

Jens Boenigk,^{1*} Karin Pfandl,¹ Tobias Garstecki,^{2‡} Hauke Harms,⁴
Gianfranco Novarino,³ and Antonis Chatzinotas⁴

*Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestr. 9, A-5310 Mondsee, Austria*¹; *Natural Environment Research Council, British Antarctic Survey, High Cross, Madingley Road, Cambridge CB3 0ET, United Kingdom*²; *The Natural History Museum, Department of Zoology, Protista and Mathematics Division, Cromwell Road, London SW7 5BD, United Kingdom*³; and *UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Department of Environmental Microbiology, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany*⁴

Received 14 March 2006/Accepted 8 May 2006

The possible existence of endemism among microorganisms resulting from and preserved by geographic isolation is one of the most controversial topics in microbial ecology. We isolated 31 strains of “*Spumella*-like” flagellates from remote sampling sites from all continents, including Antarctica. These and another 23 isolates from a former study were characterized morphologically and by small-subunit rRNA gene sequence analysis and tested for the maximum temperature tolerance. Only a minority of the *Spumella* morpho- and phylotypes from the geographically isolated Antarctic continent follow the worldwide trend of a linear correlation between ambient (air) temperature during strain isolation and heat tolerance of the isolates. A high percentage of the Antarctic isolates, but none of the isolates from locations on all other continents, were obligate psychrophilic, although some of the latter were isolated at low ambient temperatures. The drastic deviation of Antarctic representatives of *Spumella* from the global trend of temperature adaptation of this morphospecies provides strong evidence for geographic transport restriction of a microorganism; i.e., Antarctic protistan communities are less influenced by transport of protists to and from the Antarctic continent than by local adaptation, a subtle form of endemism.

One hot debate in microbial ecology deals with the geographic restriction of protistan taxa (8, 10–12, 22, 29). Some researchers believe that free-living protistan species are essentially ubiquitous and grow wherever suitable habitats exist. They assume that the microbial community found in any given habitat is a function of habitat properties only and not of historical factors, since there is an ubiquitous “seed bank.” They further argue that geographic barriers to protists do not exist and consequently cannot contribute to evolutionary diversification (10, 12–15).

The basic assumption that microorganisms are easily dispersed across the physical and geographic barriers that halt the migrations of larger animals and plants (12) is, however, controversial and relies largely on the observed ubiquity of morphospecies. It has been challenged by other researchers, who believe that protists have a biogeography that has been shaped by geographic barriers (8, 30). The discussion has initiated much recent research into the existence of endemic species (10, 16, 28, 38). However, even the definition of a species is controversial, and the low resolution of the morphospecies

concept for protists appears to be an obstacle to the settling of the debate (32).

Fortunately, increasing evidence for phylogenetic and eco-physiological differentiation below the morphospecies level (4, 21, 22, 26, 29, 38) can theoretically be used to solve the question of possible endemism among protists. If there were no geographic barriers to protists, correlations between the habitat temperature, as a factor selecting certain strains from the seed bank, and the temperature tolerance of these strains should be independent of the geographic location. To critically test the temperature adaptation of a flagellate morphospecies, we analyzed 54 strains for their phylogenetic relationship and maximum growth temperatures, the latter as a characteristic that is easily measurable and likely subject to evolutionary adaptation to local conditions. Particular attention was paid to isolates from the geographically most isolated sites, on the Antarctic continent.

MATERIALS AND METHODS

Media, isolation of strains, and cultivation conditions. The standard medium for the maintenance of strains and for the isolation process, except for the first step, was an artificial inorganic basal medium (NSY basal inorganic medium [18]). The ultramicrobacterial (<0.1- μm^3) strain MWH-NR1 (*Betaproteobacteria*; *Polynucleobacter* group) and the bacterial strain *Listonella pelagia* CB5 (both available from M. Hahn [17]), representatives of typical free-living aquatic bacteria, were used as food for isolating the flagellates.

Samples originating from terrestrial and aquatic habitats in polar, temperate, subtropical, and tropical regions (Fig. 1A and B) were collected. Samples were transported to the laboratory in sealed tubes and processed immediately upon arrival. All treatments after sampling were carried out under aseptic conditions. Flagellates were isolated by serial dilution using either sterile filtrated water from the sampling site or artificial media following an acclimatization approach (4). The flagellates were counted using a Sedgewick-Rafter chamber, and a sub-

* Corresponding author. Mailing address: Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestr. 9, A-5310 Mondsee, Austria. Phone: 43 6232 312545. Fax: 43 6232 3578. E-mail: jens.boenigk@oeaw.ac.at.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

‡ Present address: United Nations Environment Programme, World Conservation Monitoring Centre, 219 Huntington Road, Cambridge CB3 0DL, United Kingdom.

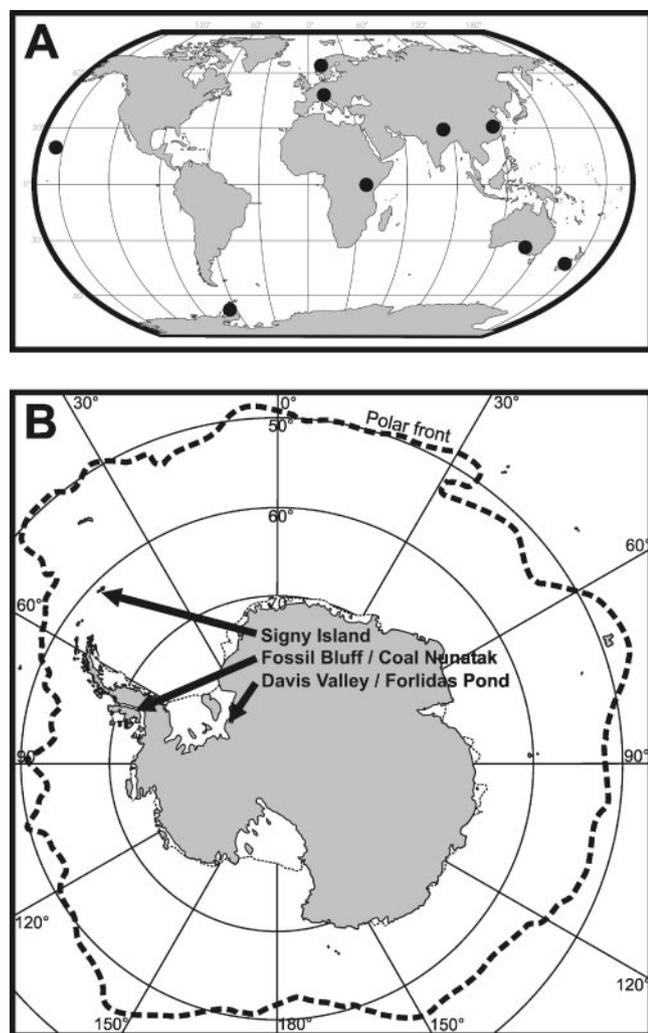


FIG. 1. Sampling sites. Samples originated from different locations in Europe, Asia, Australia, New Zealand, Hawaii, and Antarctica (A). Each dot represents a sampling area comprising several remote sampling sites. For instance, the Antarctic isolates originate from habitats in three different sampling areas (B). For details, see Table S1 in the supplemental material.

sample was diluted to a final flagellate abundance of 0.5 to 1 flagellate ml^{-1} and subsequently transferred to 24-well cell culture plates. Wells were supplemented with food bacteria at a concentration of 3×10^6 to 5×10^6 bacteria ml^{-1} . Wells were checked every second day for a period of at least 2 weeks for positive growth under the microscope, using a total magnification of $\times 200$. When flagellate growth was detected, the medium was transferred to a 50-ml Erlenmeyer flask containing inorganic NSY medium and fresh food bacteria. After 2 to 6 days the subsamples were further diluted to final concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, and 0.4 flagellate ml^{-1} and supplemented with the bacterial strain MWH-Mo1 or CB5 at concentrations of 15×10^6 to 25×10^6 bacteria ml^{-1} . Each of these dilutions was transferred to wells of sterile 24-well cell culture plates (1 ml per well) and incubated at 15 to 22°C, depending on the origin of the isolates. Screening of the wells for the growth of flagellates was again performed by direct microscopic investigation every second day. Finally, flagellates were transferred to an Erlenmeyer flask containing fresh medium and bacteria. This procedure was repeated until pure cultures were established, but at least four times. Pure cultures were acclimatized to 16°C and transferred to permanent culture with NSY medium supplemented with wheat grains. Flagellates in permanent culture were grown at 16°C at low light and transferred once a month to fresh medium. Flagellate strains are available from the authors upon request.

Morphological and phylogenetic analyses. Cells were checked for the occurrence of chloroplasts. In addition, cells were checked for autofluorescence as follows. Cells were fixed with formaldehyde (final concentration, 2%) and stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (final concentration, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) for 30 min. The cells were then filtered onto a black Nuclepore 0.2- μm filter backed by a 0.45- μm cellulose nitrate filter and examined under an epifluorescence microscope, using UV and blue light excitation for DAPI and for chlorophyll autofluorescence, respectively. Representative strains were, in addition, checked by scanning electron microscopy (SEM) for tripartite hairs on the long flagellum and for occurrence of scales. Briefly, cells fixed with a mixture of Lugol's solution and formaldehyde were allowed to sediment onto glass coverslips covered with poly-L-lysine solution (0.1%, wt/vol). The coverslips were then recovered from the chambers and rinsed in distilled water or sodium cacodylate buffer. Subsequently, the slides were fixed for 30 min in an osmium tetroxide solution (2% final concentration), rinsed again, and subsequently dehydrated using increasingly concentrated ethanol baths and a final wash in hexamethyldisilyazane. Finally, the slides were glued to an SEM stub with a thin layer of Araldite glue, metal coated, and inspected. The phylogenetic affiliation of strains based on small-subunit (SSU) rRNA gene sequences was specified as described in a previous study (4). PCR products were either directly sequenced or used for subsequent cloning into the vector pGEM-T Easy (Promega). Sequencing reactions were performed with an ABI Prism BigDye Terminator version 3.0 Ready Reaction cycle sequencing kit (Applied Biosciences) and an ABI PRISM model 3100 automated sequencer. Sequences were submitted to the BLAST search program of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to find closely related sequences. Sequences were aligned using the "CLUSTAL W" option (34) in the BioEdit 5.0.9 sequence analysis software (19). Where necessary, alignments were subsequently manually processed and corrected. Positions of unclear homology were excluded from further phylogenetic analysis. The result was a final alignment of 1,563 positions. The TREECON 1.3b software package was used to calculate distance matrices by the Kimura algorithm (20) and to generate phylogenetic trees by the neighbor-joining method (36). Parsimony trees were calculated using the program package PHYLIP (version 3.5; J. Felsenstein, Department of Genetics, University of Washington, Seattle). One hundred bootstrapped replicate resampling data points were generated with SEQBOOT (PHYLIP).

Maximum temperature tolerance. The isolated colorless chrysoytes were characterized regarding their temperature tolerance. During permanent culture, all strains were acclimatized to the same conditions, i.e., NSY inorganic basal medium at 16°C and pH 7.8, for at least 3 months. All experiments were run in triplicate in 4 ml in 12-well tissue culture plates with the bacterial strain *Listonella pelagia* CB5 as the food source. The strains were transferred to the experimental conditions, and growth was checked every 2 to 3 days by inverted light microscopy at a magnification of $\times 200$. The experiments ran usually for 3 days but up to 8 days until growth was observed. If no growth was observed after 8 days, the treatment was accepted not to support growth of the tested strain. If growth was observed, an aliquot was transferred to fresh medium and food at the next-higher temperature treatment in steps of 1 to 2°C (the temperatures tested were 17.3, 18.0, 19.2, 20.8, 23.0, 24.4, 25.2, 26.7, 28.0, 28.7, 30.7, 31.7, 32.0, 33.6, 34.6, 35.7, 36.4, 37.3, and 37.5°C). This general setup allowed for a stepwise acclimatization of the flagellate strains to the increasing temperatures tested. We generally followed this acclimatization approach, even though successful direct transfer to different temperatures provided evidence that acclimatization hardly affected the tolerance limits. In the context of this work, acclimatization is a physiological or behavioral adjustment to changes in the environment and adaptation is a trait that has evolved over a period of time and is based on a molecular mutation. All experiments were run in triplicate. Using this general strategy, the upper temperature tolerance limit was determined.

Temperature data for the habitats during sampling were not available for all habitats. Therefore, we used the mean monthly air temperatures in the respective month of sampling based on the data set for the past 10 years of the nearest weather station data provided by the Goddard Institute for Space Studies (http://data.giss.nasa.gov/gistemp/station_data/). For some climate stations recent data were not available, and in these cases temperatures were estimated by regression of the available data sets. Where necessary, temperature data were corrected by assuming a mean decrease in air temperature with altitude of 0.7°C per 100 m (temperature decline usually varies between 0.6 and 0.8°C per 100 m [see, e.g., reference 31]).

Nucleotide sequence accession numbers. The almost-full-length 18S rRNA gene sequences determined in this study have been deposited in the NCBI database under accession numbers DQ388538 to DQ388568.

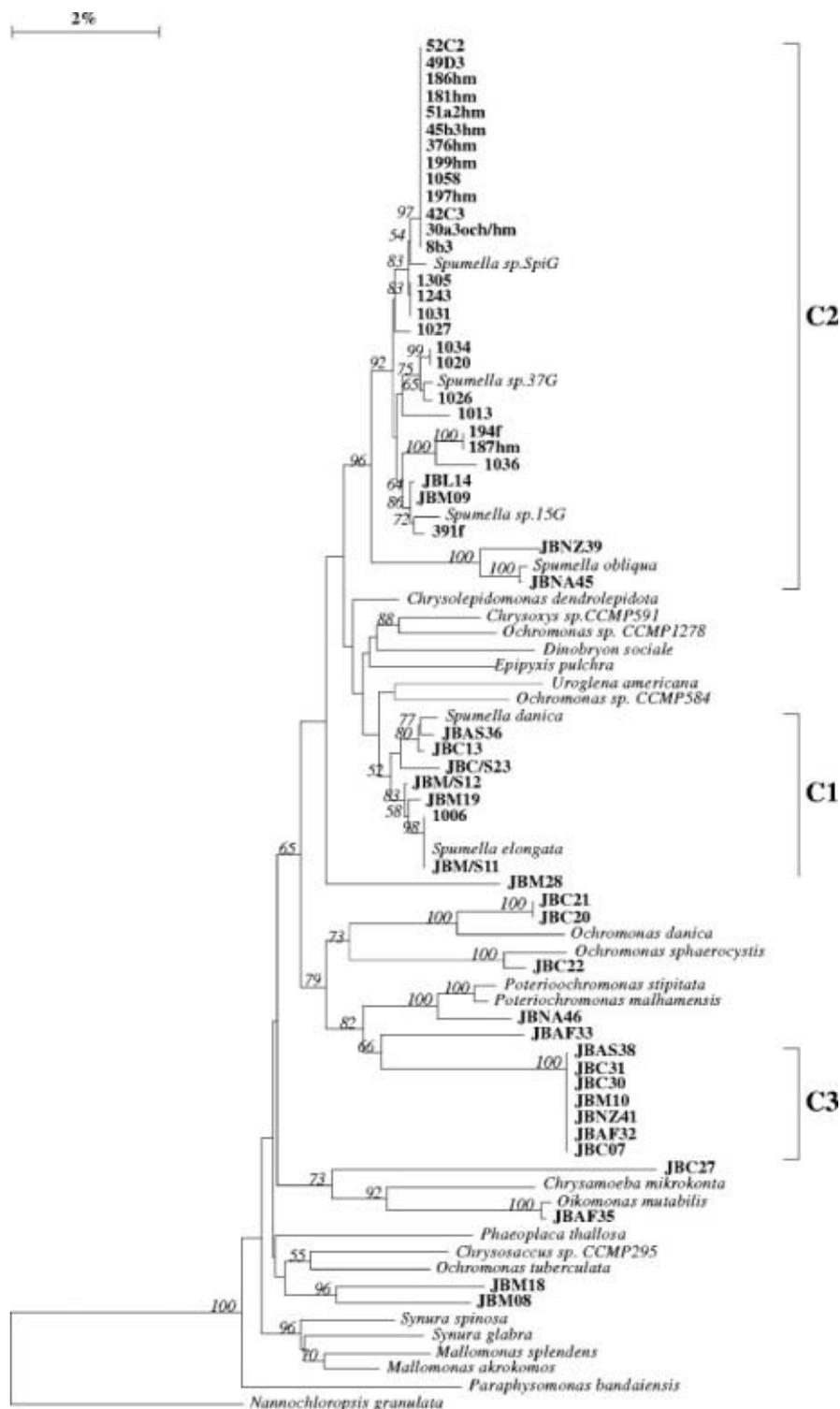


FIG. 2. Neighbor-joining tree showing the affiliation of SSU rRNA gene sequences from *Spumella* isolates with the *Chrysophyceae* sensu stricto. The numbers at the nodes of the tree indicate the percentage of bootstrap values for each node out of 100 bootstrap resamplings (values above 50 are shown). The scale bar indicates 2% estimated sequence divergence.

RESULTS

Morphological and 18S rRNA gene analyses. We isolated 31 colorless chrysophyte flagellates identified as *Spumella* spp.

These isolates and, in addition, 23 isolates from our culture collection (4) were included in this study. The *Spumella* cells were colorless and solitary and had a spherical to ellipsoid cell form. From the front end emerged two flagella, both visible in

the light microscope. SEM investigations proved that the long one bears tripartite hairs. The cells either swim free in the medium or attach to the substrate with the posterior end. The cells feed on small particles, specifically bacteria, and the general sequence of feeding follows that described by Boenigk and Arndt (3). The cells were between 4 and 8 μm in diameter. Despite a detailed morphological investigation of our *Spumella* strains, a classification to one of the described taxa was not possible due to the poor quality of the existing taxon descriptions (2). We isolated *Spumella* spp. from all continents from contrasting freshwater and soil sites (Fig. 1). Based on morphology, the investigated species therefore seem to be ubiquitous, i.e., present in different habitat types and distributed worldwide. Both neighbor-joining and parsimony 18S rRNA gene trees showed that most of our *Spumella* isolates were affiliated with the clusters C1, C2, and C3 as described previously (4) (Fig. 2; see Fig. S1 in the supplemental material). As the phylogenetic analysis indicates polyphyly of *Spumella* spp., we further use the term “*Spumella*-like” flagellates.

Ecophysiological differentiation and indications for geographic restriction. The “*Spumella*-like” flagellates differed significantly regarding their maximum tolerated growth temperature (by analysis of variance, $P < 0.001$) (Fig. 2), ranging between 17.3°C for a strain originating from Heywood Lake, Signy Island, Maritime Antarctic, and 34.6°C for several strains from Africa and Asia (see Table S1 in the supplemental material). Except for one strain originating from Antarctica and tolerating 24.4°C, all strains affiliated with the *Spumella* subclusters C1 and C3 tolerated maximum temperatures of between 28 and 34.6°C and of between 32 and 34.6°C, respectively. Strains from subcluster C2 were split between the Antarctic strains, tolerating between 17.3 and 28°C, and strains from other regions, which tolerated between 30.7 and 32°C (Fig. 2; see Fig. S1 and Table S1 in the supplemental material).

The temperature tolerance of the isolates was correlated with the mean monthly and mean annual air temperatures at the isolation sites (Spearman rank order correlations, $r = 0.857$ [$P < 0.001$] and $r = 0.867$ [$P < 0.001$], respectively). Similar correlation with monthly and annual temperatures at the sampling sites indicates little seasonality.

The habitat type had no effect on this correlation (for soil versus freshwater, by analysis of covariance [ANCOVA], $P = 0.624$).

The temperature tolerance of the isolates, excluding those from Antarctica, rose linearly with ambient air temperature (by linear regression, adjusted $r^2 = 0.36$ [$P < 0.001$]) (Fig. 3). Most of the strains from Antarctic samples deviated significantly from the global trend in that they were more strongly adapted to cold conditions (Fig. 3), including several psychrophilic strains (temperature maxima of $<20^\circ\text{C}$). This was significant when assuming either a linear or a logarithmic model (for a linear model, by ANCOVA, $P = 0.003$; for log-transformed data, by ANCOVA, $P < 0.001$). The test for the two different model assumptions was done because regression analysis yielded similar regression coefficients for both models ($r^2 = 0.685$; log ($X + 5$) transformed, $r^2 = 0.729$).

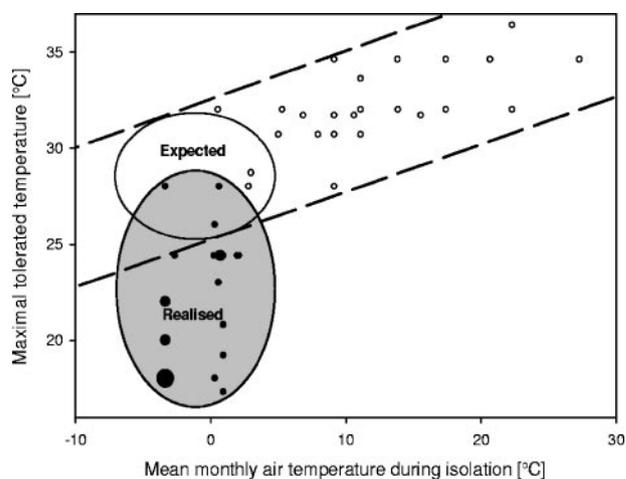


FIG. 3. Geographic pattern of temperature tolerance of *Spumella*-like flagellates. Maximum growth temperatures differ between strains but are generally within certain limits that relate to environmental temperature. Strains originating from Antarctica are represented by black symbols; those from other continents are represented by white symbols. For the latter there is a global linear correlation of increasing temperature tolerance with increasing environmental temperature (dashed lines). Antarctic strains deviate from this trend; i.e., the realized temperature adaptation (gray oval) is stronger than expected from the global trend (white oval). The size of the symbol indicates the number of strains for the respective condition; i.e., small symbols represent one strain, medium-sized symbols represent two or three strains; and large symbols represent five strains.

DISCUSSION

Strains affiliated with the same morphotype differ considerably with respect to ecophysiology. Morphological analysis of heterotrophic protistan communities from several marine and freshwater sites around Antarctica yielded taxa of which most had been previously reported from geographic locations elsewhere (6, 35), thus supporting the view that species may be worldwide distributed. Counter to this view of limited endemism are observations that the Antarctic region is more isolated than other parts of the world and that there has been environmental selection for specific adaptive strategies over a period of several million years (37). The morphological approach, indicating a cosmopolitan and ubiquitous distribution of most protists (12), may indeed be inadequate, as molecular studies provide evidence for considerable microdiversity and a certain geographic isolation of organisms in Antarctica. For protists (23), cyanobacteria (33), and heterotrophic bacteria (37), molecular data indicate a high level of geographic isolation. This study provides evidence for ecophysiological differentiation below the level of morphospecies but also below the level of SSU rRNA clusters. Similarly, a high functional diversity has been demonstrated for several flagellate taxa, specifically for *Oxyrris marina* (26), *Neobodo designis* (21, 38), and *Spumella* (5). These studies agree that ecophysiological parameters vary within a morphospecies. So far, the available studies do not support a clear correlation between ecophysiological and molecular differences, even though several studies indicate a habitat specificity on the level of SSU rRNA clusters (4, 21, 26, 38). All these studies provide indications that morpholog-

ical characters may be insufficient for a valid taxonomic classification.

Based on the current knowledge a solution of the species problem in protists seems to still be a distant prospect. In the meantime, we suggest that all available data be considered, including morphology, molecular data, and ecophysiological data, to define protistan species. Our data indicate that strains identical in the SSU rRNA gene sequence seem to have similar ecophysiological characteristics as well. Ecophysiological variation, however, seems generally to be high even between closely related flagellate strains (5; this study). Even slight differences in the SSU rRNA gene sequence may already be affiliated with very different ecophysiological adaptations. Further, we have to keep in mind that eventually any species concept, i.e., a classification of organisms in distinct units, may be inappropriate or at least problematic to describe the continuous transitions that we observe in the ecophysiology of protistan strains and taxa.

Antarctic strains are cold adapted. Our data clearly indicate an adaptation of Antarctic strains to the cold environment, even though the tolerated temperatures are far above the realized temperatures in the respective environments. We followed a conservative protocol; i.e., all strains were acclimatized to 16°C before the experiments. The deviation of the Antarctic strains from the global trend is therefore likely to be even stronger than observed in our experiment. Further, the relatively high tolerated temperatures of the cold-adapted flagellates, i.e., between 17.3 and 28°C, correspond to theoretical considerations: low-temperature adaptation of enzymes is regarded as an ongoing process, and optimal adaptation is therefore not to be expected (9). Cold adaptation of Antarctic chrysophyte flagellates has already been demonstrated for *Paraphysomonas* (7) and is further supported by observations of community growth of Antarctic flagellates at low temperature (25). In contrast, based on low realized growth rates of the Antarctic heterotrophic nanoflagellate community in Crooked Lake at 2°C, Laybourn-Parry et al. (24) concluded that these flagellates were not adapted. Those authors, however, did not exclude predation in their experiments, and the bacterial food concentration was below 5×10^5 bacteria ml⁻¹ with a mean bacterial cell volume of around 0.1 μm³. Under such conditions our isolates, originating from warmer habitats, would even die back (5; J. Boenigk et al. unpublished data), and we therefore do not see a conflict with the earlier study. For the investigated strains, temperature adaptation seems not to be linked to habitat characteristics, and SSU rRNA data may not provide sufficient resolution to separate ecophysiological different clusters. Even flagellate strains identical in SSU rRNA sequence (5) and flagellate strains originating from the same habitat (this study) may differ considerably in their ecophysiology. We therefore advise caution in the ecological interpretation of experiments based on a single strain.

Geographic barriers do matter for the distribution of protists. The west wind zone and the mainly wind-driven Antarctic circumpolar current, i.e., the strongest oceanic current (1), are the main reasons for the (bio-)geographic isolation of Antarctica and its stable cold climate. Thus, if “microbial endemism” is possible at all, then Antarctica would be a promising place to find such organisms (37). In fact, the drastic deviation of the temperature adaptation of Antarctic *Spumella* morphospecies

from the global trend provides strong evidence for geographic transport restriction of evolutionary and, consequently, biogeographic significance. Assuming unlimited exchange of protists, one would expect that the global trend of a steady decrease in temperature tolerance with environmental temperature includes the Antarctic continent. This does not question the possibility that protistan cells are transported by air between geographic regions (37). Intercontinental transport of protists, as proposed by Finlay and Fenchel (10, 12), is very likely (cf. references 2 and 4) and is supported by the observation of significant air travel of spores and pollen to Antarctica (27). Further, the phylogenetic similarity of isolates from Antarctic and non-Antarctic sampling sites indicates recent (in evolutionary time scales) exchange. Our data show, however, that protistan transport to Antarctica is sufficiently restricted to allow the local protistan population to adapt (not only acclimatize) to local environmental conditions and thus to build up biogeographically restricted populations. The predominance of autochthonous strains from Antarctica that are identifiable from their deviation from the global trend of temperature adaptation (Fig. 2) demonstrates that successful colonization of Antarctic habitats by allochthonous strains is rare.

Based on our findings, we expect subtle cases of protistan endemism to exist also in other isolated habitats shielded by geographic barriers, as proposed by those critical of the ubiquity theorem (8, 16, 29). We assume, however, that the resolution of current taxonomic methods, including molecular analyses, may overlook endemic ecophysiological traits as well as variance at the whole-genome level. Applying finer taxonomic resolution, we may eventually find evidence for other geographic barriers to microbes. The existence of endemic morphospecies appears unlikely, since rates of global transport of microorganisms, although restricted, are too much higher than evolutionary speciation into morphologically distinct organisms. Whether microbes can be endemic or have a biogeography depends on whether we continue to restrict these terms to evolutionary distances separating species or higher taxa. It should be noted, however, that there are less permissive and durable barriers, such as geological formations or ice caps, that may give rise to geographic speciation of microbes as is known for plants and animals.

ACKNOWLEDGMENTS

Parts of this work were funded by the Austrian Science Fund (P 18767) and by the Natural Environment Research Council through the British Antarctic Survey Terrestrial and Freshwater Biodiversity Programme.

REFERENCES

1. Barker, P. F., and E. Thomas. 2004. Origin, signature and palaeoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth-Sci. Rev.* **66**:143–162.
2. Boenigk, J. 2005. Some remarks on the strain specificity and general pattern in the ecology of *Spumella* (Chrysophyceae). *Nova Hedwigia* **128**:167–178.
3. Boenigk, J., and H. Arndt. 2000. Particle handling during interception feeding by four species of heterotrophic nanoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**:350–358.
4. Boenigk, J., K. Pfandl, P. Stadler, and A. Chatzinotas. 2005. High diversity of the “*Spumella*-like” flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environ. Microbiol.* **7**:685–697.
5. Boenigk, J., P. Stadler, A. Wiedlroither, and M. W. Hahn. 2004. Strain-specific differences in the grazing sensitivity of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5787–5793.
6. Butler, H. G. 1999. Seasonal dynamics of the planktonic microbial community in a maritime antarctic lake undergoing eutrophication. *J. Plankton Res.* **21**:2393–2419.

7. Choi, J. W., and F. Peters. 1992. Effects of temperature on two psychrophilic ecotypes of a heterotrophic nanoflagellate, *Paraphysomonas imperforata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:593–599.
8. Coleman, A. W. 2002. Microbial eukaryote species. *Science* **297**:337.
9. D'amico, S., P. Claverie, T. Collins, D. Georlette, E. Gratia, A. Hoyoux, M. A. Meuwis, G. Feller, and C. Gerday. 2002. Molecular basis of cold adaptation. *Phil. Trans. R. Soc. London B* **357**:917–924.
10. Fenchel, T., and B. J. Finlay. 2004. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Bioscience* **54**:777–784.
11. Fenchel, T., and B. J. Finlay. 2004. Here and there or everywhere? Response from Fenchel and Finlay. *Bioscience* **54**:884–885.
12. Finlay, B. J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**:1061–1063.
13. Finlay, B. J., and K. J. Clarke. 1999. Ubiquitous dispersal of microbial species. *Nature* **400**:828.
14. Finlay, B. J., and K. J. Clarke. 1999. Apparent global ubiquity of species in the protist genus *Paraphysomonas*. *Protist* **150**:419–430.
15. Finlay, B. J., and T. Fenchel. 2002. Microbial eukaryote species—response. *Science* **297**:337.
16. Foissner, W. 2005. Two new “flagship” ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Venezuela: *Sleighophrys pustulata* and *Luporinophrys micelae*. *Eur. J. Protistol.* **41**:99–117.
17. Hahn, M. W. 1997. Experimentelle Untersuchungen zur Interaktion von bakterivoren Nanoflagellaten mit pelagischen Bakterien. Thesis. TU Braunschweig, Braunschweig, Germany.
18. Hahn, M. W., H. Lunsdorf, Q. L. Wu, M. Schauer, M. G. Hoffe, J. Boenigk, and P. Stadler. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1442–1451.
19. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* **41**:95–98.
20. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:11–120.
21. Koch, T. A., and F. Ekelund. 2005. Strains of the heterotrophic flagellate *Bodo designis* from different environments vary considerably with respect to salinity preference and SSU rRNA gene composition. *Protist* **156**:97–112.
22. Lachance, M.-A. 2004. Here and there or everywhere? *Bioscience* **54**:884.
23. Lawley, B., S. Ripley, P. Bridge, and P. Convey. 2004. Molecular analysis of geographic patterns of eukaryotic diversity in antarctic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5963–5972.
24. Laybourn-Parry, J., P. Bayliss, and J. C. Ellisevans. 1995. The dynamics of heterotrophic nanoflagellates and bacterioplankton in a large ultra-oligotrophic Antarctic lake. *J. Plankton Res.* **17**:1835–1850.
25. Laybourn-Parry, J., J. C. Ellisevans, and H. Butler. 1996. Microbial dynamics during the summer ice-loss phase in maritime Antarctic lakes. *J. Plankton Res.* **18**:495–511.
26. Lowe, C. D., A. Day, S. J. Kemp, and D. J. S. Montagnes. 2005. There are high levels of functional and genetic diversity in *Oxyrrhis marina*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**:250–257.
27. Marshall, M. A. 1996. Biological particles over Antarctica. *Nature* **383**:680.
28. Massana, R., J. Castresana, V. Balague, L. Guillou, K. Romari, A. Groisillier, K. Valentin, and C. Pedros-Alio. 2004. Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3528–3534.
29. Nanney, D. L. 2004. No trivial pursuit. *Bioscience* **54**:720–721.
30. Papke, R. T., and D. M. Ward. 2004. The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microb. Ecol.* **48**:293–303.
31. Roedel, W. 2000. Physik unserer Umwelt: Die Atmosphäre. 3. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Germany.
32. Schlegel, M., and R. Meisterfeld. 2003. The species problem in protozoa revisited. *Eur. J. Protistol.* **39**:349–355.
33. Taton, A., S. Grubisic, E. Brambilla, R. De Wit, and A. Wilmotte. 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5157–5169.
34. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, Jeanmougin, F., and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* **24**:4876–4882.
35. Tong, S., N. Vors, and D. J. Patterson. 1997. Heterotrophic flagellates, centrohelid heliozoa and filose amoebae from marine and freshwater sites in the Antarctic. *Polar Biol.* **18**:91–106.
36. van de Peer, Y., and R. de Wachter. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* **10**:569–570.
37. Vincent, W. F. 2000. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Sci.* **12**:374–385.
38. von der Heyden, S., and T. Cavalier-Smith. 2005. Culturing and environmental DNA sequencing uncover hidden kinetoplastid biodiversity and a major marine clade within ancestrally freshwater *Neobodo designis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:2605–2621.

High diversity of the ‘*Spumella*-like’ flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions

Jens Boenigk,^{1*} Karin Pfandl,¹ Peter Stadler¹ and Antonis Chatzinotas²

¹Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestr. 9, A-5310 Mondsee, Austria.

²UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Department of Environmental Microbiology, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany.

Summary

We isolated 28 strains of ‘*Spumella*-like’ flagellates from different freshwater and soil habitats in Austria, People’s Republic of China, Nepal, New Zealand, Uganda, Kenya, Tanzania and Hawaii by use of a modified filtration–acclimatization method. ‘*Spumella*-like’ flagellates were found in all of the samples and were often among the dominant bacterivorous flagellates in the respective environments. The small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene sequence of the isolates was determined and aligned with previously published sequences of members belonging to the Chrysophyceae *sensu stricto*. Phylogenetic analysis of the 28 new sequences confirmed their position within the Chrysophyceae *sensu stricto* and positioned them within different clades. Most of the sequences grouped within clade C and formed several subclusters separated from each other by green taxa including flagellates belonging to *Ochromonas*, *Dinobryon*, *Poterioochromonas* and others. All soil isolates clustered together (subcluster C1) with the soil strain *Spumella elongata* and the undescribed soil strain ‘*Spumella danica*’. Aquatic isolates were affiliated with at least two branches (C2 and C3). Sequence similarity to the closest related member of the Chrysophyceae ranged between 92% and 99.6%, sequence divergence among the ‘*Spumella*-like’ flagellates was as high as 10%. We conclude that (i) the ‘*Spumella*-like’ flagellates are a diverse group both in terms of sequence dissimilarity between iso-

lates and in terms of the number of genotypes, (ii) *Spumella* and *Ochromonas* are polyphyletic, and (iii) based on the SSU rRNA gene no biogeographical restriction of certain branches could be observed even though different ecotypes may be represented by the same genotype.

Introduction

Since 1983 Azam and colleagues (Azam *et al.*, 1983) introduced the concept of the microbial loop, the significance of heterotrophic single-cell eukaryotes for carbon transfer through aquatic food webs has become generally accepted (Wylie and Currie, 1991; Sanders *et al.*, 1994; Sherr and Sherr, 1994; Arndt *et al.*, 2000; Boenigk and Arndt, 2002). The nanoflagellate genera *Spumella*/*Monas* are among the most important heterotrophic eukaryotes in many different ecosystems: On annual average 20–50% of the pelagic heterotrophic nanoflagellate (HNF) biomass in freshwaters is formed by small heterokont taxa, mainly colourless chrysophytes (= chrysoomonads) and bicosoecids (Salbrechter and Arndt, 1994; Arndt *et al.*, 2000). *Spumella*, which represents a typical colourless chrysophyte has been reported to be generally common in freshwaters (Carrick and Fahnenstiel, 1989; Sanders *et al.*, 1989; Bennet *et al.*, 1990; Carrias *et al.*, 1998). Even in benthic sites, colourless chrysophytes make up to 30%, but usually much less (Arndt *et al.*, 2000). In addition, the chrysophyte genera *Ochromonas* and *Poterioochromonas* are assumed to be among the dominant mixotrophs (Bennet *et al.*, 1990). The primary mode of nutrition of these mixotrophs often is bacterivory (Andersson *et al.*, 1989). These bacterivorous chrysophytes (family Chromulinaceae *sensu*; Preisig, 1995) therefore are responsible for a significant part of the bacterivory in freshwater systems and are an important link between bacterial production and higher trophic levels. Thus far, field investigations and food web models have been primarily focused on the so-called ‘functional groups’, i.e. bacteria, heterotrophic nanoflagellates, ciliates, etc. It became evident, however, that such models cannot sufficiently describe the specific interactions and pathways within the microbial food web. For this reason,

Received 24 June, 2004; accepted 13 October, 2004. *For correspondence. E-mail jens.boenigk@oeaw.ac.at; Tel. (+43) 6232 312529; Fax (+43) 6232 3578.

attention is increasingly drawn towards species- or taxon-specific investigations and assessing the diversity of the free-living flagellates is becoming increasingly important (e.g. Kinner *et al.*, 1998; Cleven and Weisse, 2001).

The attempt for specific investigations is often hampered by the sparseness of diagnostic characteristics for taxonomic identification. This is valid in particular for the small heterotrophic chrysophytes which are often summed up as 'Spumella-like flagellates' or *Spumella* spp. in many field studies (Weisse, 1997; Auer and Arndt, 2001; Cleven and Weisse, 2001; Weitere and Arndt, 2003). The sparseness of diagnostic features and molecular data does not provide any clarification whether these organisms form either a mono- or a polyphyletic group: *Spumella* is considered to be the colourless counterpart of *Ochromonas* (Preisig *et al.*, 1991), but *Ochromonas* ssp. have already been reported to cluster in different branches, i.e. together with *Poterioochromonas*, *Chrysoxys* and *Chromulina*, and have therefore been suggested to be polyphyletic (Andersen *et al.*, 1999). In addition, occasional loss of colour has been independently described for several species of *Ochromonas* (Bourrelly, 1957) and for these reasons the separation of *Ochromonas* and *Spumella* is doubtful (Fenchel, 1982a,b; Preisig *et al.*, 1991). Similarly, in ecophysiological laboratory investigations, members of the heterotrophic chrysophytes have been widely used as model organisms, but these investigations are based on very few strains (cf. Cowling, 1991) that often lack precise taxonomic identification (Holen and Boraas, 1991; Zwart and Darbyshire, 1992; Rothhaupt, 1997; Boenigk, 2002). In laboratory and field studies, these organisms are usually treated as a black box assuming, basically, similar ecological characteristics. Recent studies revealed, however, that even closely related protist taxa differ in their basic response to environmental factors (Weisse, 2002; Boenigk *et al.*, 2004). It is therefore of urgent interest to survey the diversity and the taxonomic and ecological integrity of the so-called 'Spumella-like' flagellates. To minimize confusion resulting from the different botanical (Chrysophyceae) and zoological (Chryomonadida) nomenclatures we will generally follow the concept of Preisig (1995) throughout our manuscript and use the term Chrysophyceae.

We isolated 28 strains of 'Spumella-like' flagellates from soil and freshwater habitats in Austria, People's Republic of China, Nepal, Uganda, Tanzania, Kenya, New Zealand and Hawaii, and conducted phylogenetic analysis using the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene sequences. We were specifically interested in assessing the diversity of this taxonomically vague group. We hypothesized that (i) the diversity of the 'Spumella-like' flagellates is dramatically underestimated by means of conventional light microscopical investigations; (ii) the 'Spumella-like' flagellates are not a monophyletic group;

and (iii) the 'Spumella-like' flagellates do not represent a consistent ecophysiological group.

Results

Isolation of strains and morphology

'Spumella-like' flagellates were present in all of the samples. Successful isolation was, however, hampered in some cases by fast growing bodonids, which in some samples overgrew the colourless chrysophytes. As the 'Spumella-like' flagellates could hardly be differentiated by morphological features during the isolation, only one or two, i.e. a small and a large forms, were isolated per sample to avoid multiple isolation of the same clone. All strains possess a spherical to ovate cell body. The strains tended to either attach to the substratum when well fed or to actively swim when starved. Swimming cells tended to spin in small circles even though swimming behaviour differed between the strains. Attached cells did not detach even during cell division, and flagellates were therefore often found in small colonies.

All isolated strains were between 3.2 and 8.3 μm long, corresponding to a cell volume of 13–292 μm^3 (Table 1). Two unequal flagella inserted close together at the anterior end of the cell, the long flagellum being about 2–4 times longer than the cell body, the short flagellum around 1/2 to 3/4 of the cell diameter and usually of <4 μm length. Only in the strain JBAF35 we found just one flagellum that was visible in the light microscope. The isolates originating from soil (i.e. JBM/S11, JBM/S12, JBC/S23 and JBC/S24) and the freshwater isolate JBC07 had the ability to build cysts, but this ability became weaker in culture and the strains JBC07 and JBC/S23 seemed to have lost the ability to build cysts altogether. Changes in temperature and food conditions did not induce cyst formation in these strains. All strains were bacterivorous and no autofluorescence could be detected.

Isolation efficiency

For determining the efficiency of the isolation method, i.e. the fraction of flagellate cells which could be successfully isolated in percent of the field abundance of flagellates, filtrated lake water containing the original background bacterial community at *in situ* temperatures was used. The test on isolation efficiency showed that only 1–2% of the nanoflagellates could be successfully isolated by way of direct dilution. In contrast, after acclimatization of the filtrates, isolation efficiency increased to >80% and was mostly near 100%. It is not clear as to which extent individual cells adapted to the laboratory conditions during this treatment and to which extent more resistant forms replaced the original community. The short acclimatization period of 16–24 h would allow for not more than three to

four subsequent cell divisions only. This implies that a significant fraction of at least 10–20% of the original flagellates were able to individually adapt to the laboratory conditions. Successfully isolated strains could be transferred to a permanent culture with two exceptions: Two isolates could be subcultured at least four times but did finally die back. One of these isolates proved during the isolation process to be a very fast growing flagellate with a generation time of less than 4 h (J. Boenigk, unpublished data). Even different treatments during cultivation such as varying culture media, amounts of wheat grains and bacterial food sources did not result in any permanent culture (J. Boenigk, unpublished data).

SSU rRNA gene sequence analysis and phylogenetic affiliation of strains

The SSU rRNA gene sequence was determined for 28 'Spumella-like' isolates originating from freshwater and soil habitats in Austria, People's Republic of China, New Zealand, Nepal, Uganda, Tanzania and Kenya (Table 1). The results of the phylogenetic analysis of the SSU rRNA gene sequences showed that the isolates represent a wide diversity within the chrysophyceae, even though morphological distinction by way of light microscopy was in most cases quite difficult or impossible. Sequence differences among the SSU rRNA gene sequences from our 'Spumella-like' flagellates ranged from 0% to 10% (excluding the strains JBAS37 and JBNZ43, which had large A/T-rich insertions). Sequence similarity to the closest-related cultured chrysophyceae was between 92.0% and 99.6% (Table 1). The highest sequence divergence to a database rRNA gene sequence was observed for the strains JBC27, JBM18 and JBM43 (92.0%, 93.9% and 94.3%). In contrast to that, SSU rRNA gene sequences of 50% of the isolates were closely related (i.e. >97% sequence identity) to the known chrysophyceae cultures (Table 1). No correlation could be found between the different regions from which the flagellates were isolated and sequence similarity. Soil as well as aquatic organisms with the same or very similar 18S rRNA gene sequence were isolated from widely different geographic regions. For instance, the soil isolates JBM/S11, JBC/S24 and *Spumella elongata* showed a sequence similarity of 99.6%, but were isolated from Austria, the People's Republic of China and the UK (Tables 1 and 2). Similarly, the strains JBM10, JBC07, JBNZ41, JBC30, JBC31 and JBAF32 (sequence identity 100%) originate from locations in Austria, People's Republic of China, New Zealand and Uganda.

The neighbour-joining phylogenetic analysis positioned the isolates in different clusters (Fig. 1); however, bootstrap support (bootstrap value, BV >60%) was observed only for clades A, B1, B2 and E. In general, the clades

introduced by Andersen and colleagues (1999) were confirmed by our analysis. The parsimony analysis produced a tree, which recovered all clades, except clade D (Fig. 2). However, the placement of the clades was different and bootstrap support was lower for all of the clades.

The majority, i.e. 19 of our isolates affiliated in both analyses with clade C, which however, had no bootstrap support. None of our isolates affiliated with the clade A, which contains the Synurophycean taxa and with clade B1, containing taxa belonging to *Hibberdia* and related genera (Figs 1 and 2). Sixteen of our clade C isolates grouped within three subclusters of this clade, i.e. the 'Spumella-like' soil cluster C1, and the two 'Spumella-like' aquatic clusters C2 and C3. Subcluster C2 had different bootstrap values in the distance and the parsimony tree, whereas subcluster C1 showed bootstrap support only in the distance tree. The 'Spumella-like' clusters contain exclusively non-green 'Spumella-like' isolates, and no green chrysophyceae strains were affiliated with any of these clusters. All published sequences from isolates originating from soils (Table 2), i.e. the strains *Spumella elongata* (Belcher and Swale, 1976) and 'Spumella danica' (I. Bruchmüller, A. Mylnikov, K. Juergens and T. Weisse, unpublished), were affiliated with cluster C1. Three aquatic isolates (JBAS36, JBM19 and JBC13) were also affiliated with this cluster C1. The aquatic cluster C2 contained both strains from larger lakes, for instance, from Lake Constance (*S. obliqua*) and Lake Plußsee in Germany (*Spumella* spp. SpiG, 15G and 37G) (Table 2), and strains from small puddles in Mondsee (JBM09) and Lunz (JBL14) in Austria. All of the new sequences affiliated with the 'Spumella-like' cluster C3 had identical 18S rRNA gene sequences and seem to be a sister group to *Poteroochromonas* spp. A lorica as described for *Poteroochromonas* spp. has, however, never been observed for new isolates of the cluster C3. In contrast to the distance tree, parsimony analysis indicated that *Ochromonas danica* and *Ochromonas sphaerocystis* represent a sister group to C3.

Five sequences were related to members of the genus *Paraphysomonas*. Electron microscopical investigations of these isolates provided evidence that, in contrast to isolates affiliated with the C cluster, all these isolates possessed scales, i.e. morphologically they belong to the genus *Paraphysomonas* (G. Novarino, pers. comm.). In our analysis bootstrap support did not provide significant measures of confidence that this group is monophyletic. Both analyses resulted in three well-supported lineages within the genus *Paraphysomonas*, with *P. butcheri* diverging earlier to the other *Paraphysomonas* species. The two strains affiliated to the lineage including *P. vestita* PV10 (Caron *et al.*, 1999) and SOTON1 (Rice *et al.*, 1997), and *P. foraminifera* HT3, were similar to the two *P. vestita*

Table 1. Origin and characteristics of isolates.

Isolate	Next known sequence	Sequence similarity	Origin	Latitude longitude	Altitude (m)	Date of isolation	Cell size (μm^3)	Cysts	Autofluorescence
JBM06	<i>P. foraminifera</i> TPC2	99.3%	Austria, Lake Mondsee	47°52'0N 13°20'60E	500	17/09/2002	195 ± 63		No
JBC07	<i>P. malhamensis</i>	94.9%	Peoples Republic of China, Lake Tai Hu	31°30'0N 120°20'0E	3	17/11/2002	101 ± 27	x	No
JBM08	<i>O. tuberculata</i>	95.4%	Austria, Lake Mondsee	47°52'0N 13°20'60E	500	14/10/2002	55 ± 13		No
JBM09	<i>Spumella</i> sp. 15G	99.3%	Austria, Puddle in Mondsee	47°52'0N 13°20'60E	500	14/10/2002	85 ± 37		No
JBM10	<i>P. malhamensis</i>	94.9%	Austria, Small artificial pond in Mondsee, Karlsgarten	47°52'0N 13°20'60E	500	14/10/2002	34 ± 8		No
JBM/S11	<i>S. elongata</i>	99.6%	Austria, Soil, Mondsee near 'Rauchhaus'	47°52'0N 13°20'60E	500	14/10/2002	36 ± 30	x	No
JBM/S12	<i>S. elongata</i>	98.8%	Austria, Soil, Mondsee near 'Rauchhaus'	47°52'0N 13°20'60E	500	14/10/2002	41 ± 18	x	No
JBC13	'S. danica'	98.9%	Peoples Republic of China, Pond in Beijing, Prince Gong's Mansion	39°53'60N 116°24'46E	56	14/11/2002	36 ± 11		No
JBL14	<i>Spumella</i> sp. 15G	99.1%	Austria, Puddle in Lunz	47°51'0N 15°03'0E	884	24/10/2002	135 ± 21		No
JBM18	<i>O. tuberculata</i>	93.9%	Austria, Lake Krottensee	47°47'0 N 13°23'20E	580	13/11/2002	35 ± 13		No
JBM19	<i>S. elongata</i>	99.1%	Austria, Lake Hallstatt	47°32'60N 13°39'0E	556	13/11/2002	16 ± 4		No
JBC22	<i>O. sphaerocystis</i>	97.8%	People's Republic of China, Pond 1 in Sushou, The Humble Administrator's Garden	31°18'28N 120°37'10E	3	19/11/2002	61 ± 21		No
JBC/S23	'S. danica'	98.4%	People's Republic of China, Soil near Badaling	40°20'15N 115°58'10E	795	14/11/2002	13 ± 3	x	No
JBC/S24	<i>S. elongata</i>	99.6%	People's Republic of China, Soil from Shanghai	31°06'21N 121°22'31E	5	21/11/2002	15 ± 6	x	No
JBC27	<i>C. annularis</i>	92.0%	Peoples Republic of China, Small pond in Huqiu	31°20'05N 120°34'27E	4	20/11/2002	205 ± 22		No
JBM28	<i>C. dendrolepidota</i>	95.1%	Austria, Lake Schwarzensee	47°45'0N 13°29'50E	716	13/11/2002	31 ± 12		No
JBC29	<i>P. formamifera</i> SOTON A	95.2%	People's Republic of China, Lake Tai Hu	31°30'0N 120°20'0E	3	17/11/2002	58 ± 18		No
JBC30	<i>P. malhamensis</i>	94.9%	People's Republic of China, Lake Tai Hu	31°30'0N 120°20'0E	3	19/11/2002	28 ± 10		No
JBC31	<i>P. malhamensis</i>	94.9%	Peoples Republic of China, Pond 2 in Sushou, The Humble Administrator's Garden	31°18'28N 120°37'10E	3	19/11/2002	27 ± 9		No
JBAF32	<i>P. malhamensis</i>	94.9%	Uganda, Lake Nkuruba	0°37'0N 30°16'0E	1400	22/03/2003	66 ± 23		No
JBAF33	<i>P. malhamensis</i>	94.9%	Tanzania, Msimbazi River	5°15'0S 38°49'60E	151	20/03/2003	68 ± 20		No
JBAF35	<i>Oikomonas</i>	98.9%	Kenya, River Sagana	0°40'0S 37°12'0E	1207	28/03/2003	58 ± 13		No
JBAS36	'S. danica'	98.7%	Nepal, Nag Pokhari, Kathmandu	27°43'0N 85°19'0E	1298	27/03/2003	35 ± 17		No
JBAS37	<i>P. vestita</i> PV10	99.7%	Nepal, Ranipokhari, Kathmandu	27°43'0N 85°19'0E	1298	30/03/2003	202 ± 52		No
JBNZ39	<i>S. obliqua</i>	97.9%	New Zealand, Shallow tarn near Karangarua	43°37'0S 169°46'0E	1118	01/02/2003	25 ± 8		No
JBNZ40	<i>P. formamifera</i> SOTON A	95.2%	New Zealand, Small lake near Mandeville	46°0'0S 168°49'0E	104	02/02/2003	119 ± 26		No
JBNZ41	<i>P. malhamensis</i>	94.9%	New Zealand, Lake Aviemore	44°40'60S 170°22'0E	212	03/02/2003	62 ± 11		No
JBNZ43	<i>P. vestita</i> SOTON 1	94.3%	New Zealand, Small stream near Ashburton	43°58'0S 171°46'0E	60	05/02/2003	292 ± 129		No

Table 2. Known sequences of clade C of the Chrysophyceae (18S rRNA gene) following Andersen and colleagues (1999). The origin of the strains and the GenBank entry number are shown.

Strain name	Origin of strain and identification number	GenBank entry	Reference
<i>Spumella danica</i> nov. sp.	Jutland, Denmark: soil	AJ236861	I. Bruchmüller, A. Mylnikov, K. Juergens and T. Weisse, unpublished
<i>Spumella elongata</i>	Type strain Girton, Cambridgeshire, UK: soil. CCAP strain no. 955/1	AJ236859	Bruchmüller (1998)
<i>Spumella obliqua</i>	Baden-Württemberg, Germany: Lake Constance – freshwater	AJ236860	Bruchmüller (1998)
<i>Spumella</i> sp. 15G	Schleswig-Holstein, Germany: Lake Behler See – freshwater	AJ236857	Bruchmüller (1998)
<i>Spumella</i> sp. 37G	Schleswig-Holstein, Germany: Pond near Plön – freshwater	AJ236858	Bruchmüller (1998)
<i>Spumella</i> sp. SpiG	Schleswig-Holstein, Germany: Lake Plußsee – freshwater	AJ236862	Synonym to <i>Spumella</i> sp. SpG Bruchmüller (1998)
<i>Poterioochromonas malhamensis</i>	Freshwater MCC-NIES strain MBI HT2 (no longer available)	AB02307	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Poterioochromonas stipitata</i>	Michigan, USA: roadside ditch – freshwater CCMP strain 1862	AF123295	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Ochromonas</i> CCMP1278	Port Phillip Bay, Melbourne, Australia: marine CCMP strain 1278	U42382	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Ochromonas</i> CCMP 584	Sargasso Sea: marine CCMP strain 584	U42381	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Ochromonas danica</i>	Type strain Everdrup, Denmark: Bog-pool – freshwater. UTEX strain 1298	M32704	Gunderson <i>et al.</i> (1987)
<i>Ochromonas sphaerocystis</i>	Arkansas, USA: small stream – freshwater CCMP strain 586	AF123294	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Ochromonas tuberculata</i>	Illinois, USA: Volo Bog – freshwater CCMP strain 1861	AF123293	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Uroglena americana</i>	Alberta, Canada: Glenmore reservoir – freshwater CCMP strain 1863	AF123290	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Chrysoxsis</i> sp.	Washington, USA: North Atlantic – marine CCMP strain 591	AF123302	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Dinobryon sociale</i> var. <i>americana</i>	Maine, USA: west Boothbay Harbour – marine CCMP strain 1860	AF123291	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Dinobryon sertularia</i>	Alberta, Canada: Glenmore reservoir – freshwater CCMP strain 1859	AF123302	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Chrysonephele palustris</i>	Tasmania, Australia: Golden Cloud Swamp – freshwater	U71196	Saunders <i>et al.</i> (1997)
<i>Chrysolepidomonas dendrolepidota</i>	Michigan, USA: Lake Medora – freshwater CCMP strain 293	AF123297	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Epipyxis aurea</i>	Minnesota, USA: Darling Pond – freshwater CCMP strain 385	AF123298	Andersen <i>et al.</i> (1999)
<i>Epipyxis pulchra</i>	Minnesota, USA: Darling Pond – freshwater CCMP strain 382	AF123301	Andersen <i>et al.</i> (1999)

CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa UK; CCMP: Provasoli – Guillard National Centre for Culture of Marine Phytoplankton; MCC-NIES: Microbial Culture Collection at the national institute for environmental studies; UTEX: University of Texas, Culture Collection of Algae.

sequences characterized by the A/T-rich insertion sequences. The largest A/T-rich insertions as found in *P. vestita* PV10 were identically present in JBAS37.

Discussion

Older systems of classification have been based on vegetative morphological features and characteristics of the motile cell, especially the flagellar number and position (Preisig, 1995). Even though the flagellar number has been disregarded as a major taxonomic criterion (Kristiansen, 1986, 1990) it is still used for separating genera. Members of the chrysophycean order Chromulinales (following Preisig, 1995) possess two flagella where the second flagellum is short in *Chromulina* spp. and *Oikomonas* spp. and long in *Ochromonas* spp. and *Spumella* spp.

Except for this difference *Ochromonas* and *Chromulina* on the one hand, and *Spumella* and *Oikomonas* on the other are similar (Preisig, 1995).

All of our isolates possessed a spherical to ellipsoidal cell body and attached to the substrate when satiated. Most strains possessed two flagella, a long and a short one, emerging from the anterior end. The short flagellum was several micrometres in length and following the light microscopical and electron microscopical investigations the isolates belong to the *Spumella/Monas* group. The strains specifically affiliated with cluster F possess scales and thus belong to the genus *Paraphysomonas* (G. Novarino, pers. comm.).

Only in the strain JBAF35 was the short flagellum not visible in the light microscope, or extremely short, and the strains may therefore be affiliated with *Oikomonas*. This

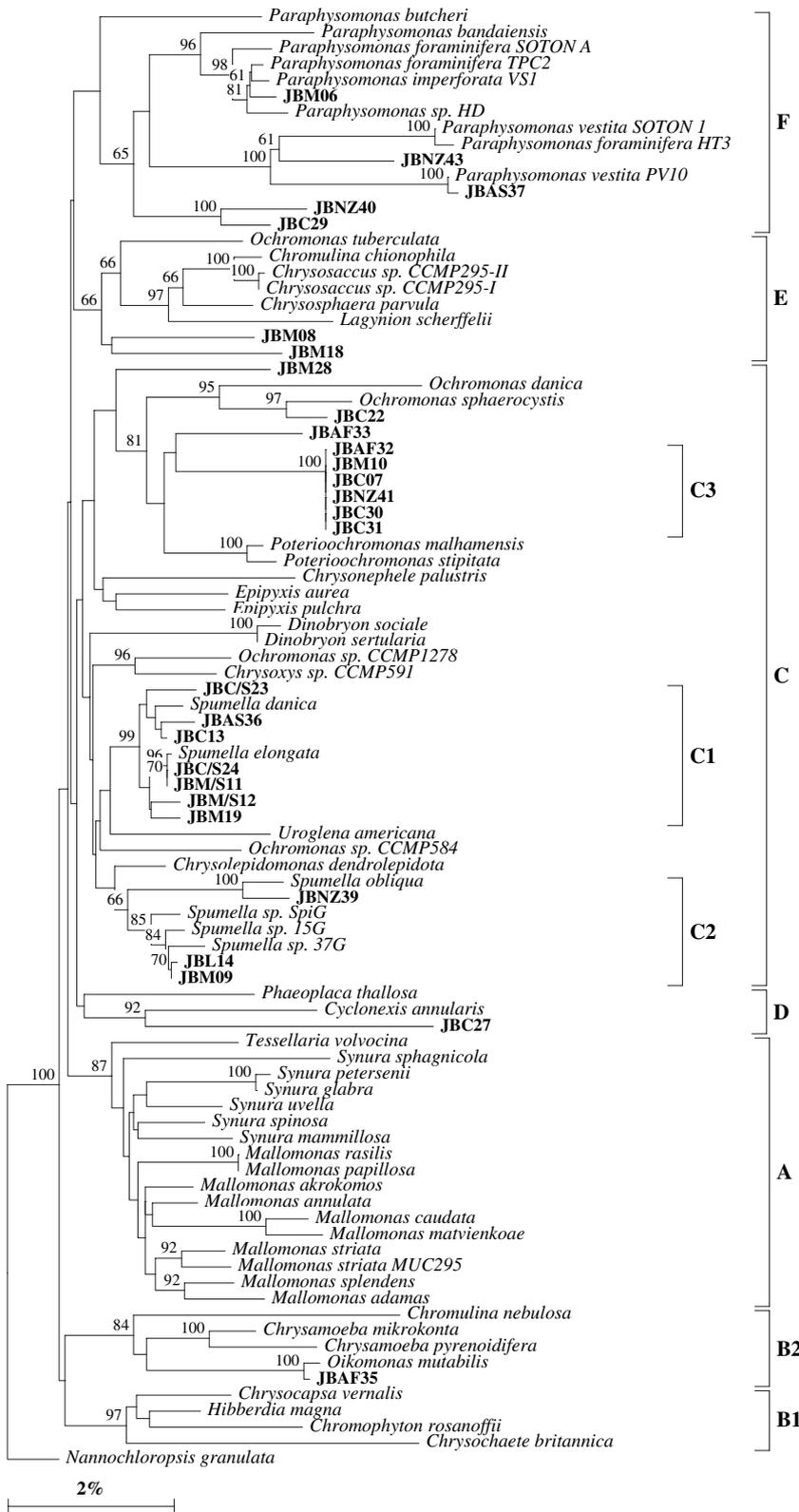


Fig. 1. Neighbour-joining tree showing the affiliation of 18S rRNA gene sequences from 'Spumella-like' isolates to the Chrysophyceae *sensu stricto*. The numbers at the nodes of the tree indicate percentage of bootstrap values for each node out of 100 bootstrap resamplings (values above 60 are shown). The scale bar indicates 2% estimated sequence divergence.

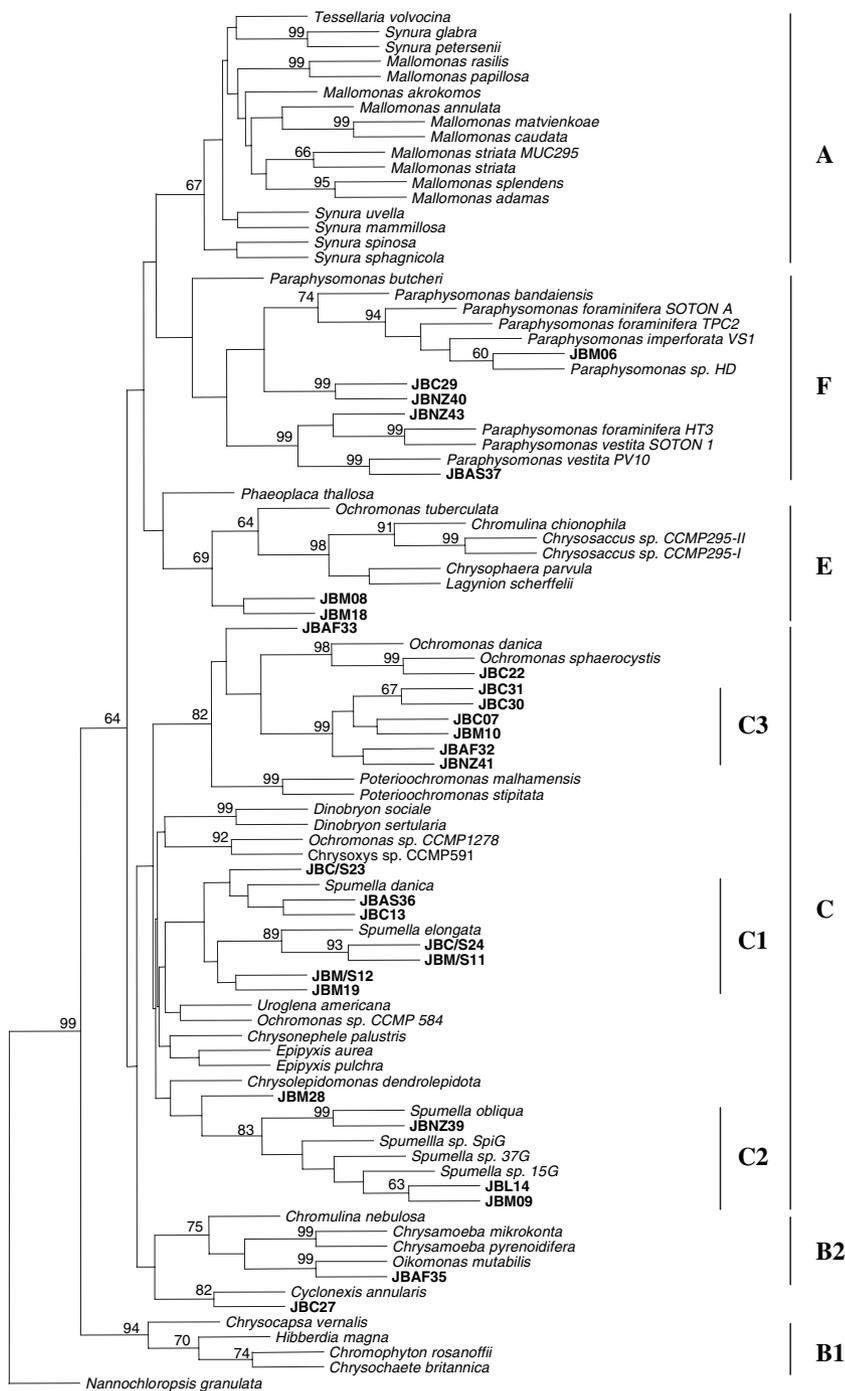


Fig. 2. Parsimony tree showing the affiliation of 18S rRNA gene sequences from 'Spumella-like' isolates to the Chrysophyceae *sensu stricto*. The numbers at the nodes of the tree indicate percentage of bootstrap values for each node out of 100 bootstrap resamplings (values above 60 are shown).

conclusion seems to be supported by the high 18S rRNA gene sequence similarity of JBAF35 and *Oikomonas mutabilis*. We observed, however, no consistent trend in length and visibility of the short flagellum, and a distinction between *Spumella* and *Oikomonas* based on only this character may be problematic. In general, the lack of distinctive characters in the 'Spumella-like' flagellates, as discussed above, may not allow for the separation of taxa based solely on morphological characters.

Some prominent genera within the chrysophytes seem to be polyphyletic

In agreement with the study of Andersen and colleagues (1999) we found indications that *Ochromonas* is polyphyletic and occupied different branches within clade C and clade E. Polyphyly can also be expected for the colourless analogue of *Ochromonas*, i.e. *Spumella*. In fact, we found a high 18S rRNA gene diversity of the

'*Spumella*-like' flagellates, which grouped within different clades in the class Chrysophyceae *sensu stricto* (Andersen *et al.*, 1999). Isolates affiliated with the cluster F belong to the genus *Paraphysomonas* as they possess scales (G. Novarino pers. comm.). The genus *Spumella*, however, is polyphyletic and distributed throughout at least three subclusters which are characterized by isolates of different habitat types. All isolates from soil were affiliated with cluster C1. There are also three aquatic isolates grouping within this cluster, but we cannot exclude the possibility that these strains were introduced into the aquatic environment from the surrounding soils. Further studies are required to prove that SSU rRNA gene sequences are a useful marker to distinguish '*Spumella*-like' soil flagellates from aquatic strains. Similarly, it may be possible to attribute some rough ecological characteristics to the subcluster C3 strains. Most strains of the C3 cluster originated from shallow, often eutrophic habitats and our attempts to obtain axenic flagellate cultures succeeded only with isolates from this cluster (J. Boenigk, unpublished data). This suggests that some essential factors can be synthesized by these isolates in laboratory cultures. Specific nutritive requirements of chrysophytes are already indicated for the mixotrophic genera *Ochromonas* and *Poterioochromonas* (cf. Holen and Boraas, 1995).

The 'Spumella-like' flagellates are a diverse group both in terms of sequence dissimilarity between isolates and in terms of the number of genotypes

The phylogenetic distance to known sequences was high for many of our isolates and thus the '*Spumella*-like' flagellates seem to be a very diverse group. Isolation attempts from samples obtained from 24 ecologically contrasting freshwater and soil habitats located in six climatic zones resulted in 28 isolates distributed over the entire SSU rRNA tree of the Chrysophyceae *sensu stricto*. Some of these isolates, e.g. JBM18 probably represent even novel lineages within this group, indicating that analysis of further isolates is necessary to support these lineages. Furthermore, we probably even underestimated the diversity of these flagellates, as the isolation approach we used in our study must be assumed to be selective: isolation efficiency using direct dilution of environmental samples was as low as 1–2% only, but could be increased to >10–20% by way of short-term acclimatization. The isolation procedure we used selected for small bacterivorous flagellates with medium to high growth rates, probably resulting in the isolation of only the fast-growing fraction of the '*Spumella*-like' organisms. Long-term controls confirmed that the positive growth of these flagellates could be definitely detected within the subculturing periods of 5–7 days and it can be assumed

that at least these acclimatized flagellates in particular were the only fast-growing strains. Except the bias resulting from the initial treatment, i.e. cell losses because of sampling and shifts during the initial acclimatization period, a further bias resulting from the isolation protocol is therefore assumed to be low. The literature data on isolation efficiency are rare, but low isolation efficiency has also been observed by other researchers (G. Novarino, pers. comm.). Low efficiency of isolation is also supported by the contrasting high diversity of free-living protists and the relatively small group of protists successfully cultured in the laboratory (cf. Cowling, 1991). Recently, culture-independent molecular surveys on eukaryotic diversity in marine systems suggest that, there still is undescribed protistan diversity, particularly among small eukaryotic organisms (Moreira and Lopez-Garcia, 2002 and references therein). As isolation procedures often include an acclimatization period (Caron, 1993; Atkins *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2001), the dominance of the so-called 'laboratory weeds' do not, however, necessarily reflect a differential ability to grow in culture, but may indicate that these usually fast-growing organisms overgrow other protists during this acclimatization and consequently are isolated more often. The diversity of the '*Spumella*-like' flagellates must therefore be assumed to be even higher than is reported in this study. Given the fact that such a diverse group as the '*Spumella*-like' flagellates, which based on our sequence data probably comprises different independent lineages, is usually pooled in field investigations it is not surprising that correlations with habitat characteristics and environmental factors are often weak.

Organisms affiliated with the 'Spumella-like' clusters C1 through C3 seem to be distributed worldwide but ecophysiological characteristics seem to differ

Diversity of protists and protist species richness are currently controversially discussed, mainly based on organisms possessing suitable morphological features, such as ciliates and the colourless chrysophyte genus *Paraphysomonas* (Finlay and Clarke, 1999a,b; Finlay and Fenchel, 1999; Foissner, 1999; Finlay, 2002). For instance, specific protistan morphotypes and even the same genotypes have been reported from different locations all over the world (Finlay, 2002). For the '*Spumella*-like' flagellates, because of the scarcity of both morphological features and molecular data, estimates of the diversity and their biogeographic distribution are even more complicated and it has even been proposed that most described species may belong to other taxa (Preisig *et al.*, 1991). Consequently, the '*Spumella*-like' flagellates are mostly pooled in ecological studies ('*Spumella*-like' flagellates or *Spumella* spp.) and this

group often comprises some *Paraphysomonas* spp. as well, because these two groups cannot sufficiently be separated by light microscopy (e.g. Weitere and Arndt, 2003). These 'Spumella-like' flagellates are present in most ecosystems and are of general importance as one of the main eukaryotic heterotrophs in a variety of ecosystems often accounting for 20–50% of pelagic heterotrophic nanoflagellates (Carrick and Fahnenstiel, 1989; Sanders *et al.*, 1989; Bennet *et al.*, 1990; Carrias *et al.*, 1998; Arndt *et al.*, 2000; Weitere and Arndt, 2003). The 'Spumella-like' flagellates therefore are regarded as a ubiquitous, worldwide-distributed group commonly found in freshwaters, soils and marine sites (Preisig *et al.*, 1991). Accordingly, we detected 'Spumella-like' organisms in all of the samples. In the 5 µm fraction these organisms were among the dominant organisms in most of the processed samples. Despite the lack of morphological distinctive characteristics we found evidence for a global distribution of closely related strains: For instance, the same genotype in terms of the 18S rRNA gene sequence similarity was successfully isolated from freshwater habitats located in Austria, China, New Zealand and East Africa, and very similar genotypes (>99.6% 18S rRNA gene sequence similarity) were obtained from soil habitats located in Austria, the UK and China. On the basis of the 18S rRNA gene sequence similarity, our findings may support the hypothesis of a worldwide distribution of microbial species (Finlay, 2002). Identical and very similar 18S rRNA sequences for eukaryotic microorganisms originating from geographically distant sites have been reported also for marine flagellates and marine clone sequences (Atkins *et al.*, 2000; Massana *et al.*, 2004). Although multiple rRNA gene copies with sequence variations seem to be present among different taxa of eukaryotic microorganisms (Ward *et al.*, 1997; Rocio *et al.*, 1998), we could not find any. However, eukaryotic microorganisms with very similar or identical rRNA gene sequence may show more differences in the more variable internal transcribed spacer (ITS) region (Tsuchiya *et al.*, 2003). It remains to be evaluated if ITS-sequences may also aid in revealing cryptic speciation in heterotrophic nanoflagellates.

However, despite the high 18S rRNA gene sequence similarities of strains from geographically remote sampling sites, there are indications for ecological differences between these isolates. For instance, the isolates JBC07, JBM10 and JBNZ41 (18S rRNA gene sequence similarity 100%), respond differentially to ecological factors such as food concentration, food quality and suspended sediment concentrations (Boenigk *et al.*, 2004; K. Pfandl, J. Boenigk and A. Wiedroither, in prep.). These findings corroborate the idea that molecular data on the basis of the 18S rRNA gene may not suffice in separating ecologically different taxa and ecotypes. The above rough

trends concerning ecological key parameters should therefore be interpreted carefully.

Conclusions

On the basis of these 18S rRNA gene sequence data, global distribution of the 'Spumella-like' flagellates must be assumed, but there are indications that even closely related isolates show different ecophysiological abilities, which may restrict these organisms to a certain habitat or geographical region. Following our phylogenetic analysis we conclude that: (i) the 'Spumella-like' flagellates are a very diverse group, and deduced from the relatively high phylogenetic distance of many isolates to the next known organisms, diversity seems to still be strongly underestimated; (ii) several chrysophycean genera including *Ochromonas* and *Spumella* are polyphyletic; and (iii) based on the SSU rRNA gene sequence there are thus far no indications for a geographic restriction, but there may be different ecophysiological abilities characterizing certain branches of 'Spumella-like' flagellates.

Experimental procedures

Sampling sites

Samples from 24 ecologically contrasting freshwater and soil habitats located in six climatic zones were processed in order to isolate representative 'Spumella-like' flagellates (Table 1). Samples taken from Lake Mondsee and sampling sites in Mondsee were immediately processed after sampling. Samples from the other lakes in the Salzkammergut area were processed within 6 h after sampling. All other samples were transported to the laboratory in sealed tubes and processed within a few days after sampling. All treatments after sampling were carried out under aseptic conditions.

Media for isolation and the maintenance of strains

Standard medium for the maintenance of strains and for the isolation process, except for the first step, was an artificial inorganic basal medium (NSY medium: Hahn *et al.*, 2003). Sterile-filtrated lake water for the first isolation step was prepared using water sampled from a depth of 1 m in Lake Mondsee. Water was filtrated through 0.1 µm gauze and subsequently repeatedly heated in the microwave for 7.5 min at 700 W. This procedure killed all of the bacteria that might have been present in the filtrate. To obtain lake water containing a natural bacterial assemblage as a food source, the lake water was filtered through 1.2 µm filters. This filtrate contained 2–3 × 10⁶ bacteria per millilitre.

Different bacterial strains, representatives of typical free-living aquatic bacteria and a natural bacterial community were used as food for isolating flagellates: The ultramicrobacterial actinobacterium strain (<0.1 µm³) MWH-Mo1 [closest known relative *Clavibacter michiganensis* (Microbacteriaceae); Hahn *et al.*, 2003], the bacterial strain *Listonella pelagia* CB5 (Hahn, 1997), and a natural bacterial

community from Lake Mondsee sampled from a depth of 1 m (for isolation of strains from Lake Mondsee only). The filtrate was subsequently checked for flagellate contamination. After successful isolation of the flagellate strains, they were transferred to permanent culture using NSY medium supplemented with wheat grain.

Isolation protocol

A modified filtration–acclimatization method (Hahn *et al.*, 2004) adjusted for the isolation of flagellates was used. Briefly, 5–20 ml of the sample was filtered through 5 µm-pore-size filters (Minisart syringe filters; Sartorius, Göttingen, Germany) and collected in sterile Erlenmeyer flasks. After 16–24 h of acclimatization at 15–25°C depending on the origin of the samples, subsamples of 5 ml were stepwise diluted (three subsequent 1:1 dilutions) with sterile-filtrated lake water. After 2–4 h the flagellates were counted using a Sedgewick-Rafter chamber, and a subsample was diluted into a final flagellate abundance of 0.5–1 flagellates per millilitre and subsequently transferred to two to four 24-well cell culture plates. Wells were supplemented with food bacteria at a concentration of $3\text{--}5 \times 10^6$ bacteria per millilitre, i.e. either a 1.2 µm filtrate of freshly sampled lake water (only for samples from Lake Mondsee), or cultures of the bacterial strains MWH-Mo1 or *L. pelagia* CB5.

Wells were checked every second day for a period of at least 2 weeks for positive growth under the microscope using a total magnification of 200×. When flagellate growth was detected, the medium was transferred to a 50 ml Erlenmeyer flask containing inorganic NSY medium and fresh food bacteria. After 2–6 days the subsamples were further diluted to a final concentration of 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 flagellates per millilitre and supplemented with the bacterial strains MWH-Mo1 or CB5 at a concentration of $15\text{--}25 \times 10^6$ bacteria per millilitre. Each of these dilutions were transferred to wells of sterile 24-well cell culture plates (1 ml per well) and incubated at 15–22°C depending on the origin of the isolates. Screening of the wells for the growth of flagellates was again performed by direct microscopical investigation every second day. Finally, flagellates were transferred to an Erlenmeyer flask containing fresh medium and bacteria. This procedure was repeated until pure cultures were established, but at least four times. Pure cultures were acclimatized to 15°C and transferred to permanent culture.

Isolation efficiency

The cultivable fraction of HNF was estimated by way of the direct dilution of freshwater samples. This test was only performed exemplarily for four samples from Lake Mondsee. Flagellates in the samples were counted using a live counting technique in a Sedgewick-Rafter chamber. A subsample was then diluted to a concentration of 0.5–1 flagellate per millilitre using 1.2 µm filtrated water from the same sample. Flagellate abundance was again checked and 1 ml was transferred to each well of 24-well cell culture plates and incubated at an *in situ* temperature. Altogether 16 plates were used per sample. The wells were checked microscopically for flagellates every two to three days for a period of at least 30 days.

DNA extraction and PCR of 18S rRNA genes

DNA was isolated from cell pellets or 0.5 ml cell cultures. Cells were incubated with 1.5 ml extraction buffer (10 mM Tris-HCl, 0.4% SDS, 10 mM EDTA) at 65°C, followed by incubation with proteinase K at 60°C (0.2 mg ml^{-1}). DNA was pelleted with ethanol after phenol-chloroform extraction. Small subunit ribosomal RNA genes were amplified using one of the two forward primers CTGGTTGATCCTGCCAG (*Paraphysomonas foraminifera* AB022864 position 30) and GAAACTGCGAATGGCTC (*P. foraminifera* position 109), and one of the two reverse primers GTAGGTGAACCTGCAG (*P. foraminifera* position 1824) and GTGAACCTGCAGAAGGATCA (*P. foraminifera* position 1828). The polymerase chain reaction (PCR) mixture contained 0.2 µM of each primer, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 2 mM MgCl₂, 1.25 U of Taq DNA polymerase (Qiagen), and 1× PCR buffer. Reactions were carried out in a PTC 200 thermocycler (MJ Research) starting with a denaturation at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 58°C for 1 min, elongation at 72°C for 2 min, and a final extension step of 10 min at 72°C. PCR products were checked on an agarose gel.

Sequencing of 18S rRNA genes and phylogenetic analysis

Polymerase chain reaction products were either directly sequenced or used for subsequent cloning into the vector pGEM-T Easy (Promega) by following the manufacturer's recommendations. Putative positive colonies were picked and directly amplified, using the vector primers T7 and SP6. The products were checked on an agarose gel. Sequencing reactions were performed with an ABI Prism® Big Dye™ Terminator v 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosciences) and an ABI PRISM model 3100 automated sequencer. Sequences were submitted to the BLAST search program of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to find closely related sequences. Sequences were aligned using the 'CLUSTAL W' option (Thompson *et al.*, 1997) in the BioEdit 5.0.9 sequence analysis software (Hall, 1999). Where necessary alignments were subsequently manually processed and corrected. Positions of unclear homology and AT-rich insertions were excluded from further phylogenetic analysis. The result was a final alignment of 1630 positions (including gaps). Sequence identities between isolates and the next related sequences were based on aligned whole gene sequences of equal length, and were calculated using the 'sequence identity matrix' option in BioEdit. The position of the unclear homology and A/T-rich insertions were excluded from further phylogenetic analysis. The TREECON 1.3b software package was used to calculate distance matrices by the Kimura algorithm (Kimura, 1980) and to generate phylogenetic trees by the neighbour-joining method (van de Peer and de Wachter, 1994). Parsimony trees were calculated using the program package PHYLIP (version 3.5; J. Felsenstein, Department of Genetics, University of Washington, Seattle). One hundred bootstrapped replicate resampling data were generated with SEQBOOT (PHYLIP). The full-length 18S rRNA gene sequences determined in this study have a length of 1695–1803 bp and have

been deposited in the NCBI database under accession numbers AY651071–651098.

Cell size and autofluorescence

Live cells from early stationary growth phase were taken for measuring cell dimensions. Cells were transferred to observation vessels (Boenigk and Arndt, 2000) and recorded on video tape using 500× to 1000× magnification. The length and width of at least 30 cells was measured directly from the video screen and the cell volume was calculated assuming an ellipsoid or a spherical cell shape. Cells were also checked for the occurrence of chloroplasts.

In addition, cells were checked for autofluorescence: Cells were fixed with formaldehyde (final concentration 2%) and stained with DAPI (final concentration 10 µg ml⁻¹) for 30 min. The cells were then filtered onto a black nucleopore 0.2 µm filter backed by a 0.45 µm cellulose nitrate filter and examined under an epifluorescence microscope using UV and blue light excitation for DAPI and for chlorophyll autofluorescence respectively.

Acknowledgements

The authors would like to thank M. Hahn and the participants of the international postgraduate course in limnology 2003 for obtaining water samples, and G. Novarino, T. Weisse and M. Hahn for their fruitful discussion. Furthermore, we would like to thank the Austrian Science Fund for the provided financial support (FWF project 15940).

References

- Andersson, A., Falk, S., Samuelsson, G., and Hagstrom, A. (1989) Nutritional characteristics of a mixotrophic nanoflagellate, *Ochromonas* sp. *Microb Ecol* **17**: 251–262.
- Andersen, R.A., van de Peer, Y., Potter, D., Sexton, J.P., Kawachi, M., and LaJeunesse, T. (1999) Phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the chryso-phyceae. *Protist* **150**: 71–84.
- Arndt, H., Dietrich, D., Auer, B., Cleven, E.J., Gräfenhan, T., Weitere, M., and Mylnikov, A.P. (2000) Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems. In *The Flagellates*. Leadbeater, B.S.C., and Green, J.C. (eds). London, UK: Taylor & Francis, pp. 240–268.
- Atkins, M.S., Teske, A.P., and Anderson, O.R. (2000) A survey of flagellate diversity at four deep-sea hydrothermal vents in the eastern Pacific Ocean using structural and molecular approaches. *J Eukaryot Microbiol* **47**: 400–411.
- Auer, B., and Arndt, H. (2001) Taxonomic composition and biomass of heterotrophic flagellates in relation to lake trophy and season. *Freshw Biol* **46**: 959–972.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A., and Thingstad, F. (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Series* **10**: 257–263.
- Belcher, J.H., and Swale, E.M.F. (1976) *Spumella elongata* (Stokes) nov. comb., a colourless flagellate from soil. *Arch Protistenkunde* **118**: 215–220.
- Bennet, S.J., Sanders, R.W., and Porter, K.G. (1990) Heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic nanoflagellates: seasonal abundances and bacterivory in a eutrophic lake. *Limnol Oceanogr* **35**: 1821–1832.
- Boenigk, J. (2002) Variability of ingestion rates with stage in cell cycle of a heterotrophic nanoflagellate (*Spumella* sp.) measured by an individual-based approach. *Europ J Protistol* **38**: 299–306.
- Boenigk, J., and Arndt, H. (2000) Comparative studies on the feeding behavior of two heterotrophic nanoflagellates: the filter-feeding choanoflagellate *Monosiga ovata* and the raptorial-feeding kinetoplastid *Rhynchomonas nasuta*. *Aquat Microb Ecol* **22**: 243–249.
- Boenigk, J., and Arndt, H. (2002) Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Anthony Van Leeuwenhoek* **81**: 465–480.
- Boenigk, J., Stadler, P., Wiedroither, A., and Hahn, M.W. (2004) Strain-specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5787–5793.
- Bourrelly, P. (1957) Recherches sur les chrysophycées. *Rev Algologique* **1**: 1–412.
- Bruchmüller, I. (1998) Molekularbiologische Charakterisierung und phylogenetische Einordnung heterotropher Nanoflagellaten und prostomatider Ciliaten des Süßwassers. Thesis. Plön, Germany: Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Caron, D.A. (1993) Enrichment, isolation, and culture of free-living heterotrophic flagellates. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. (eds). Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers, pp. 77–90.
- Caron, D.A., Lim, E.L., Dennett, M.R., Gast, R.J., Kosman, C., and DeLong, E.F. (1999) Molecular phylogenetic analysis of the heterotrophic chrysophyte genus *Paraphysomonas*, and the design of rRNA-targeted oligonucleotide probes for two species. *J Phycol* **35**: 824–837.
- Carrias, J.F., Amblard, C., Quiblier-Lloberas, C., and Bourdier, G. (1998) Seasonal dynamics of free and attached heterotrophic nanoflagellates in an oligomesotrophic lake. *Freshw Biol* **39**: 91–101.
- Carrick, H.J., and Fahnenstiel, G.L. (1989) Biomass, size structure, and composition of phototrophic and heterotrophic nanoflagellate communities in Lake Huron and Michigan. *Can J Fish Aquat Sci* **46**: 1922–1928.
- Cleven, E.J., and Weisse, T. (2001) Seasonal succession and taxon specific bacterial grazing rates of heterotrophic nanoflagellates in Lake Constance. *Aquat Microb Ecol* **23**: 147–161.
- Cowling, A.J. (1991) Free-living heterotrophic flagellates: methods of isolation and maintenance, including sources of strains in culture. In *The Biology of Free-Living Heterotrophic Flagellates*. Patterson, D.J., and Zöllfel, M. (eds). Oxford, UK: Clarendon Press, pp. 477–492.
- Fenchel, T. (1982a) Ecology of heterotrophic microflagellates. I. Some important forms and their functional morphology. *Mar Ecol Prog Series* **8**: 211–223.
- Fenchel, T. (1982b) Ecology of heterotrophic microflagellates. III. Adaptations to heterogeneous environments. *Mar Ecol Prog Series* **9**: 25–33.

- Finlay, B.J. (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**: 1061–1063.
- Finlay, B.J., and Clarke, K.J. (1999a) Ubiquitous dispersal of microbial species. *Nature* **400**: 828.
- Finlay, B.J., and Clarke, K.J. (1999b) Apparent global ubiquity of species in the protist genus *Paraphysomonas*. *Protist* **150**: 419–430.
- Finlay, B.J., and Fenchel, T. (1999) Divergent perspectives on protist species richness. *Protist* **150**: 229–233.
- Foissner, W. (1999) Protist diversity: estimates of the near-imponderable. *Protist* **150**: 363–368.
- Gunderson, J.H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle, K., and Sogin, M.L. (1987) Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5823–5827.
- Hahn, M.W. (1997) Experimentelle Untersuchungen zur Interaktion von bakterivoren Nanoflagellaten mit pelagischen Bakterien. Thesis. Braunschweig: TU Braunschweig.
- Hahn, M.W., Lünsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Höfle, M.G., Boenigk, J., and Stadler, P. (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1442–1451.
- Hahn, M.W., Stadler, P., Wu, Q.L., and Pöckl, M. (2004) The filtration–acclimatization–method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J Microbiol Meth* **57**: 379–390.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* **41**: 95–98.
- Holen, D.A., and Boraas, M.E. (1991) The feeding-behavior of *Spumella* Sp as a function of particle-size – implications for bacterial size in pelagic systems. *Hydrobiologia* **220**: 73–88.
- Holen, D.A., and Boraas, M.E. (1995) Mixotrophy in chrysophytes. In *Chrysophyte Algae: Ecology, Phylogeny, and Development*. Sandgren, C.D., Smol, J.P., and Kristiansen, J. (eds). Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 119–140.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**: 11–120.
- Kinner, N.E., Harvey, R.W., Blakeslee, K., Novarino, G., and Meeker, L.D. (1998) Size-selective predation on ground-water bacteria by nanoflagellates in an organic-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **64**: 618–625.
- Kristiansen, J. (1986) The ultrastructural bases of chrysophyte systematics and phylogeny. *CRC Crit Rev Plant Sci* **4**: 149–211.
- Kristiansen, J. (1990) Phylum Chrysophyta. In *Handbook of Protozoista*. Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., and Chapman, D.J. (eds). Boston, MA, USA: Jones & Bartlett, pp. 438–453.
- Lim, E.L., Dennett, M.R., and Caron, D.A. (2001) Identification of heterotrophic nanoflagellates by restriction fragment length polymorphism analysis of small subunit ribosomal DNA. *J Eukaryot Microbiol* **48**: 247–257.
- Massana, R., Castresana, J., Balague, V., Guillou, L., Romari, K., Grosillier, A., et al. (2004) Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3528–3534.
- Moreira, D., and Lopez-Garcia, P. (2002) The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends Microbiol* **10**: 31–38.
- van de Peer, Y., and de Wachter, R. (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Applic Biosci* **10**: 569–570.
- Preisig, H.R. (1995) A modern concept of chrysophyte classification. In *Chrysophyte Algae: Ecology, Phylogeny, and Development*. Sandgren, C.D., Smol, J.P., and Kristiansen, J. (eds). Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 46–74.
- Preisig, H.R., Vørs, N., and Hällfors, G. (1991) Diversity of heterotrophic heterokont flagellates. In *The Biology of Free-Living Heterotrophic Flagellates*. Patterson, D.J., and Larsen, J. (eds). Oxford, UK: Clarendon Press, pp. 361–399.
- Rice, J., O'Connor, C.D., Sleigh, M.A., Burkill, P.H., Giles, I.G., and Zubkov, M.V. (1997) Fluorescent oligonucleotide rDNA probes that specifically bind to a common nanoflagellate, *Paraphysomonas vestita*. *Microbiology* **143**: 1717–1727.
- Rocio, I., de Doncker, S., Gomez, J., Lopez, M., Garcia, R., Le Ray, D., et al. (1998) Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*. *Mol Biochem Parasitol* **92**: 219–228.
- Rothhaupt, K.O. (1997) Nutrient turnover by freshwater bacterivorous flagellates: differences between a heterotrophic and a mixotrophic chrysophyte. *Aquat Microb Ecol* **12**: 65–70.
- Salbrechter, M., and Arndt, H. (1994) The annual cycle of protozooplankton in the alpine-mesotrophic Lake Mondsee (Austria). *Mar Microb Food Webs* **8**: 217–234.
- Sanders, R.W., Porter, K.G., Bennett, S.J., and DeBiase, A.E. (1989) Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers, and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnol Oceanogr* **34**: 673–687.
- Sanders, R.W., Leeper, D.A., King, C.H., and Porter, K.G. (1994) Grazing by rotifers and crustacean zooplankton on nanoplanktonic protists. *Hydrobiologia* **288**: 167–181.
- Saunders, G.W., Hill, D.R.A., and Tyler, P.A. (1997) Phylogenetic affinities of *Chrysonephle palustris* (Chrysophyceae) based on inferred nuclear small-subunit ribosomal RNA sequence. *J Phycol* **33**: 132–134.
- Sherr, E.B., and Sherr, B.F. (1994) Bacterivory and herbivory – key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *Microb Ecol* **28**: 223–235.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**: 4876–4882.
- Tsuchiya, M., Kitazato, H., and Pawlowski, J. (2003) Analysis of internal transcribed spacer of ribosomal DNA reveals cryptic speciation in *Planaglabratella opercularis*. *J Foramin Res* **33**: 285–293.
- Ward, J.G., Blomberg, P., Hoffman, N., and Yao, M.C. (1997) The intranuclear organization of normal, hemizygous and excision-deficient rRNA genes during developmental amplification in *Tetrahymena thermophila*. *Chromosoma (Berlin)* **106**: 233–242.
- Weisse, T. (1997) Growth and production of heterotrophic

- nanoflagellates in a meso-eutrophic lake. *J Plankton Res* **19**: 703–722.
- Weisse, T. (2002) The significance of inter- and intraspecific variation in bacterivorous and herbivorous protists. *Antonie V Leeuwenhoek* **81**: 327–341.
- Weitere, M., and Arndt, H. (2003) Structure of the heterotrophic flagellate community in the water column of the river Rhine (Germany). *Europ J Protistol* **39**: 287–300.
- Wylie, J.L., and Currie, D.J. (1991) The relative importance of bacteria and algae as food sources for crustacean zooplankton. *Limnol Oceanogr* **36**: 708–728.
- Zwart, K.B., and Darbyshire, J.F. (1992) Growth and nitrogenous excretion of a common soil flagellate *Spumella* sp. – a laboratory experiment. *J Soil Sci* **43**: 145–157.

Dispersal and Phylogenetic Diversity of Nonmarine Picocyanobacteria, Inferred from 16S rRNA Gene and *cpcBA*-Intergenic Spacer Sequence Analyses

Nicholas D. Crosbie,* Matthias Pöckl, and Thomas Weisse

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, A-5310 Mondsee, Austria

Received 9 April 2003/Accepted 27 June 2003

More than 20 *Synechococcus* and *Cyanobium* isolates were obtained from central European subalpine lakes and sequenced for their 16S rRNA gene and part of the phycocyanin operon (*cpc*), specifically the intergenic spacer (IGS) between *cpcB* and *cpcA*, and corresponding flanking regions (*cpcBA*-IGS). Maximum-likelihood analyses revealed the existence of at least six to seven clusters of nonmarine picocyanobacteria within the picophytoplankton clade and support the conjecture of global dispersal for some closely related picocyanobacterial genotypes.

Due to their significance for global biogeochemical cycling, recent research has focused on deciphering the genotypic and phenotypic diversity of marine picocyanobacteria (17, 30, 38). Comparatively sparse information is available on the dispersal and diversity of freshwater picocyanobacteria, although their genotypic differences and ecological significance have been studied in great detail for some lakes (4, 35). Recently, Ernst et al. (10) suggested that strain clusters belonging to the nonmarine branch of the picophytoplankton clade sensu Urbach et al. (38) have undergone ecosystem-dependent adaptive radiations within several brackish, freshwater and saline (Antarctic) lake environments. This conclusion is an apparent contradiction of the common conjecture that many free-living microbial species have a global distribution because their small size and great abundance result in dispersal which is rarely (if ever) restricted by geographical boundaries (13, 14). This argument has been known for a long time and is commonly referred to as the “everything is everywhere” hypothesis (2).

It is at present difficult to test this hypothesis for picocyanobacteria, because the genetics and ecophysiology of most picocyanobacteria remain poorly understood, and, furthermore, there is often no simple correlation between genotypic and phenotypic diversity (10). The phylogenetic analysis of Ernst and colleagues (10) and their inferences on dispersal and evolution of freshwater picocyanobacteria were derived from a limited number of strains.

Based upon a refined analysis originating from a larger database (with >20 new rRNA gene sequences), we show that some closely related forms are widely dispersed and that taxon undersampling may have resulted in premature phylogenetic inferences in the analysis of Ernst et al. (10). The implications of our findings are discussed in relation to the description of (microbial) ecotypes adapted to environments where the potential for widespread dispersal is high.

Source, isolation, and maintenance of cultures. To avoid culture bias resulting from the use of standard plating techniques—these may favor the isolation of, e.g., phycocyanin-rich strains (9), which comprise a small fraction of picocyanobacteria inhabiting subalpine lakes (42)—we used single-cell sorting (MW isolates [7]) and the dilution culture technique (MH isolates) to obtain isolates from the surface 20-m water column of the oligo-mesotrophic lakes Mondsee and Hallstättersee, both deep subalpine lakes located in Upper Austria. The non-axenic isolates were maintained in BG11 (34) at 15°C and under low light (white light, 10 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, continuously supplied by Osram “cool-white” fluorescent tubes) (henceforth referred to as standard culture conditions).

Assignment to pigment groups. A Zeiss Axioplan microscope was used to differentiate phycoerythrin (PE)- and phycocyanin (PC)-rich isolates based upon their epifluorescent characteristics under blue (Zeiss filter set 05) and green excitation (Zeiss filter set 14) (21, 43) in comparison to the reference strains BO 8801, BO 8807, and BO 8809 (11), grown under standard culture conditions. PE-rich isolates were characterized by their orange-red fluorescence under green excitation and their yellow-orange fluorescence under blue excitation. PC-rich isolates appeared purple-red or red at both green and blue excitation.

DNA isolation, PCR amplification, and sequencing. Near-full-length 16S rRNA gene sequences were determined for 21 *Synechococcus* and *Cyanobium* isolates sensu Castenholtz (5). The less conserved intergenic spacer (IGS) between *cpcB* and *cpcA*, and corresponding flanking regions (henceforth referred to as *cpcBA*-IGS), were sequenced for 25 *Synechococcus* and *Cyanobium* isolates. These gene sequences have been targeted in previous phylogenetic studies of picocyanobacteria (29).

DNA was extracted from 10 ml of culture material using the FastDNA kit and FastPrep instrument (Bio 101). 16S rRNA gene and *cpcBA*-IGS sequences were amplified using cyanobacterium-specific primer pairs, 16S5'F (AGAGTTTGATC CTGGCTCAG) and B23S5'R (CTTCGCCTCTGTGTGCCT AGGT) (19, 32) and *cpcBF*(UFP) (TAGTGTAACGACG GCCAGTTGYYTKCGCGACATGGA) and *cpcAR*(URP)

* Corresponding author. Present address: Ocean Genome Legacy, 32 Tozer Rd., Beverly, MA 01915. Phone: 43 6232 3125 45. Fax: 43 6232 3578. E-mail: crosbie@neb.com.

(TAGCAGGAAACAGCTATGACGTGGTGTARGGGAA YTT) (29), respectively. PCRs were done in 25- μ l volumes, with final concentrations of reactants as follows: for the 16S rRNA gene PCR, 0.2 mM (each) deoxynucleoside triphosphate, 0.4 μ M (each) primer, ca. 100 ng of template DNA, 1 mg of bovine serum albumin ml⁻¹, 1.5 mM MgSO₄, and 0.4 to 0.8 U of high-fidelity SuperTaq (Ambion) polymerase; for the *cpcBA*-IGS PCR, 0.3 mM (each) deoxynucleoside triphosphate, 0.5 μ M (each) primer, 10 to 100 ng of template DNA, 2.5 mM MgCl₂, and 0.5 U of *Taq* (Qiagen) polymerase. Cycling parameters are given in the work of Scheldeman et al. (32) (for 16S rRNA gene PCR) and Robertson et al. (29) (for *cpcBA*-IGS PCR). PCRs were performed in multiples, and products were pooled, purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen), and then sequenced (VBC Genomics) bidirectionally.

Sequence alignment and phylogenetic analyses. CLUSTALX (37) and the ARB (<http://www.arb-home.de>) automatic alignment tool (Fast Aligner, version 1.03) were used to produce working alignments of the *cpcBA*-IGS and 16S rRNA gene sequences, respectively. The final alignments were obtained by manual refinement, taking into account structural constraints (16S rRNA gene sequences: secondary structure models available from the Comparative RNA Web Site (<http://www.rna.icmb.utexas.edu>); *cpcBA*-IGS sequences: amino acid alignment given as Table 23 in the supplement to Bickel et al. (3). After the removal of hypervariable (50% conservation filter implemented in ARB using the filter by base frequency function; see Ludwig and Klenk [20] for a discussion on the use of filters in phylogenetic analysis) and other potentially misleading sites, the alignments used in phylogenetic analyses consisted of 1,383 (16S rRNA gene sequences) and 362 (*cpcBA*-IGS sequences) nucleotide positions. Pairwise nucleotide sequence identities were calculated from the full-length alignments using uncorrected distances and excluding sequences from putative coisolates (i.e., isolates originating from the same water sample and identical in both 16S rRNA gene and *cpcBA*-IGS sequence sets), poorly aligned columns (i.e., most of the IGS between *cpcB* and *cpcA*), and sites with ambiguous (i.e., codes M, R, W, Y, etc.) bases. Maximum-likelihood (12) trees were inferred with TREEFINDER (<http://www.treefinder.de>), assuming the GTR + Γ model of nucleotide substitution. For both the 16S rRNA gene and *cpcBA*-IGS data sets, GTR + Γ was the best-fit model of nucleotide substitution according to analyses performed with ModelTest (27).

Synechococcus PCC 6301 (formerly *Anacystis nidulans*) was chosen as the outgroup since it forms, together with PCC 7943 and PCC 7942, a paraphyletic group closely related to but well separated from the picophytoplankton clade sensu Urbach et al. (38) (10; N. D. Crosbie, unpublished analyses).

The *cpcBA*-IGS sequence set was examined for recombination events using a substitution method sensu Posada (26) as implemented in Geneconv 1.81 (S. A. Sawyer [<http://www.math.wustl.edu/~sawyer>]). The global permutation *P* values based on BLAST-like global scores (10,000 replicates) smaller than 0.05 were considered as evidence of recombination. A multiple-comparison correction (Bonferroni) is already built into the *P* values. The default value of the parameter *gscale* (*gscale* = 0) was used.

Results of phylogenetic analyses. Phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene sequences revealed a high pairwise similarity for all freshwater picocyanobacteria (Fig. 1). Overall, the near-full-length 16S rRNA gene sequences obtained from 67 inland water picocyanobacterial isolates differed by a maximum of 5% in pairwise comparisons (average pairwise sequence identity, 98%; calculations excluded isolate PS-845 and isolates from Antarctic saline lakes). Our cluster designations (and their nomenclature) are based on the groups proposed originally by Robertson et al. (29), with modifications according to Ernst et al. (10).

Many of our new PE-rich isolates from Lakes Mondsee and Hallstättersee clustered with isolates obtained from other subalpine lakes, falling into two groups, B (= subalpine cluster I) and H. The new group, H, consists of seven closely related (average pairwise sequence similarity for the 16S rRNA gene, 99.9%) isolates from L. Mondsee and one isolate from Japanese Lake Biwa. Additionally we propose the new group I, which contains three PC-rich isolates from L. Mondsee and one PC-rich isolate from an Arctic tundra pond. Isolates forming group H and those obtained from L. Hallstättersee exhibited a greater tendency to form cell aggregations under standard culture conditions. All isolates obtained in this study were coccoid with the exception of MH 305, MH 307, and MW 76B2, which formed rods. The latter isolate appears to be identical to BO 8807, which also exhibits a rod morphology (10).

A maximum-likelihood tree derived from the *cpcBA*-IGS gene sequences of 59 isolates, including 25 new *Synechococcus* and *Cyanobium* isolates from subalpine lakes, was constructed based upon an unambiguous alignment of 362 nucleotides (nt) (Fig. 2). The overall pattern was consistent with the 16S rRNA gene-based phylogeny (Fig. 1)—for example, the new groups H and I were evident in both trees—but demonstrates, however, that subalpine cluster I (10) is not exclusive for subalpine central European lakes (Fig. 2).

Isolates obtained from widely separated locations shared up to 99.87% identity in 16S rRNA gene sequences (e.g., the PC-rich isolates P211 and MW 100C3 differed in two nt positions; Fig. 1, bottom) and up to 99.72% in *cpcBA*-IGS sequences (e.g., the PE-rich isolates PS-714 and BO 8807 differed in one nucleotide position; Fig. 2, top).

As originally observed by Robertson et al. (29), the length of the IGS separating *cpcB* and *cpcA* exhibited a strong relationship with phylogenetic groups (Fig. 2). Additionally, two isolates (PS-727 and PS-729) having an IGS length inconsistent with their initial (i.e., in the work of Robertson et al. [29]) classification in group B, were clearly separated in our phylogenetic analyses of the larger *cpcBA*-IGS data set (cf. Robertson et al. [29]).

With respect to terminal branching patterns, the results suggest a high degree of congruence between 16S rRNA gene- and *cpcBA*-IGS-based phylogenies of the nonmarine members of the picophytoplankton clade, though with less well delineated subgroups in the more conserved 16S rRNA gene phylogeny (29; this study). Contrary to the observations of Ernst et al. (10) and in agreement with Robertson et al. (29), we found a moderate and strong correlation between phylogenetic clusters and pigment group assignment in the 16S rRNA gene- and *cpcBA*-IGS-based phylogenetic analyses, respectively. We con-

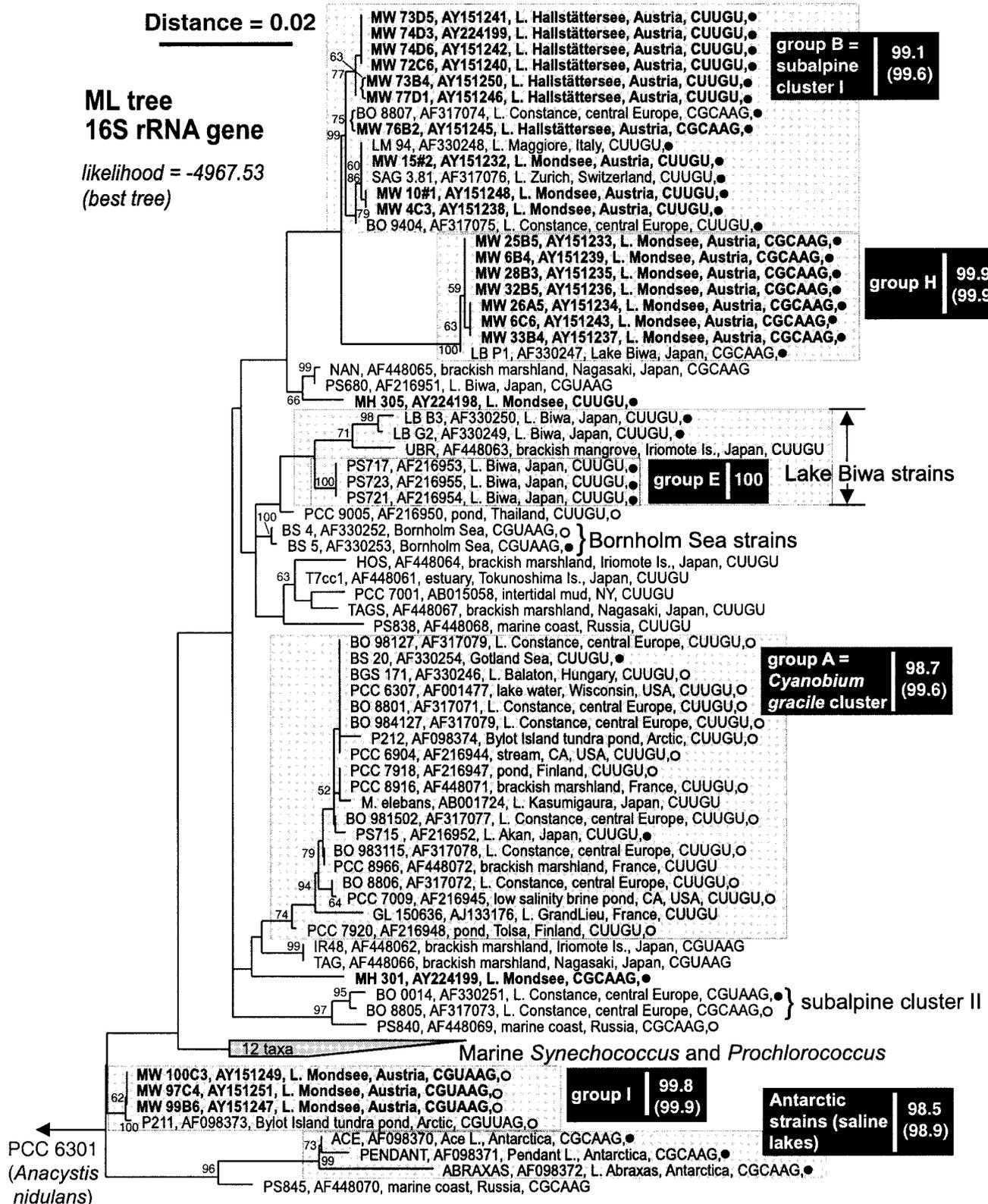


FIG. 1. Maximum-likelihood tree of the picophytoplankton clade sensu Urbach et al. (38), inferred from 16S rRNA gene sequences (1,383 nt positions). Terminal branches display isolate and GenBank accession numbers (given in bold font for sequences determined in this study), isolation details (location, habitat), helix 49 tetraloop motif, and pigment group (●, PE rich; ○, PC rich). Numbers at nodes indicate the percent bootstrap frequency (1,000 replicates) obtained from neighbor-joining (31) trees calculated by TREECON for Windows (39) assuming a Jukes-Cantor model of nucleotide substitution. Bootstrap values of <50% are not shown. Minimum and mean (parentheses) pairwise percent similarities are shown on the right-hand side of each group label. Sources: results herein, references 10, 28, 29, and 40; Warwick Vincent, personal communication (isolation details for P211 and P212); and Watanabe, personal communication (isolation details for NAN, UBR, HOS, T7cc1, TAG, TAGS, IR48 PS-838, PS-840, and PS-845). The Ernst et al. (10) cluster designations subalpine cluster I, Lake Biwa strains, Bornholm Sea strains, *Cyanobium gracile* cluster, and subalpine cluster II are also provided. The outgroup was *Synechococcus* PCC 6301 (formerly *Anacystis nidulans*).

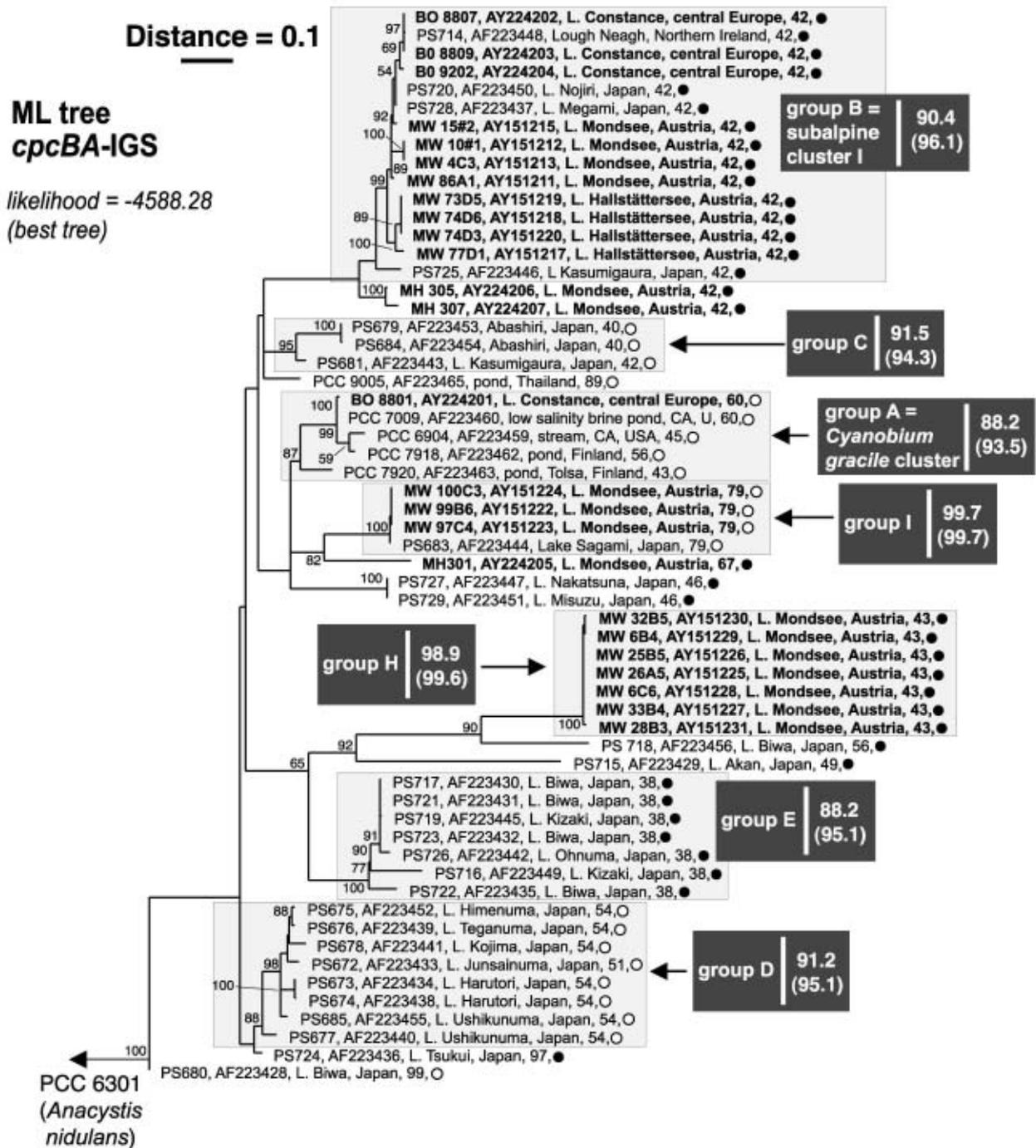


FIG. 2. Maximum-likelihood tree of the picophytoplankton clade sensu Urbach et al. (38), inferred from *cpcBA*-IGS gene sequences (362 nt positions). Terminal branches display isolate and GenBank accession numbers (given in bold font for sequences determined in this study), isolation details (location, habitat), IGS length (number of nucleotides), and pigment group (●, PE rich; ○, PC rich). Numbers at nodes indicate the percent bootstrap frequency (1,000 replicates) obtained from neighbor-joining (31) trees calculated by TREECON for Windows (39) assuming a Jukes-Cantor model of nucleotide substitution. Bootstrap values of <50% are not shown. Minimum and mean (parentheses) pairwise percent similarities are shown on the right-hand side of each group label. Sources: results herein and reference 29. The Ernst et al. (10) cluster designations subalpine cluster I and *Cyanobium gracile* cluster are also provided. The outgroup was *Synechococcus* PCC 6301 (formerly *Anacystis nidulans*).

firm, however, that both pigment types (i.e., PE- or PC-rich) can be found in some closely related isolates (e.g., isolates forming group A).

In the 16S rRNA gene sequence set, a pattern suggesting motif exchange (e.g., compare the helix 49 motif pattern of

isolates BO 8807 and MW 76B2 [group B] with the helix 49 motif pattern of group H isolates—see Fig. 1), involving the terminal loop of helix 49 and its closing base pair (reference 10 and results herein), could have resulted from horizontal transfer (the “simplified complexity hypothesis”; see reference 41)

and/or from endogenous processes (15). From X-ray structures, helix 49 appears not to be in contact with any other molecules within the ribosome and belongs to the group of rRNA hairpins exhibiting variable length and variable loop sequences (16).

Deep-branching patterns were sensitive to hypervariable sites (i.e., those removed by a 50% conservation filter) and the inclusion or exclusion of the helix 49 tetraloop motif (6 nt positions in the alignment) in the 16S rRNA gene sequence matrix subjected to phylogenetic analyses. Notably, PE-rich Antarctic isolates obtained from marine-derived saline lakes (28) and PS-845 (isolation details suggest a marine origin; M. M. Watanabe, personal communication) clustered with PC-rich freshwater isolates obtained from the Arctic (Bylot Island ponds) and central Europe (Lakes Mondsee and Constance) when the motif was included (results not shown). When excluded (either separately or together with hypervariable sites), the Antarctic isolates clustered together with PS-845 at the base of the picophytoplankton clade (Fig. 1). Although we could find no evidence of recombination in the set of picocyanobacterial *cpcBA*-IGS sequences ($P > 0.05$), the potential for spurious phylogenies (18, 22) was minimized by restricting analyses to an alignment made almost entirely from the flanking regions. A similar approach was taken by Robertson et al. (29).

Global dispersal versus ecosystem-dependent radiation.

While certain groups of freshwater picocyanobacteria may have arisen in a specific ecosystem type (e.g., deep subalpine lakes), the frequency and widespread nature of microbial dispersal (13) would all but ensure that newly adapted strains and their progenitors are dispersed to widely separated locations. Given conditions suitable for growth, the population of "old" and "new" arrivals would increase, but bias originating from selective sampling of picocyanobacterial strains (for example, by fluorescence in situ hybridization, quantitative PCR, culture, or clone libraries) must be taken into account before safe conclusions regarding the geographical restriction of ecotypes sensu Cohan (6) can be made. Although our analyses confirm that most gene clusters do contain isolates originating with nearby locations (10), there is also evidence for widespread dispersal of some closely related taxa. This is illustrated by cluster B, the so-called subalpine cluster I (10), which contains isolates obtained from Irish Lough Neagh (isolate PS-714) and several Japanese lakes of very different type from the oligomesotrophic, deep subalpine lakes (e.g., Fig. 2). Lake Kasumigaura (from which PS-725 was isolated), for instance, is the second-largest hypertrophic lake in Japan, with a surface area of 220 km² and a mean water depth of 4 m (36).

Prokaryote speciation is thought to have produced ecotypes recognizable as tightly clustered groups in sequence-based phylogenies (6, 23). Because phylogenetic analyses are sensitive, however, to the character and number of sequences included in the analysis and on the particular algorithm used to perform the clustering (25), robust ecotypes might be defined from a relatively small number of 16S rRNA gene sequences originating from a relatively small number of locations and environments. At the other extreme, the collection of a large number of more variable sequences [e.g., *cpcBA*-IGS (29; this study) or ITS sequences (10)] from a great many locations and environments will be needed. The present analysis suggests

that there are at least seven clusters within the nonmarine picocyanobacteria forming the picophytoplankton clade sensu Urbach et al. (38). Whether these gene clusters should be given species rank remains debatable until more ecophysiological evidence on representative strains has been accumulated.

Although sequence-based clustering methods guide the formulation of testable hypotheses, the practical challenge for microbial ecologists will be to define ecotypes using methods which accurately predict ecological equivalence, which in turn requires careful consideration of the number and nature (genotypic and phenotypic) of arbiters (e.g., growth rate, grazing susceptibility, subtractive hybridization [1, 33], or gene expression) chosen to test ecotype boundaries—i.e., which strains should be included or excluded. This is especially important given that apparently minor differences in picocyanobacterial genotypes can obscure ecologically significant differences (8, 10). A quantitative appraisal of the "everything (microbial) is everywhere" hypothesis will require that putative ecotypes are empirically defined. Limited phylogenetic information in the 16S rRNA gene (24), taxon undersampling, and the potential "erosion" of phylogenies due to horizontal transfer of genetic information mean that a mature understanding of picocyanobacterial ecotypes, their effective and potential biogeography (or lack thereof), will require that more importance is given to quantifying the limitations of (i) sequence acquisition, depending on the extent and nature of sampling, (ii) the number and choice of gene or gene-fragment(s), and (iii) methods of phylogenetic analysis.

Nucleotide sequence accession numbers. GenBank accession codes for sequences determined in this study are AY151211 to AY151251 and AY224198 to AY224207.

We thank P. Stadler for technical assistance; M. W. Hahn for providing isolates MH 301, MH 305, and MH 307; A. Wilmotte and B. R. Robertson for providing details of unpublished primers; and W. F. Vincent and M. M. Watanabe for information on several isolates included in the phylogenetic analyses. Comments from M. W. Hahn and R. Kurmayer helped to improve an earlier draft of the manuscript.

This work was supported by the Austrian Science Fund (FWF P14238-Bio).

REFERENCES

1. Agron, P. G., M. Macht, L. Radnedge, E. W. Skowronski, W. Miller, and G. L. Andersen. 2002. Use of subtractive hybridization for comprehensive surveys of prokaryotic genome differences. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**:175–182.
2. Amann, R., and R. Roselló-Mora. 2001. Mikrobiologische Aspekte der Biodiversität, p. 161–180. *In* P. Janich, M. Gutmann, and K. Prieß (ed.), *Biodiversität*. Springer, Berlin, Germany.
3. Bickel, P. J., K. J. Kechris, P. C. Spector, G. J. Wedemayer, and A. N. Glazer. 2002. Finding important sites in protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:14764–14771.
4. Callieri, C., and J. G. Stockner. 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *J. Limnol.* **61**:1–14.
5. Castenholz, R. W. 2001. Phylum BX. Cyanobacteria, oxygenic photosynthetic bacteria, p. 473–599. *In* D. R. Boone and R. W. Castenholz (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Springer, New York, N.Y.
6. Cohan, F. M. 2001. Bacterial species and speciation. *Syst. Biol.* **50**:513–524.
7. Crosbie, N. D., M. Pöckl, and T. Weisse. Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. *J. Microbiol. Methods*, in press.
8. Crosbie, N. D., K. Teubner, and T. Weisse. Flow-cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*, in press.
9. Ernst, A. 1991. Cyanobacterial picoplankton from Lake Constance. I. Isolation by fluorescence characteristics. *J. Plankton Res.* **13**:1307–1312.
10. Ernst, A., S. Becker, U. I. A. Wollenzien, and C. Postius. 2003. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology* **149**:217–228.
11. Ernst, A., G. Sandmann, C. Postius, S. Brass, U. Kenter, and P. Böger. 1992.

- Cyanobacterial picoplankton from Lake Constance. 2. Classification of isolates by morphology and pigment composition. *Bot. Acta* **105**:161–167.
12. **Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368–376.
 13. **Finlay, B. J.** 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**:1061–1063.
 14. **Finlay, B. J., S. C. Maberly, and J. I. Cooper.** 1997. Microbial diversity and ecosystem function. *Oikos* **80**:209–213.
 15. **Gutell, R. R., N. Larsen, and C. R. Woese.** 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* **58**:10–26.
 16. **Hedenstierna, K. O. F., J. L. Siefer, G. E. Fox, and E. J. Murgola.** 2000. Co-conservation of rRNA tetraloop sequences and helix length suggests involvement of the tetraloops in higher-order interactions. *Biochimie* **82**: 221–227.
 17. **Honda, D., A. Yokota, and J. Sugiyama.** 1999. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J. Mol. Evol.* **48**:723–739.
 18. **Janson, S., and E. Granéli.** 2002. Phylogenetic analyses of nitrogen-fixing cyanobacteria from the Baltic Sea reveal sequence anomalies in the phycocyanin operon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1397–1404.
 19. **Lepere, C., A. Wilmotte, and B. Meyer.** 2000. Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Syst. Geogr. Plants* **70**:275–283.
 20. **Ludwig, W., and H. Klenk.** 2001. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics, p. 49–65. *In* D. R. Boone and R. W. Castenholz (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Springer, New York, N.Y.
 21. **MacIsaac, E. A., and J. G. Stockner.** 1993. Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy, p. 187–197. *In* P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole (ed.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.
 22. **Manen, J., and J. Falquet.** 2002. The *cpbB-cpbA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:861–867.
 23. **Palys, T., F. M. Cohan, and L. K. Nakamura.** 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1145–1156.
 24. **Palys, T., E. Berger, I. Mitrica, L. K. Nakamura, and F. M. Cohan.** 2000. Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1021–1028.
 25. **Pollock, D. D., D. J. Zwickl, J. A. McGuire, and D. M. Hillis.** 2002. Increased taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Syst. Biol.* **51**: 664–671.
 26. **Posada, D.** 2002. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Mol. Biol. Evol.* **19**:708–717.
 27. **Posada, D., and K. A. Crandall.** 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**:817–818.
 28. **Rankin, L. M., P. D. Franzmann, T. A. McMeekin, and H. R. Burton.** 1997. Seasonal distribution of picocyanobacteria in Ace Lake, a marine-derived Antarctic lake, p. 178–184. *In* B. Battaglia, J. Valencia, and D. W. H. Walton (ed.), *Antarctic communities. Species, structure and survival*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
 29. **Robertson, B. R., N. Tezuka, and M. M. Watanabe.** 2001. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of the 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:861–871.
 30. **Rocap, G., L. Distel, J. B. Waterbury, and S. W. Chisholm.** 2002. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1180–1191.
 31. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
 32. **Scheldman, P., D. Baurain, R. Bouhy, M. Scott, M. Mühling, B. A. Whitton, A. Belay, and A. Wilmotte.** 1999. *Arthrospira* (*Spirulina*) strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**:213–222.
 33. **Schmidt, K. D., T. Schmidtrose, U. Romling, and B. Tummeler.** 1998. Differential genome analysis of bacteria by genomic subtractive hybridization and pulsed-field gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**:509–514.
 34. **Stanier, R. Y., R. Kunisawa, M. Mandel, and G. Cohen-Bazier.** 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **35**:171–205.
 35. **Stockner, J., C. Callieri, and G. Cronberg.** 2000. Picoplankton and other non-bloom forming cyanobacteria in lakes, p. 195–231. *In* B. A. Whitton and M. Potts (ed.), *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
 36. **Sugiara, N., B. Wei, and T. Maekawa.** 2002. The discrimination of the response pattern of inter-phyllum phytoplankton diversity to long-term eutrophication trends in lake Kasumigaura, Japan. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* **5**:403–410.
 37. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**:4876–4882.
 38. **Urbach, E., D. J. Scanlan, D. L. Distel, J. B. Waterbury, and S. W. Chisholm.** 1998. Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *J. Mol. Evol.* **46**:188–201.
 39. **Van de Peer, Y., and R. De Wachter.** 1994. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput. Appl. Biosci.* **9**:177–182.
 40. **Vincent, W. F., J. P. Bowman, L. M. Rankin, and T. A. McMeekin.** 2000. Phylogenetic diversity of picocyanobacteria in Arctic and Antarctic ecosystems, p. 317–322. *In* C. R. Bell, M. Brylinsky, and P. Johnson-Green (ed.), *Microbial biosystems: new frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
 41. **Wang, Y., and Z. Zhang.** 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiology* **146**: 2845–2854.
 42. **Weisse, T.** 1988. Dynamics of autotrophic picoplankton in Lake Constance. *J. Plankton Res.* **10**:1179–1188.
 43. **Weisse, T., and U. Kenter.** 1991. Ecological characteristics of autotrophic picoplankton in a prealpine lake. *Int. Rev. Hydrobiol.* **76**:493–504.

Transposons Inactivate Biosynthesis of the Nonribosomal Peptide Microcystin in Naturally Occurring *Planktothrix* spp.†

Guntram Christiansen,^{1,3} Rainer Kurmayer,^{2*} Qian Liu,² and Thomas Börner³

Department of Chemistry, University of Hawaii at Manoa, 2545 McCarthy Mall, Honolulu, Hawaii 96822¹; Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria²; and Institute for Biology (Genetics), Humboldt University, Chausseestrasse 117, D-10115 Berlin, Germany³

Received 2 August 2005/Accepted 7 October 2005

The filamentous cyanobacteria *Planktothrix* spp. occur in the temperate region of the Northern hemisphere. The red-pigmented *Planktothrix rubescens* bacteria occur in deep, physically stratified, and less eutrophic lakes. *Planktothrix* is a known producer of the toxic heptapeptide microcystin (MC), which is produced nonribosomally by a large enzyme complex consisting of peptide synthetases and polyketide synthases encoded by a total of nine genes (*mcy* genes). *Planktothrix* spp. differ in their cellular MC contents as well as the production of MC variants; however, the mechanisms favoring this diversity are not understood. Recently, the occurrence of *Planktothrix* strains containing all *mcy* genes but lacking MC has been reported. In this study, 29 such strains were analyzed to find out if mutations of the *mcy* genes lead to the inability to synthesize MC. Two deletions, spanning 400 bp (in *mcyB*; one strain) and 1,869 bp (in *mcyHA*; three strains), and three insertions (IS), spanning 1,429 bp (in *mcyD*; eight strains), 1,433 bp (in *mcyEG*; one strain), and 1,433 bp (in *mcyA*; one strain), were identified. Though found in different genes and different isolates and transcribed in opposite directions, IS were found to be identical and contained conserved domains assigned to transposable elements. Using mutation-specific primers, two insertions (in *mcyD* and *mcyA*) and one deletion (in *mcyHA*) were found regularly in populations of *P. rubescens* in different lakes. The results demonstrate for the first time that different mutations resulting in inactivation of MC synthesis do occur frequently and make up a stable proportion of the *mcy* gene pool in *Planktothrix* populations over several years.

Microcystins (MC) are cyclic heptapeptides regularly produced by cyanobacteria of the genera *Anabaena*, *Microcystis*, and *Planktothrix*. MCs are known to be toxic to aquatic biota, livestock, and humans. They are synthesized nonribosomally by multifunctional enzyme complexes via the so-called thiotemplate mechanism (4). The above-mentioned organisms show an impressive diversity in the production of small bioactive peptides (700 to 1,400 Da) other than microcystins, e.g., anabaenopeptins, aruginosins, microviridins, cyanopeptolines, etc. (6). Typically, isolates differing in the production of these small peptides cannot be discriminated under the microscope or by traditional molecular taxonomic approaches. Our understanding of the mechanisms and recombination processes affecting existing pathways of secondary metabolite synthesis is rather poor. Recently, progress has been made in the elucidation of the genetic basis of MC synthesis for all three main MC producers occurring in freshwater, i.e., *Anabaena*, *Microcystis*, and *Planktothrix* (2, 27, 36). Three gene clusters responsible for the biosynthesis of microcystins, containing 9 or 10 genes (depending on the genus) and spanning >55 kb, have been sequenced. Using information obtained from nonribosomal peptide synthetases and polyketide synthases in general (17, 32) and from tracer feeding experiments (22), the main pathways of MC biosynthesis could be elucidated (36).

Because of high sequence similarities between the *mcy* gene clusters in the different genera and the coevolution of 16S rRNA genes and *mcy* genes, a common ancestor for MC synthesis has been suggested (25). According to this theory, the patchy distribution of *mcy* genes among strains of one species is understood in terms of repeated-loss processes of the *mcy* gene cluster during cyanobacterial evolution, albeit the maintenance of *mcy* in some genera points towards an important but so far unknown function. Our recent report on the occurrence of inactive *mcy* genotypes (i.e., genotypes possessing the *mcy* genes but lacking MC production) of *Planktothrix* spp. in nature (13) might be understood as support for the *mcy* gene loss hypothesis. The inactivation of MC synthesis in an increasing number of strains might be seen as a first step in evolution towards losing the complete *mcy* gene cluster. Also, a few inactive *mcy* genotypes have been described for *Microcystis*. The loss of MC synthesis has been attributed to the accumulation of point mutations (9, 23). However, so far mutations have not been found among genes of the *mcy* gene cluster.

The aim of this study was to find out whether the inactivation of MC synthesis can be explained by mutations within the *mcy* gene cluster, and if so, which mutation types can be found in nature and how frequently they occur or if they should rather be considered exceptional.

(The field data reported in this study partly originated from the M.Sc. thesis submitted by L.Q. to the International Institute for Infrastructural Hydraulic and Environmental Engineering (IHE, Delft, The Netherlands) in the course of the International Postgraduate of Limnology Course at the Limnological Institute in Mondsee, Austria.)

* Corresponding author. Mailing address: Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria. Phone: 43-6232-312532. Fax: 43-6232-3578. E-mail: rainer.kurmayer@oeaw.ac.at.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

TABLE 1. Oligonucleotide primers used for the detection of mutations within the *mcy* gene cluster^a

Primer no.	Base pair no.	Forward sequence	<i>T_m</i> (°C)	Reverse sequence	<i>T_m</i> (°C)
1	452–2022	ATTGATCCCCTGATCAATGATCA	62.5	GCTAAACTGGGGCCATTGAGA	63.5
2	2002–4050	TCTCAATGGCCCCAGTTTAGC	63.5	CGCTGGCTAATACTCCCTCG	62.7
3	4031–6021	CGAGGGAGTATTAGCCAGCG	62.7	TTTGCATGGAAAAGGGATCAATC	63.1
4	6000–8002	GATTGATCCCCTTCCATGCAAA	63.1	GATCGCTTCCCTGGGAATAATG	63.9
5	7981–10011	CATTATCCCAGGGAAGCGATC	63.9	TGACCGATGGGTTTACCTGTG	62.9
6	9991–12009	CACAGGTA AACCCATCGGTCA	62.9	CCCAGTTTTCCCAAACCTCC	62.7
7	11990–13989	GGAGGTTTGGGAAAATCGGG	62.7	TCTCCACGCCCATAGCCAT	63.8
8	13971–16000	ATGGCTATGGGCGTGGAGA	63.8	CTGGCGGATTTTCAGTTGAT	62.3
9	15981–18021	ATCAACTCGAAATCCGCCAG	62.3	GCGGCCAGATTAGACTGCATT	63.6
10	18001–20076	AATGCAGTCTAATCTGGCCGC	63.6	GCGATGAGTGTCTGTTTAGTCCG	63.2
11	20054–21990	CGGACTAAACAGACACTCATCGC	63.2	GATTTCCCGGTTTCATTGAGTG	62.7
12	21969–23983	CACTCAATGAAACCGGAAATC	62.7	TTAGCAGCATTTGGCTAAGACTG	62.9
13	23961–25999	GCAGTCTTAGCCAATGCTGCTAA	62.9	GTTGTGAGATTGTTGGCGCC	63.8
14	25980–28065	GGCGCCAACAATCTCACAAAC	63.8	CTGAAATAACGGTATGTTGATCGGT	62.3
15	28042–30072	CCGATCAACATACCGTTATTTTCAG	62.3	GTTGCGCTTGAATGAAACCG	63.8
16	30053–32040	CCGTTTCAATCAAGCGGAAAC	63.8	GTCTTTGGGGTCTGTTGGATAC	62.9
17	32010–34020	GTATCCAACAGACCCCAAAGGAC	62.9	AAGGCTCCCGTTGCTAAAAC	63.1
18	34001–36035	GTTTTAGCAACGGGAGCCTT	63.1	CGGGAATGGGTTCTCTGTATAA	63.2
19	36013–38042	TTATACAGGAGAACCCATTCCCG	63.2	AGGAAGCCACACTCAACCAT	63.0
20	38022–40022	ATGTTTGGAGTGTGGCTTCT	63.0	CTGTTAATTCGGGACGATGGAG	62.8
21	40001–42060	CTCCATCGTCCCGAATTAACAG	62.8	TTGTCATGGATGTGACGAGCA	63.3
22	42060–44052	TGCTCGTCACATCCATGACAA	63.6	CTGATTGGACAGAAGCTTGGAA	63.7
23	44030–46036	TCCAAGCAGTTCTGTCCAATCAG	63.7	GGTAAATGAACCGGGGAAAT	63.0
24	46017–48031	ATTCCCGCGTTCAATTTACC	63.0	AATCGTCCCAAGTCTCCGGTA	62.9
25	48011–50000	TACCGGAGACTTGGGACGATT	62.9	GACCGCCATTCTAGCGATT	63.5
26	49981–51970	AATCGCTAGAATGGGCGGTC	63.5	AAAACCAAGGCGAGGAGGAA	63.0
27	51951–54058	TTCCTCCTGCCCTTGGTTTT	63.0	GTGAGTGCCATCCTGACAGCTAT	62.7
28	54036–55470	ATAGCTGTCAGGATGGCACTCAC	62.7	GCACCCTAACTAATCTGCAATCG	63.3

^a The primers allow for the amplification of the whole *mcy* synthetase gene cluster of *Planktothrix* (2) and were designed during this study.

MATERIALS AND METHODS

Experimental organisms and culture conditions. All nine inactive microcystin genotypes of *Planktothrix rubescens* (Lake Irrsee strains 12, 62, 65, 87, 94, and 95; Lake Wörthersee strain 67; and Lake Mondsee strain 91/1) and *P. agardhii* (Lake Gjerstjoen strain CCAP1459/36), as reported previously (13), and 20 additional *P. rubescens* strains (Lake Mondsee strains 40, 110, 120, 130, 135, 137, 154, and 194; Lake Grabensee strains 139, 145, 161, 166, 168, 169, and 170; Lake Wolfgangsee strain 160; Lake Fuschsee strains 165, 167, and 178; and Lake Obertrum See strain 197) were isolated and analyzed as described previously (13). All strains gave positive signals in PCRs with a *mcyA*- and *mcyB*-specific primer pair but did not contain MCs and were screened for DNA mutations as described below. All strains analyzed contained the internal transcribed spacer region of the phycocyanin operon, detected with primers PcPI+ and PcPI-, specific for *Planktothrix* spp. (13). Based on the current taxonomical classification (34), strains were assigned to either *P. agardhii* (green pigmented) or *P. rubescens* (red pigmented). All strains were cultivated in BG11 medium (26) containing 2 mM NaNO₃ and 10 mM NaHCO₃ at 15°C with continuous light (5 to 10 μmol m⁻² s⁻¹; Osram type L30W/77 Fluora light source). Strains were harvested by incubating 2 ml of culture for 1 h on ice, subsequent centrifuging at 13,000 rpm for 10 min, and lyophilizing the pellet in a vacuum centrifuge at 30°C.

Sampling. *P. rubescens* was sampled from June to October in the years 2001–2004 by pulling a plankton net (30-μm mesh size) from a depth of 20 m to the surface at the center of a lake. In parallel, quantitative integrated samples were obtained by collecting 1 liter every meter from the surface to a depth of 20 m. Lakes Irrsee, Mondsee, Offensee, Schwarzensee, Wolfgangsee (Upper Austria, Austria), and Wörthersee (Carinthia, Austria) are generally deep and stratified lakes, and except for the oligotrophic Lake Schwarzensee, are classified as mesotrophic (7). Filaments were assigned to the genus *Planktothrix* according to previously described morphological criteria (1) and counted from Lugol's solution-fixed integrated samples. The enumeration of cells was done by means of an inverted microscope, using the methods of Utermöhl (37) as described previously (13). Aliquots (a few ml from net samples and 3 to 4 liters from integrated samples) were filtered onto glass fiber filters (BM/C; Ederol, Vienna, Austria) under vacuum pressure and stored frozen (–20°C) until DNA extraction.

Genetic analysis. DNA extraction from strains and field samples was performed by a standard phenol-chloroform procedure as described previously (12).

PCR amplifications were performed in reaction mixtures of 20 μl containing 2 μl of QIAGEN PCR buffer (QIAGEN, VWR International, Austria), 1.2 μl MgCl₂ (25 mM; QIAGEN), 0.6 μl deoxynucleoside triphosphates (10 mM [each]; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 1 μl of each primer (10 pmol μl⁻¹), 0.1 μl *Taq* DNA polymerase (QIAGEN), 13.1 μl sterile Millipore water, and 1.0 μl of genomic DNA (diluted 100-fold). In order to screen the complete *Planktothrix mcy* gene cluster (2), 28 primer pairs covering the whole *mcy* gene cluster were designed and used to amplify fragments of 2 kb without interruption (Table 1). DNA mutations were detected via the difference in PCR product sizes in agarose compared to the corresponding PCR products obtained from strain CYA126/8, whose the *mcy* gene cluster has been sequenced (AJ441056) (2). The PCR thermal cycling protocol included an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, an annealing temperature of 60°C for 30 s, and an elongation temperature of 72°C for 2 min. In the case of nonsuccessful PCRs, a long-range *Taq* polymerase (Clontech, BD Biosciences, Palo Alto, CA) was used to amplify PCR products (>4 kb) using adjacent primer pairs following the manufacturer's instructions.

In order to detect mutant genotypes directly in the field, primers specific for the detected mutation events were designed (Table 2). The deletion-specific primer pairs produced distinctly shorter amplification products than the amplicons resulting from unmutated gene regions (*mcyHA* deletion in strain 62, 1,869 bp; *mcyB* deletion in strain CCAP1459/36, 707 bp). In contrast, the insertion (IS)-specific primer pairs (*mcyDIS1*, strain 110; *mcyAIS*, strain 40) consisted of the forward primer binding to a locus within *mcyD* or *mcyA* and the reverse primer binding to the inserted gene region or vice versa. All five primer pairs (Table 2) were found to be specific for the corresponding genotype and did not give PCR products for other typically co-occurring *Planktothrix* strains and other cyanobacteria (*Aphanizomenon* spp., *Microcystis* sp., *Nostoc* sp., and *Synechococcus* spp.). For field analysis, the PCR thermal cycling protocol included an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, an annealing temperature of 60°C for 30 s, and an elongation temperature of 72°C for 30 s. To control for the occurrence of *Planktothrix* and the *mcy* gene cluster, each sample was analyzed with the PcPI+/- primers, amplifying the intergenic spacer region within the phycocyanin operon (PC-IGS), and the *peams0*+/- primers, amplifying a region within the *mcyA* gene, as described previously (13). Pilot experiments showed that PCRs using the primer pair PcPI+/- and the

TABLE 2. *Planktothrix* strains sequenced for mutations (red-pigmented strains [*P. rubescens*] and green-pigmented strains [*P. agardhii*])

Strain	Yr of isolation	Origin	Type of mutation	Sequence accession no.	Position	Forward primer name, 5'-3' sequence ^a	Temp (°C)	Reverse primer name, 5'-3' sequence ^a	°C	Product size (bp) ^b
110 (<i>P. rubescens</i>)	2001	Mondsee, Austria	Insertion (<i>mcyDIS1</i>) (1,424 bp) at 11,918	AM039940	11,745 (fwd primer) 12,047 (rev primer)	<i>mcyDIS1</i> 5' end F, AAGAAATATCCCAATGCGTTG <i>mcyDIS1</i> 3' end F, CCTTTTCCCTGATTTTTCGG	59	<i>mcyDIS1</i> 5' end R, GGGAAATGTAAGTCTTACTCCATGAGGG <i>mcyDIS1</i> 3' end R, TGGCCCCCA TTTTGGATTA	59	351
139, 145, 161, 166, 169, 170 (<i>P. rubescens</i>)	2001	Mondsee, Austria	Insertion (<i>mcyEGIS</i>) (1,433 bp) at 23,822	AM055629						
178 (<i>P. rubescens</i>)	2001	Fuschsee, Austria	Insertion (<i>mcyDIS2</i>) at 11,918	AM039941-AM039946						
40 (<i>P. rubescens</i>)	2001	Mondsee, Austria	Insertion (<i>mcyA</i>) (1,433 bp) at 41,274	AM039939	41,167 (fwd primer) 41,454 (rev primer)	<i>mcyAIS</i> 5' end F, TCATCTCGTCCGAGATGGG <i>mcyAIS</i> 3' end F, CTITTTCCCGTATTTTTCGGGA	58	<i>mcyAIS</i> 5' end R, CACTGCTCAACACCTAGGATTTG <i>mcyAIS</i> 3' end R, TTGAGTGTTCACCGTACTCTCTGC	58	455
62 (<i>P. rubescens</i>)	2001	Irsee, Austria	Deletion (<i>mcyHA</i>) (1,869 bp) at 32,938	AM039937	32,791 (fwd primer)	Magnetic I1wd, CCATTATC GTCTTCGCTCC	60	Magnetic Irev, CGGCAATA GACGAAACAACATG	59	300 (2223)
CCAP1459/36 (<i>P. agardhii</i>)	1968	Lake Gjerstjoen, Norway	Deletion (<i>mcyB</i>) (400 bp) at 43,423	AM039938	43,226 (fwd primer)	1459/36 1F, AGAAATCCA AAGGCTGAGTGATG	58	1459/36 301R, AAAGATTGG TGGTTCAGCAAA	58	301 (707)

^a The primers for the specific detection of *mcyAIS* and *mcyDIS1* genotypes (on both ends) and *mcyHA/mcyB* deletion genotypes in field samples and corresponding base pair numbers of the *mcy* gene cluster (AJ441056) from strain CYA126/8 (2) are given.

^b Sizes of PCR products obtained without deletions are given in parentheses.

mutation-specific primers *mcyDIS1* (3' end) and *mcyHA* (deletion) all had a detection limit of 10 cells per assay. PCR products (4 µl of the reaction mix) were visualized by electrophoresis on 1.0% (strains) or 1.5% (field samples) agarose in 0.5× TBE (Tris-borate-EDTA buffer), with ethidium bromide staining.

Sequence alignment and analysis. The PCR products obtained in field samples were sequenced directly from PCR products by standard automated fluorescence techniques (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Sequences were aligned using multiple sequence alignment (Clustal W 1.8). Similarity values between nucleotide sequences were calculated using the program DNADIST of the PHYLIP software package (version 3.6[alpha3]) (5).

Nucleotide sequence accession numbers. The sequence data obtained in this study have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession numbers AM039937 to AM039947, AM040461 to AM040485, and AM055629 (Tables 2 and 3).

RESULTS

Identification of mutations linked to the inactivation of MC synthesis. Sequencing of the PCR amplicons that differed in size from the expected 2.0 kb revealed deletions and insertions (Fig. 1; see the supplemental material). Insertions were detected at three different sites by significantly larger-than-expected PCR products, using in one case primer pair 6, binding to *mcyD*, in the second case primer pair 12, binding to the spacer region between *mcyE* and *mcyG*, and in the third case primer pair 21, binding to *mcyA*. The insertion affecting *mcyD* (*mcyDIS1*) was 1,429 bp long and found at position 11,918 of the *mcy* gene cluster (AJ441056), and it occurred in strain 110. The insertion sequences observed in strains 139, 145, 161, 166, 169, 170, and 178 were located in *mcyD* at the same position (*mcyDIS2*). Both *mcyDIS1* and *mcyDIS2* had a left inverted repeat (IRL; 5'-CAGGGCTGTTTCA-3') and a right inverted repeat (IRR; 5'-TGAAACAGCCCTG-3') and were highly similar (99.0 to 99.4% identity), but *mcyDIS2* was transcribed in the opposite direction (Fig. 2). The variability among the seven strains containing *mcyDIS2* (1,397 bp) was low (0 to 0.6%). Two other insertions with identical IRL and IRR sequences affected the spacer between *mcyE* and *mcyG* (1,434 bp; named *mcyEGIS*) in strain 110 at position 23,822 and affected *mcyA* (1,433 bp; named *mcyAIS*) at position 41,274 in strain 40. All *mcyDIS* and *mcyAIS* mutants had short directly repeated sequences (DR) of 10 bp in length at the downstream end (*mcyDIS1*, 5'-CGT GCA CGG G-3'; *mcyDIS2*, 5'-**CCC GTG CAC** G-3'; *mcyEGIS*, 5'-GGC TGT TCC C-3'; and *mcyAIS*, 5'-CCC AAA ACC C-3'). Consequently, *mcyDIS2* transcribed in the opposite direction but inserted at the same position should have originated from a second independent insertion event. All IS showed 98.5 to 99.4% identity and carried a single predicted open reading frame (ORF) (encoding 363 amino acids [aa]) constituting 76% of *mcyDIS1* (bp 237 to 1328). The ORF included conserved domains assigned to transposase 11 (E value, 7e - 08), a transposase DDE domain known to be necessary for efficient DNA transposition (3). We concluded that all insertions found among the *mcy* gene cluster involved this same transposase 11.

Deletions were identified by shorter-than-expected PCR amplicons at two different sites. In one case, PCR amplification constantly failed to give an amplicon with primer pairs 17, 18, and 19. Subsequently, long-range PCR amplification with primers 17fwd and 19rev was performed, yielding an amplicon of only 4 kb instead of the expected 6 kb (data not shown). This deletion (called the *mcyHA* deletion) was found in strains 12,

TABLE 3. Sequence accession numbers of mutant *mcy* genotypes obtained from field samples by sequencing of PCR products obtained with mutation-specific primers (Table 2)

Sampling site	Date	Sequence accession no.				
		<i>mcyDIS1</i> 5' end	<i>mcyDIS1</i> 3' end	<i>mcyAIS</i> 5' end	<i>mcyAIS</i> 3' end	<i>mcyHA</i> deletion
Irrsee	1 December 03		AM040466			
Mondsee	15 April 03			AM040471	AM040478	
Mondsee	29 April 03			AM040472	AM040476	
Mondsee	14 October 03			AM040473	AM040479	AM040482
Mondsee	11 November 03	AM040468	AM040461	AM040474	AM040477	AM040483
Offensee	1 July 03		AM040462, AM040467			
Offensee	10 October 02		AM040465			
Wörthersee	26 September 01	AM040469	AM040463		AM040480	AM040484
Wörthersee	28 August 03	AM040470	AM040464	AM040475	AM040481	AM040485

62, and 65 and spanned 1,869 bp within *mcyH* and *mcyA*, from the Walker motif in *mcyH* to the core motif A2 of the first adenylation domain (Ad) of *mcyA* (Ad1). This deletion was only found in genotypes containing *mcyA* Ad1 without the *N*-methyltransferase domain and not in genotypes containing *mcyA* Ad1 with the NMT domain (14). The second deletion (called the *mcyB* deletion) was identified with primer pair 22 and was located within *mcyB* Ad1 of strain CCAP1459/36, resulting in the loss of 400 bp located before the core motif A2. For the other 16 strains analyzed, no detectable differences in PCR product size could be identified.

Frequency of occurrence of mutant *mcy* genotypes in field samples. In total, 123 samples from six lakes were analyzed, and all samples (except for two integrated samples from Lake Schwarzensee [collected on 15 April 2004 and 8 July 2004]) gave positive PCR signals for PC-IGS and *mcyA*, implying that *Planktothrix* and *mcy* gene-containing genotypes were present (Table 4). The extremely low density (zero filaments in 50 ml of sedimentation volume) in Lake Schwarzensee was responsible for the two negative sampling dates, since the net samples taken in parallel gave PCR products indicative of *Planktothrix* and *mcyA*. Otherwise, there was a good correlation between the frequencies of occurrence of PCR results from net samples

and integrated samples, indicating that the *mcy* genotype composition did not differ between plankton net samples (containing a >1,000-fold larger sample of the population in terms of individual numbers) and integrated samples (containing all the individuals sampled from approximately 4 liters of integrated lake water).

PCR products indicative of insertions (*mcyDIS1* and *mcyAIS*) were found to be ubiquitously distributed, i.e., the *mcyDIS1* genotype was found in Lakes Mondsee, Wörthersee, Offensee, and Irrsee and the *mcyAIS* genotype was found in Lakes Mondsee and Wörthersee (Table 4; see the supplemental material). The *mcyHA* deletion was detected in Lakes Mondsee and Wörthersee. The *mcyB* deletion was not detected in field samples. For Lakes Mondsee and Wörthersee, both insertions (*mcyDIS1* and *mcyAIS*) and the *mcyHA* deletion were found regularly over 4 years. In net samples from Lake Mondsee, the *mcyHA* deletion and *mcyDIS1* were found as frequently as *mcyA* and PC-IGS. For net samples from Lake Wörthersee, both insertions and the *mcyHA* deletions occurred with a 100% frequency of detection. For populations showing the lowest abundance of *Planktothrix* throughout the study period (Lakes Wolfgangsee and Schwarzensee), no *mcy* mutations were detected.

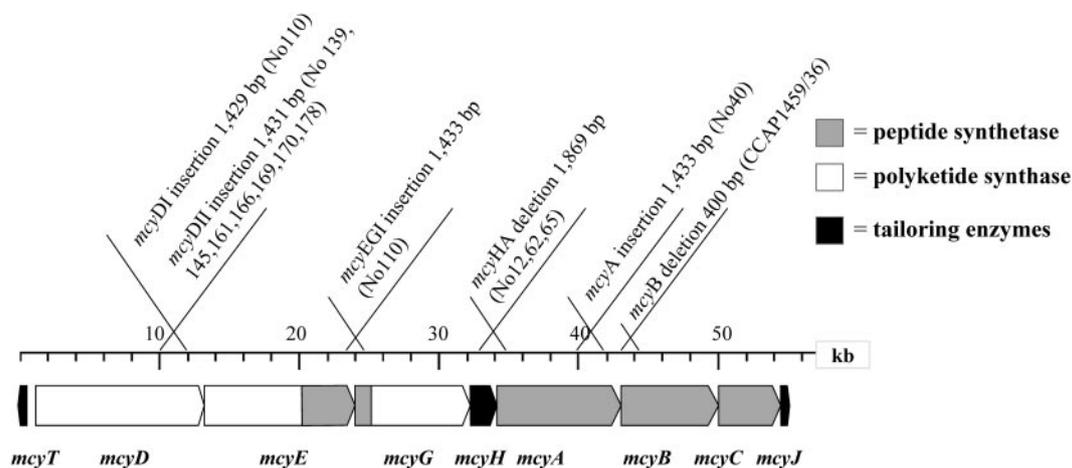


FIG. 1. *mcy* gene cluster of *Planktothrix* isolate CYA126/8 (2) and locations of mutations found in inactive *mcy* genotypes. Strains 110 and 40 were isolated from Lake Mondsee (Austria), strains 139, 145, 161, 166, 169, and 170 were isolated from Lake Grabensee (Austria), strain 178 was isolated from Lake Fuschlsee (Austria), strains 12, 62, and 65 were isolated from Lake Irrsee (Austria), and strain CCAP1459/36 was isolated from Lake Gjørsjøen (Norway).

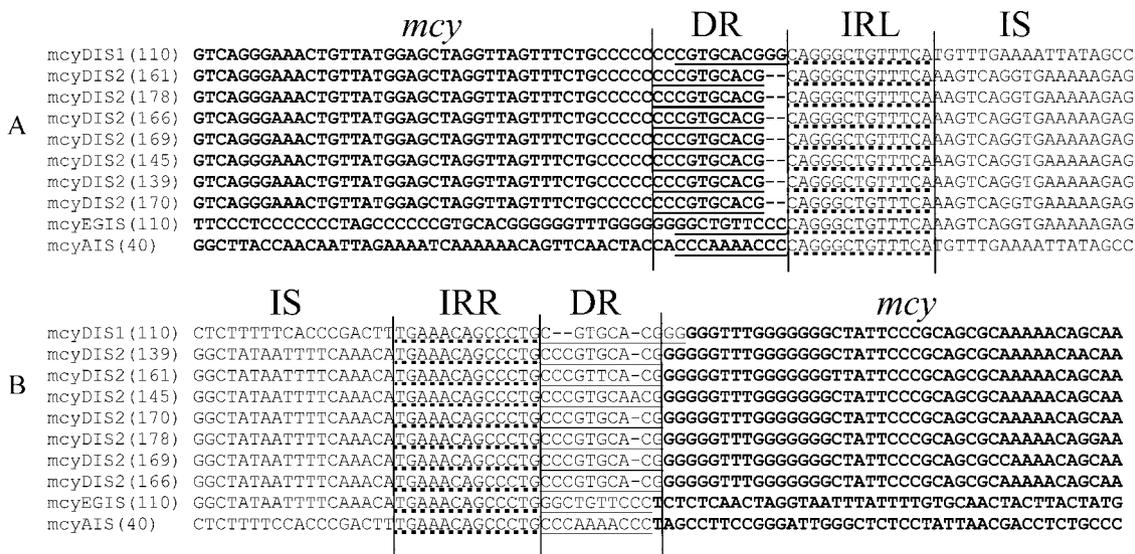


FIG. 2. Sequence alignment of putative transposases (*mcyDIS1* and *mcyDIS2*, observed in *mcyD* [at base pair 11,918 of the *mcy* gene cluster of *Planktothrix*; AJ441056], *mcyEG* [at base pair 23,822], and *mcyA* [at base pair 41,274]). The 5' end (A) and the 3' end (B) of each insertion (IS) and part of the *mcy* genes (bold) are shown. The short directly repeated sequences (DR) of 10 bp in length (straight lines) and the left inverted repeats (IRL) and right inverted repeats (IRR) (dotted lines) are indicated.

Similarity of sequences of *mcy* mutations from field samples. Twenty-five PCR amplification products of mutant genotypes from field samples were sequenced in order to validate the results of PCR detection and to find out whether the insertion events observed among strains may occur independently in nature. In general, the similarity among sequences of mutations, even if obtained from different populations, was high. Sequence identities for the sequences obtained from the 5' end and 3' end of *mcyDIS1* were 96.6 to 100% (270 bp; *n* = 4) and 95.9 to 100% (198 bp; *n* = 8), respectively. According to the difference in DR sequences of the *mcyDIS1* 3' ends, two independently arisen genotypes occurred in lake samples, and one *mcyDIS1* 3'-end genotype was found in Lake Offensee only (see the supplemental material). In contrast, only one *mcyAIS* genotype DR sequence was observed, and sequence

identities for the 5' end and 3' end of *mcyAIS* were 99.5 to 100% (369 bp; *n* = 6) and 99 to 100% (298 bp; *n* = 7), respectively. All *mcyHA* deletion events occurred at the same position of the *mcy* gene cluster, and the sequences flanking the *mcyHA* deletion (266 bp; *n* = 4) were identical. The results demonstrate that mutations within *mcy* may arise independently and are detectable for years.

DISCUSSION

Types of naturally occurring mutations. Of the 29 strains that were inactive in microcystin synthesis, 13 were found to contain mutations within the *mcy* gene cluster. One strain, no. 110, even contained two mutations (*mcyDIS1* and *mcyEGIS*). Since *mcyEGIS* was located in the spacer region between *mcyE*

TABLE 4. Occurrence of *P. rubescens*, biovolume and filament abundance in study lakes, and numbers of integrated and net samples showing specific mutations

Lake	Sampling time (day.mo.yr) (no. of sampling dates)	Biovolume (mm ³ liter ⁻¹) (minimum-median-maximum)	No. of filaments per ml ^l (minimum-median-maximum)	Integrated sample (I)/net sample (N)	No. of samples with indicated mutation (relative proportion [%]) ^b					
					PC-IGS	<i>mcyA</i>	<i>mcyAIS</i> (insertion)	<i>mcyDIS1</i> (insertion)	<i>mcyB</i> (deletion)	<i>mcyHA</i> (deletion)
Irrsee (Austria)	9.9.2002–2.8.2004 (18)	0.001-0.015-0.09	0.04-0.7-3.9	I	18 (100)	18 (100)	0	1 (6)*	0	0
	9.9.2002–2.8.2004 (18)			N	18 (100)	18 (100)	0	0	0	0
Mondsee (Austria)	25.9.2001–6.8.2004 (23)	0.06-0.31-1.81	5.9-25.9-227.1	I	23 (100)	23 (100)	15 (65)	18 (78)	0	22 (96)
	25.9.2001–6.8.2004 (23)			N	23 (100)	23 (100)	14 (61)*	22 (96)*	0	23 (100)*
Offensee (Austria)	5.8.2002–13.7.2004 (5)	0.02-0.23-0.54	1.8-5.7-42.9	I	5 (100)	5 (100)	0	0	0	0
	5.8.2002–13.7.2004 (6)			N	6 (100)	6 (100)	0	2 (33)*	0	0
Schwarzensee (Austria)	10.9.2001–8.7.04 (6)	0-0-0.01	0-0-1.4	I	4 (67)	4 (67)	0	0	0	0
	10.9.2001–8.7.04 (7)			N	7 (100)	7 (100)	0	0	0	0
Wolfgangsee (Austria)	26.6.2003–21.6.2004 (4)	0	0	I	4 (100)	4 (100)	0	0	0	0
	26.6.2003–21.6.2004 (4)			N	4 (100)	4 (100)	0	0	0	0
Wörthersee (Austria)	16.10.03–23.8.04 (4)	1.9-2.2-2.5	120-185-250	I	4 (100)	4 (100)	2 (50)	4 (100)	0	4 (100)
	26.9.2001–23.8.2004 (5)			N	5 (100)	5 (100)	5 (100)*	5 (100)*	0	5 (100)*

^a For Lugol counting, the detection limit is one filament in 50 ml sedimentation volume. ^b *, for sequence accession numbers, see Table 3.

and *mcyG*, it should not disturb the translation process and result in a nonfunctional protein as *mcyDIS1* does. The other 16 strains without detectable MC did not reveal insertions or deletions, and consequently, they may have acquired point mutations within the *mcy* gene cluster, as suggested by other authors (9, 23). This study is the first showing that mutations do occur frequently within the *mcy* gene cluster and that a large proportion of mutations are caused by insertion of an IS element at different sites (observed in 9 of 13 strains). A relatively large number of genes encoding putative transposases have been reported for sequenced genomes of *Nostoc* PCC7120 (10), *Nostoc punctiforme* (18), and *Synechocystis* PCC6803 (11). Transposition has been reported to result in different *Synechocystis* PCC6803 genotypes (24) and to affect gas vesicle genes in *Microcystis* PCC7806 (20). The IS elements found in this study contained ORFs that putatively encode a transposase of 363 amino acids, including the conserved domains assigned to the DDE motif of the active site, which are involved in DNA cleavage at a specific site followed by a strand transfer reaction (16). It is obvious from the different insertion sites and flanking regions that insertion of this IS element occurred several times. No stop codons were detected within the ORFs, i.e., transposition activity should still be maintained. Notably, characterization of the *mcy* gene clusters from *Anabaena*, *Microcystis*, and *Planktothrix* and the *nda* gene cluster from *Nodularia* revealed associations with transposases (2, 21, 27, 36). Those transposases were members of families distinct from that of the transposase observed in this study.

Frequency of occurrence of mutations. Although *mcyDIS1*, *mcyAIS*, and *mcyHA* were found ubiquitously distributed, the populations investigated in this study were found to differ in the frequency of occurrence of these mutations. Since PCR assays for the total population (PIP^c+/-) and for the *mcyDIS1* 3' end and *mcyHA* were shown to have the same detection limit, the lower abundance in some populations is considered unbiased by the PCR approach used in this study. The results correspond to an earlier quantification of inactive *mcy* genotypes (13) in Lake Mondsee (21% inactive genotypes) and Lake Irrsee (5% inactive genotypes) and may imply that transposase-mediated mutations do occur more frequently in populations with a larger number of individuals. The relatively high proportion of *mcy* mutants occurring in populations is surprising since it indicates that MC is not needed for the survival of individual cells in nature. Moreover, the mutants have existed for long periods of time, as indicated by the detection of some of them in different lakes and by point mutations that allow for discrimination between genotypes bearing the same mutation. Indeed, directed mutagenesis of *mcy* genes in *Microcystis* PCC7806 revealed no difference in growth between mutant and wild-type cells under different light conditions (8). On the other hand, no population has been found without any MC production, and it may be assumed that MC as a toxin is necessary to keep the ambient density of a specific group of potential antagonists low (15, 28, 29, 31). Thus, it may be sufficient if some of the genotypes in a population produce MC in defense against grazers or other organisms.

Microevolution of *mcy* genes. The mutants identified during this study support the idea of a frequent loss of the ability to synthesize MC during evolution (25). On the other hand, the

inactivation of the *mcy* gene cluster by transposable elements as observed in this study might be seen as an intermediate step in reorganization of the *mcy* gene cluster towards cell types with modified MC synthesis. Typically, organisms that lack an immune system are prolific producers of secondary metabolites (33). Recombination has been recognized as a general feature in the formation of *mcy* gene clusters for the synthesis of new structural variants of MC (14, 19, 35) and the related toxic peptide nodularin (21). Generally, transposases have been recognized as a major factor in the rearrangement of genes (30). In this study, *mcyE* was found flanked by two functional IS modules resembling transposon elements shown to mobilize DNA sequences encoding antibiotic resistance. It remains to be established whether there is a connection between the recombination processes observed within *mcy* genes, resulting in the formation of new MC variants, and the nonrandom mutations induced by transposable elements observed in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Martin Meixner for DNA sequencing. Johanna Schmidt provided excellent technical assistance. We are grateful to the Federal Agency for Water Management, Scharfling (Upper Austria), Austria, for field sampling (by Günter Bruscek and Karl Mayrhofer). Gerti Roidmayr counted *Planktothrix rubescens* cell numbers.

This study was supported by grant P15709 from the Austrian Science Fund to R.K. (Linking CYanoTOxin production to GENetic diversity).

REFERENCES

1. Anagnostidis, K., and J. Komarek. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 3-Oscillatoriales. *Algol. Stud.* **50**:327-472.
2. Christiansen, G., J. Fastner, M. Erhard, T. Börner, and E. Dittmann. 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J. Bacteriol.* **185**:564-572.
3. Davies, D. R., L. M. Braam, W. S. Reznikoff, and I. Rayment. 1999. The three-dimensional structure of a Tn5 transposase-related protein determined to a 2.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **274**:11904-11913.
4. Dittmann, E., B. A. Neilan, M. Erhard, H. von Döhren, and T. Börner. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.* **26**:779-787.
5. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Wash.
6. Fujii, K., K. Sivonen, E. Naganawa, and K. Harada. 2000. Non-toxic peptides from toxic cyanobacteria, *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron* **56**:725-733.
7. Gassner, H., A. Jagsch, D. Zick, G. Bruscek, and I. Frey. 2002. Die Wassergüte ausgewählter Seen des oberösterreichischen und steirischen Salzkammergutes, Band 15. Schriftenreihe BAW, Vienna, Austria.
8. Hesse, K., E. Dittmann, and T. Börner. 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**:39-43.
9. Kaebnick, M., T. Rohrlack, K. Christoffersen, and B. A. Neilan. 2001. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environ. Microbiol.* **3**:669-679.
10. Kaneko, T., Y. Nakamura, C. P. Wolk, T. Kuritz, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, M. Takazawa, M. Yamada, M. Yasuda, and S. Tabata. 2001. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* **8**:205-213.
11. Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, and S. Tabata. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**:109-136.
12. Kurmayer, R., G. Christiansen, and I. Chorus. 2003. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:787-795.
13. Kurmayer, R., G. Christiansen, J. Fastner, and T. Börner. 2004. Abundance

- of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ. Microbiol.* **6**:831–841.
14. **Kurmayer, R., G. Christiansen, M. Gumpenberger, and J. Fastner.** 2005. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology* **151**:1525–1533.
 15. **Kurmayer, R., and F. Jüttner.** 1999. Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *J. Plankton Res.* **21**:659–683.
 16. **Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:725–774.
 17. **Marahiel, M. A., T. Stachelhaus, and H. D. Mootz.** 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**:2651–2673.
 18. **Meeks, J. C., J. Elhai, T. Thiel, M. Potts, F. Larimer, J. Lamerdin, P. Predki, and R. Atlas.** 2001. An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium. *Phycol. Res.* **70**:85–106.
 19. **Mikalsen, B., G. Boison, O. M. Skulberg, J. Fastner, W. Davies, T. M. Gabrielsen, K. Rudi, and K. S. Jakobsen.** 2003. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J. Bacteriol.* **185**:2774–2785.
 20. **Mlouka, A., K. Comte, A.-M. Castets, C. Bouchier, and N. Tandeau de Marsac.** 2004. The gas vesicle gene cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA rearrangements that lead to loss of cell buoyancy. *J. Bacteriol.* **186**:2355–2365.
 21. **Moffitt, M. C., and B. A. Neilan.** 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6353–6362.
 22. **Moore, R. E., J. L. Chen, B. S. Moore, and G. M. L. Patterson.** 1991. Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of the carbons in the Adda and Masp units. *J. Am. Chem. Soc.* **113**:5083–5084.
 23. **Nishizawa, T., M. Asayama, K. Fujii, K. I. Harada, and M. Shirai.** 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* **126**:520–529.
 24. **Okamoto, S., M. Ikeuchi, and M. Ohmori.** 1999. Experimental analysis of recently transposed insertion sequences in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *DNA Res.* **6**:265–273.
 25. **Rantala, A., D. P. Fewer, M. Hisbergues, L. Rouhiainen, J. Vaitomaa, T. Börner, and K. Sivonen.** 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:568–573.
 26. **Rippka, R.** 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**:3–27.
 27. **Rouhiainen, L., T. Vakkilainen, B. L. Siemer, W. Buikema, R. Haselkorn, and K. Sivonen.** 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:686–692.
 28. **Sedmak, B., and G. Kosi.** 1998. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *J. Plankton Res.* **20**:691–708.
 29. **Shapiro, J. A.** 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:81–104.
 30. **Shapiro, J. A.** 1999. Transposable elements as the key to a 21st century view of evolution. *Genetica* **107**:171–179.
 31. **Skulberg, O. M.** 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules—experiences from cyanophyte research. *J. Appl. Phycol.* **12**:341–348.
 32. **Stachelhaus, T., H. D. Mootz, and M. A. Marahiel.** 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**:493–505.
 33. **Stone, M. J., and D. H. Williams.** 1992. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Mol. Microbiol.* **6**:29–34.
 34. **Suda, S., M. M. Watanabe, S. Otsuka, A. Mahakahant, W. Yongmanitchai, N. Nopartnaraporn, Y. Liu, and J. G. Day.** 2002. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoroid cyanobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1577–1595.
 35. **Tanabe, Y., K. Kaya, and M. M. Watanabe.** 2004. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. *J. Mol. Evol.* **58**:633–641.
 36. **Tillett, D., E. Dittmann, M. Erhard, H. von Döhren, T. Börner, and B. A. Neilan.** 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* **7**:753–764.
 37. **Utermöhl, H.** 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. *Mitt. Int. Verein. Limnol.* **2**:1–38.

Nontoxic Strains of Cyanobacteria Are the Result of Major Gene Deletion Events Induced by a Transposable Element

Guntram Christiansen,* Carole Molitor,* Benjamin Philmus,† and Rainer Kurmayer*

*Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestrasse 9, Mondsee, Austria; and †Department of Chemistry, University of Hawaii at Manoa

Blooms that are formed by cyanobacteria consist of toxic and nontoxic strains. The mechanisms that result in the occurrence of nontoxic strains are enigmatic. All the nontoxic strains of the filamentous cyanobacterium *Planktothrix* that were isolated from 9 European countries were found to have lost 90% of a large microcystin synthetase (*mcy*) gene cluster that encoded the synthesis of the toxic peptide microcystin (MC). Those strains still contain the flanking regions of the *mcy* gene cluster along with remnants of the transposable elements that are found in between. The majority of the strains still contain a gene coding for a distinct thioesterase type II (*mcyT*), which is putatively involved in MC synthesis. The insertional inactivation of *mcyT* in an MC-producing strain resulted in the reduction of MC synthesis by $94 \pm 2\%$ (1 standard deviation). Nontoxic strains that occur in shallow lakes throughout Europe form a monophyletic lineage. A second lineage consists of strains that contain the *mcy* gene cluster but differ in their photosynthetic pigment composition, which is due to the occurrence of strains that contain phycocyanin or large amounts of phycoerythrin in addition to phycocyanin. Strains containing phycoerythrin typically occur in deep-stratified lakes. The rare occurrence of gene cluster deletion, paired with the evolutionary diversification of the lineages of strains that lost or still contain the *mcy* gene cluster, needs to be invoked in order to explain the absence or dominance of toxic cyanobacteria in various habitats.

Introduction

Harmful algal blooms that are formed by cyanobacteria in lakes and rivers frequently contain toxins, such as the hepatotoxic peptide microcystin (MC), and they pose a serious health risk to livestock and humans (World Health Organization 2004). It has been known for a long time that the blooms that are formed by the genera *Microcystis* sp., *Planktothrix* spp., and *Anabaena* spp. consist of hepatotoxic and nonhepatotoxic strains (Carmichael and Gorham 1981). A similar variation has been recorded among dinoflagellates that produce neurotoxins (Touzet et al. 2007) and fungi that produce mycotoxins, for example, *Aspergillus* sp. that produce aflatoxin (Cary and Ehrlich 2006). The factors that regulate the ecological success of nontoxic and toxic strains in cyanobacteria are intriguing. However, no clear answer has been obtained with regard to the biological function of the toxins or the factors favoring nontoxic over toxic strains and vice versa (Orr and Jones 1998; Schatz et al. 2005; Kardinaal et al. 2007).

For cyanobacteria, it has been found that hepatotoxic and nontoxic strains differ in their content of microcystin synthetase (*mcy*) genes that encode specific peptide synthetases, which have been shown to be involved in the production of the toxic heptapeptide MC (Meißner et al. 1996; Dittmann et al. 1997). The large gene cluster (~55 kbp) consists of nonribosomal peptide synthetases (NRPS), polyketide synthases, and tailoring enzymes (Tillett et al. 2000). The gene clusters of species from 3 genera (*Microcystis*, *Planktothrix*, and *Anabaena*) have been sequenced, and comparisons revealed that the genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyG*, and *mcyJ* that are involved in MC synthesis are always present (Tillett et al. 2000; Christiansen et al. 2003; Rouhiainen et al. 2004), whereas

the 3 genera can differ in the presence of tailoring enzymes. A phylogenetic tree that was calculated from 2 housekeeping genes, the 16S rDNA and *rpoCI* genes, showed perfect congruency with the phylogeny that was calculated from *mcyA*, *mcyD*, and *mcyE* (Rantala et al. 2004). This implies that the *mcy* gene cluster is of monophyletic origin and that several lineages must have lost the *mcy* gene cluster during cyanobacterial evolution. On a species level on a much shorter timescale of evolution, most closely related strains are observed either containing or lacking the *mcy* gene cluster. In blooms that are formed by *Microcystis*, the percentage of the strains containing the *mcy* gene cluster is low (1–38%, Kurmayer and Kutzenberger 2003). In contrast, blooms that are formed by the red-pigmented (phycoerythrin-rich) populations of *Planktothrix rubescens* that occur in deep-stratified lakes in the Alps, Scandinavia and in reservoirs solely consist of strains that contain the *mcy* gene cluster (Kurmayer et al. 2004). Accessory photosynthetic pigments, such as the red-colored phycoerythrin, result in the ability to live under transparent light conditions in deep water layers. Under specific climatic conditions, red-colored blooms are observed, which are then called the “Burgundy-blood phenomenon” (Walsby et al. 2005). Green-pigmented (phycocyanin-rich) blooms of *Planktothrix agardhii* that flourish in more shallow and polymictic lakes (Davis and Walsby 2002) typically show a lower percentage of strains containing the *mcy* gene cluster (Kurmayer et al. 2004).

The process of the acquisition/loss of *mcy* genes among closely related strains is not understood. The sequencing of the *mcy* gene clusters and the closely related nodularin synthetase gene cluster has revealed the localization of open reading frames (ORFs) with a significant similarity to transposases at the downstream 3' end of the gene clusters (Tillett et al. 2000; Moffitt and Neilan 2004). Recently, a type IV pilus system has been described in *Microcystis* and has been suggested to allow for the receiving of the *mcy* gene cluster via lateral transfer (Nakasugi et al. 2007). The phylogenetic congruence between the 2 housekeeping genes and the *mcy* genes rules out the possibility of

Key words: toxicity, microcystin, mobile elements, gene loss, microevolution, ecotypes.

E-mail: rainer.kurmayer@oeaw.ac.at.

Mol. Biol. Evol. 25(8):1695–1704, 2008

doi:10.1093/molbev/msn120

Advance Access publication May 22, 2008

© 2008 The Authors.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1
***Planktothrix agardhii* and *Planktothrix rubescens* Strains that Were Used in the Present Study and Grouped According to the Presence and Absence of the *mcy* Gene Cluster**

Strain Number	Species	North(°)	East(°)	Origin	Water Depth $Z_{\text{mean}}/Z_{\text{max}}^a$
Strains not containing the <i>mcy</i> gene cluster					
250 ^I , 251 ^I , 252 ^{IV} , 253 ^{II} , 254 ^{II} , 255 ^I , 256 ^{II} , 257 ^I	P. ag ^b	39°20	0°21	Albufera Lagune, Valencia, Spain	1/3
PCC7811 ^{II}	P. ag	48°51	2°20	Vert-le-Petit, France	2/2
41 ^{II} , 63 ^{II} , 66 ^{II}	P. ag	48°49	15°16	Jägerteich, Austria	1/2
259 ^{II} , 263 ^{II} , 274 ^{II} , 277 ^{II} , 281 ^{II}	P. ag	52°31	13°20	Wannsee, Germany	6/9
299 ^{II} , 307 ^{II} , 320 ^{II}	P. ag	52°02	5°02	Klinckenberger Plas, The Netherlands	-/30
PCC7805 ^I	P. ag	52°21	4°52	Veluwemeer, The Netherlands	2/5
SAG5.81 ^{III}	P. ag	51°32	9°57	Kiessee, Göttingen, Germany	1/2
CCAP1459/15 ^{II}	P. ag	54°36	6°23	Lough Neagh, North Ireland, United Kingdom	9/34
PH22 ^{II}	P. ag	55°40	12°34	Lake Bagsværd Sø, Copenhagen, Denmark	2/3
2A ^{II}	P. ag	60°14	19°55	Lake Markusbölefjärden, Finland	-/9
Strains containing the <i>mcy</i> gene cluster					
31/1, 32, 39, 260	P. ag	52°31	13°20	Wannsee, Germany	6/9
SAG6.89	P. ag.	54°10	10°23	Plußsee, Germany	9/30
CCAP1459/11A	P. ag	54°21	2°56	Lake Windermere, United Kingdom	21/64
CCAP1459/21	P. ag.	54°21	2°58	Esthwaite Water, United Kingdom	-/16
CCAP1459/16, CCAP1459/17	P. ag.	54°40	2°98	Blelham Tam, United Kingdom	7/15
CCAP1459/31	P. ag.	53°25	7°56	White Lough, United Kingdom	-/30
79	P. ag	55°43	12°34	Lake Arresø, Denmark	6/40
CCAP1459/36*	P. ag	59°47	10°47	Lake Gjersjoen, Norway	23/64
CYA126/8	P. ag	60°15	19°55	Lake Langsjön, Finland	-/18
CCAP1460/5	P. ag	35°41	139°44	Lake Kasumigaura, Japan	4/10
64, 67*	P. rub ^c	46°36	14°03	Wörthersee, Austria	42/86
139*, 145*, 161*, 166*, 169*, 170*, 178*	P. rub	47°59	13°05	Grabensee, Austria	7/13
3, 40*, 91/1*, 97, 110*, 111	P. rub	47°48	13°22	Mondsee, Austria	37/68
108	P. rub	47°56	13°19	Irrsee, Austria	15/32
80	P. rub	47°45	13°30	Schwarzensee, Austria	27/54
82, 83/2	P. rub	47°16	11°04	Ammersee, Germany	47/81
21-	P. rub	48°06	16°18	Figur, Austria	8/12
CCAP1459/30	P. rub	54°08	10°25	Plöner See, Germany	16/60
CCAP1459/14	P. rub	54°25	3°0	Loughrigg Tam, United Kingdom	12/13
PCC7821	P. rub	59°47	10°47	Lake Gjersjoen, Norway	23/64

NOTE.—International culture collections: SAG, culture collection of algae (Göttingen, Germany); PCC, Pasteur culture collection (Paris, France); and CCAP, culture collection of algae and protozoa (Windermere, United Kingdom). ^{I,II,III,IV} Strains showing *mcy* gene cluster deletions of types I, II, III, and IV, respectively. *Strains found inactivated by IS of transposable elements (Christiansen et al. 2006).

^a Z_{mean} , mean water depth; Z_{max} , maximum water depth of the origin of isolation.

^b P. ag, *P. agardhii*, green-pigmented strains.

^c P. rub, *P. rubescens*, red-pigmented strains.

the horizontal transfer of the *mcy* gene cluster between genera (Rantala et al. 2004). However, the frequency of the transfer of the *mcy* gene cluster among other closely related strains remains unclear. In order to find out whether the variation in toxicity among strains in *Planktothrix* resulted from gene loss, 25 nontoxic strains were analyzed for remnants of the *mcy* gene cluster. In all the nontoxic strains, *mcy* operon remnants were found that were derived from a major gene cluster deletion event that succeeded the insertion (IS) of mobile elements.

Materials and Methods

Organisms

The 62 strains that were used for this study were either isolated from European lakes (44 strains) or obtained from culture collections (table 1 and fig. 1). The strains originated from 9 countries and 28 different water bodies. All the strains were assigned to either *P. rubescens* or *P. agardhii* following the criteria published previously (Suda et al. 2002). All the strains were grown in BG₁₁ medium (Rippka

1988) at 15 °C and under low light conditions (10 μmol m⁻² s⁻¹, Osram L30W/77 Fluora).

Genetic Analysis of the Strains

In order to search for the remnants of the *mcy* gene cluster in nontoxic strains, primer pairs covering the whole *mcy* gene cluster were designed and used to amplify fragments of 500 bp without interruption (124 primer pairs, supplementary table S1, Supplementary Material online). Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed in a volume of 20 μl, containing 2 μl of Qiagen PCR buffer (Qiagen, Vienna, Austria), 1.2 μl MgCl₂ (25 mM, Qiagen), 0.6 μl deoxynucleotide triphosphates (10 μM each, MBI Fermentas, St Leon-Rot, Germany), 1 μl of each primer (10 pmol μl⁻¹), 0.1 μl *Taq* DNA polymerase (5 units μl⁻¹, Qiagen), 13.1 μl sterile millipore water, and 1.0 μl of DNA (50 ng μl⁻¹). The PCR thermal cycling protocol included an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, at 60 °C annealing temperature for 30 s, and elongation at 72 °C for 30 s. By the use of

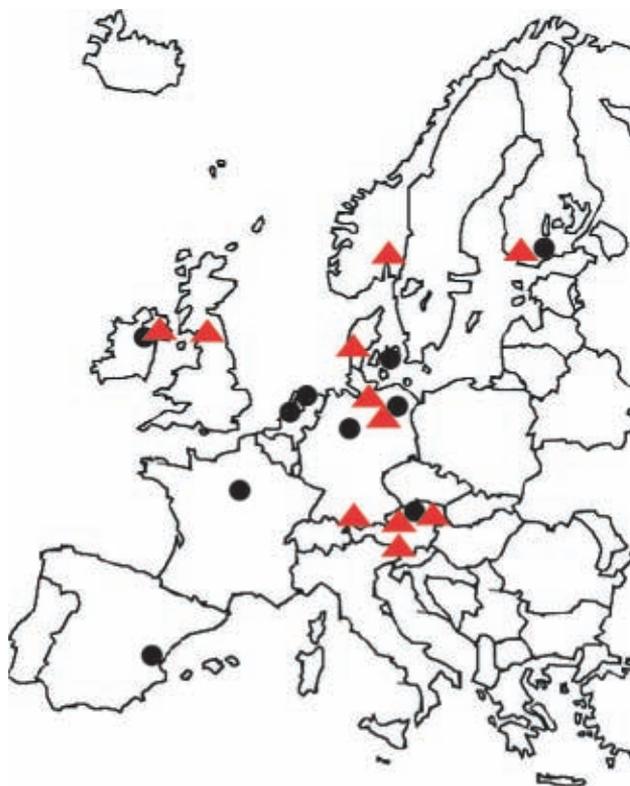


FIG. 1.—Origin of the strains of the cyanobacterium *Planktothrix* spp. isolated from European freshwater sites. Red triangles, strains containing the *mcy* gene cluster encoding the synthesis of the toxic heptapeptide MC (37 strains) and black dots, nontoxic strains lacking the *mcy* gene cluster (25 strains).

this technique, 8 strains (No41, 63, 66, PH22, 2A, SAG5.81, CCAP1459/15, PCC7805, and PCC7811) were found to contain *mcyT*. Seventeen additional nontoxic strains were used to test for the presence of *mcyT* by using the primers *mcyTA-Z+*: TAATTGATCCCCTGATCAATGATC and *mcyTA-Z-*: ATGCAAATAGACCAACTAAGCC amplifying 791 bp. The strains containing *mcyT* were analyzed for the 5' and the 3' ends using a genome walking method (Siebert et al. 1995). The same method was used to sequence the 3' end of the *mcy* gene cluster (AJ441056). The total DNA was digested with *EcoRV* and *DraI* at 37 °C overnight, and the DNA was extracted once by using phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) and once with chloroform and then washed with ethanol subsequent to glycogen-aided precipitation. A total of 100 ng μl^{-1} of DNA were then ligated to long suppression adapters at 4 °C overnight. One adapter contained an amino group at the 3' end and ligated to any DNA fragment that was generated by restriction enzymes that yielded blunt ends. During primary PCR, this amino group blocked the extension of the lower adaptor strand unless a gene-specific primer extended to the opposite DNA strand. The primary PCR mixture was then diluted 1:100 and used as a template for a secondary or “nested” PCR with the nested adaptor-specific primer and a nested gene-specific primer. Primary PCR was performed with 2 Step Advantaq (Clontech, St. Germain-en-Lave, France) at 68 °C anneal-

ing (30 s) and 68 °C elongation (3 min). Nested PCR was performed by using Advantaq at 68 °C elongation (3 min).

In addition, all the strains were sequenced for 16S rDNA and 3 intergenic spacer (IGS) regions: PC-IGS (the IGS between *cpcB* and *cpcA* genes), 16S ITS (the internal transcribed spacer located between the 16S and 23S rDNA), and PSA-IGS (the IGS between *psaA* and *psaB* genes). The forward primer (5'–3') 16Sfwd581 “CAGTG-GAAACTGGAAGACTAGAGTGTA” (63 °C) and the reverse primer 16Srev999 “GCACCTGTCCTTCTGGTTCCTTAC” (62 °C) were used to sequence part of the 16S rDNA (418 bp). The primers that were used to amplify and sequence PC-IGS (271 bp) have been described previously (Kurmayer et al. 2004). For 16S ITS, the forward primer (5'–3') 16SITSneu+ “GCTAGGAAAGAAAG-GAACTTTC” (61 °C) and the reverse primer untranslated leader region– “CCT CTG TGT GCC TAG GTA TC” (59 °C) (394 bp) were used (Janse et al. 2003). For PSA-IGS, the forward primer *psafwd* “GGGTGGTACTTGCCAAGTCTCT” (58 °C) and the reverse primer *psarev* “CGACGTGTTGTCTGGGTCTT” (58 °C) (669 bp) were used. All the PCR products were cloned and sequenced according to the standard techniques. The sequences were submitted to GenBank under the following accession numbers: 16S rDNA (EU266118–EU266179), PC-IGS (EU266242–EU266303), 16S ITS (EU266180–EU266241), PSA-IGS (EU258202–EU258263), *mcyT* (EU266304–EU266364), *mcyT* 5' flanking region (EU271829–EU271852), *mcyT* 3' flanking region (EU271805–EU271828), *mcyJ* and flanking regions sequenced from strain No252 (EU271803), and the IS element sequenced from strain CYA126/8 (EU271804). The sequence of the IS element that was involved in the deletion of the *mcy* gene cluster was submitted to the IS finder database and denoted as *ISPlag1* (Siguier et al. 2006).

Functional Analysis of the Thioesterase Type II *mcyT*

In order to confirm the involvement of *mcyT* in the biosynthesis of MC, the gene was insertionally inactivated in the transformable strain CYA126/8 by homologous recombination as described (Christiansen et al. 2003). To build the transformation construct, *mcyT* was amplified and cloned using the pDrive cloning system (Qiagen) and subsequently partially digested using *HindIII* according to the standard protocols (Sambrook et al. 1989). The 3' overhangs were blunted using Klenow Polymerase (Fermentas, Hanover, MD) and ligated with the *BsaAI* fragment (1.9 kbp) from pACYC184 containing the chloramphenicol resistance cassette (Cm^{R}). The *mcyTKOCm^R* construct contained 1.5 kbp of homologous sequence on both 5' and 3' ends and was introduced by electroporation as described (Christiansen et al. 2003). Transformed cyanobacterial cells were inoculated in BG₁₁ medium. After 48 h, chloramphenicol was added to the culture medium (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and resistant clones emerged after 6 weeks. PCR using primers binding to the flanking regions of the inserted chloramphenicol resistance gene showed the stable integration of the construct *mcyTKOCm^R* at the expected position as a result of a homologous crossover recombination event. In

addition, the *mcyT* gene in the knockout mutant as well as in the wild-type strain was amplified by PCR using the *mcyTA-Z* primers. The calculated PCR product of 791 bp was obtained for the wild-type strain only, whereas the Δ *mcyT* mutant showed an amplicon of 2.7 kbp due to the IS of the Cm^R fragment (1.9 kbp). Consequently, the Δ *mcyT* mutant was fully segregated.

The wild-type strain CYA126/8 and the Δ *mcyT* mutant were compared in the MC production under semicontinuous culture conditions following the turbidostat principle (Kohl and Nicklisch 1988) at 20 °C and 40–60 μ E $m^{-2} s^{-1}$ (Philips LTD, 36W/965). The growth of the cells was monitored by measuring the absorbance at 880 nm (5-cm light path) every other day and each time optical density ≥ 0.1 the culture was diluted to optical density = 0.01 (corresponding to a biomass of 1.44 ± 0.17 [standard error] $mm^3 L^{-1}$ of biovolume). The cells were harvested at optical density = 0.1 onto glass fiber filters (BMC Ederol, Vienna, Austria) directly in the culture room using low-vacuum filtration (< -0.4 bar), in which the filters with the collected cells were flash frozen in liquid nitrogen for subsequent RNA isolation. Aliquots of the cells were filtered onto preweighed glass fiber filters and dried at room temperature in a vacuum centrifuge, reweighed, and stored frozen at -20 °C. The dissolved MCs were collected from the filtrate by using solid phase extraction via tC_{18} cartridges (Waters, Sep-Pak Vac 1cc [100 mg]) according to the standard techniques. For cell number determination, the cells were fixed in 2% formaldehyde and enumerated using 6-diamidino-2-phenylindole staining following the standard procedures.

Filters were extracted in 50% methanol (v/v), as described (Kurmayer et al. 2004), and the extracts were analyzed for MCs by using high-performance liquid chromatography coupled to diode array detection at 240 nm, using a linear gradient from 20% acetonitrile (0.05% trifluoroacetic acid) to 50% acetonitrile on a LiChrospher 100, ODS, 5 μ m, LiChroCART 250-4 cartridge system (Merck, Darmstadt, Germany) at 1 ml min^{-1} . Aeruginosides were identified and quantified at 210 nm under the same conditions (Ishida et al. 2007). The quantification of MCs was achieved by using the calibrated standards that were obtained from Cyanobiotec GmbH (Berlin, Germany).

RNA was extracted following the standard protocols with Trizol reagent under liquid nitrogen as described (Kaebnick et al. 2000) and converted to cDNA by reverse transcription. The quantification of *mcy* transcripts was performed using real-time PCR by using the TaqMan assay (Kurmayer and Kutzenberger 2003). TaqMan Probes for PC-IGS and *mcyB* were used (Schober and Kurmayer 2006). All the growth experiments were repeated 4 times.

Phylogenetic Analysis

Sequences of *mcyT* (751 bp) were aligned by using multiple sequence alignment (ClustalW 1.8). Maximum likelihood analysis was used in order to estimate the nucleotide substitution parameters under a general time-reversible nucleotide substitution model by estimating the gamma distribution for the variable rates among the sites. Ambiguous

sites (wherein at least one sequence showed a gap) were removed (3 sites), and the discrete gamma algorithm was used to approximate a continuous gamma distribution using 5 categories of rates (ncatG = 5) in the program BASEML of the PAML software package (version 3.14, Yang 1997). Phylogenetic trees were also constructed using: 1) Neighbor-Joining from the nucleotide sequences distance matrix (calculated using Kimura's substitution model) and 2) maximum parsimony from nucleotide sequences by using the PHYLIP software package (Felsenstein 1993). The statistical significance of the branches was estimated by bootstrap analysis in turn generating 100 replicates of the original data set by using the PHYLIP software package. Finally, consensus trees following the 50% majority rule were computed.

For *mcyT*, the ratio of nonsynonymous (d_N) and synonymous (d_S) substitution rates per site was determined by using maximum likelihood estimates as implemented in PAML. For the nontoxic and toxic strains separately, the "one ratio" model, estimating the d_N/d_S ratio, and the "fixed-ratio" model, assuming a constant d_N/d_S ratio as observed for other *mcy* genes in the *mcy* gene cluster ($d_N/d_S = 0.2$), were statistically compared by constructing a likelihood ratio test (Yang 1998).

For multiple locus sequence typing (MLST), all the nontoxic (25) and toxic strains (37) were defined by the alleles (unique genotypes) that were present at 4 additional sequenced loci (the allelic profile): 16S rDNA, 16S–23S rDNA-ITS, PC-IGS, and PSA-IGS. Each unique allelic profile was assigned a sequence type (ST). Isolates with the same ST at all the loci were considered to be members of a single clone (Feil et al. 2004). The program eBurst (V3) was used via the MLST Web site (<http://www.mlst.net/>) in order to divide the 62 strains into clonal complexes. Each of the clonal complexes only contained strains sharing at least 3 of 4 identical alleles with at least one other strain in the group. The primary founder of a group was defined as the ST that differs from the largest number of other STs at only a single locus (i.e., the ST that has the greatest number of single locus variants [SLVs]). The level of confidence in the predicted founding ST was estimated by using the default settings, that is, 1,000 random data sets of the same size as the original data set were produced by resampling with replacement, and the bootstrap values, which were shown for each ST, are the percentage of times that the ST was predicted to be the primary founder of the group (Feil et al. 2004).

Results

Characterization of the Remnants of the *mcy* Gene Cluster

In 24 out of the 25 nontoxic strains, *mcyT* (751 bp), a gene coding for a distinct thioesterase type II (TeII), was amplified. A distinct TeII has been frequently associated with NRPS gene clusters and has been shown to positively influence the synthesis rate of corresponding NRPS (Mootz et al. 2001; Schwarzer et al. 2002). This is due to the regeneration of the misprimed 4'-phosphopantetheine (4'PP) cofactor of the peptidyl carrier protein because the 4'PP transferases are not able to distinguish between

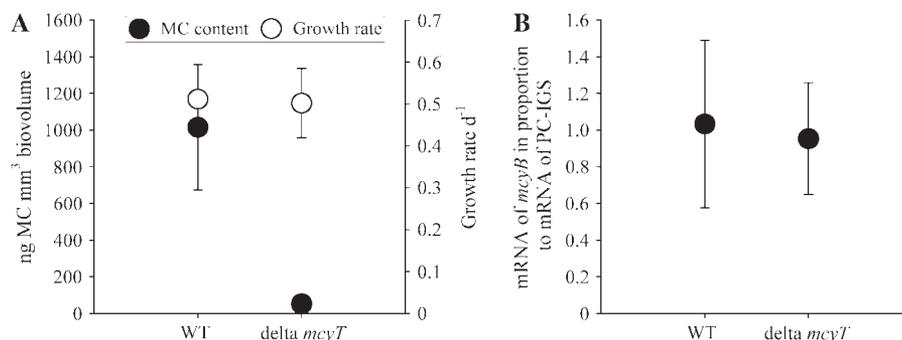


FIG. 2.—Growth rate, MC content, and *mcy* transcripts of the wild-type *Planktothrix* strain CYA126/8 and its $\Delta mcyT$ mutant grown under semicontinuous culture conditions. (A) Mean (± 1 SD) MC content (per mm³ of biovolume, black circles) and growth rates (μ d⁻¹, white circles). (B) The mRNA contents of *mcyB* in proportion to PC-IGS (in percentage of *mcyB*) for the same experiment.

acetylated and free CoA (Quadri et al. 1998). The acetylation of 4'PP has the consequence that the biosynthesis is blocked until a TeII cleaves the acetyl residue from the 4'PP making the biosynthesis possible. In *Planktothrix*, the *mcyT* gene is located at the 5' end of the *mcy* gene cluster but has not been found in the *mcy* gene cluster of other MC-producing cyanobacteria (Christiansen et al. 2003). To demonstrate the role of McyT in MC synthesis, the *mcyT* gene was inactivated by experimental mutagenesis in *P. agardhii* strain CYA126/8. The wild-type strain contained 964 ± 321 ng (± 1 standard deviation [SD]) of MC-RR ($68 \pm 3\%$) and MC-LR ($32 \pm 3\%$) per mm³ of biovolume ($n = 5$). The insertional inactivation of *mcyT* resulted in a reduction of MC synthesis by $94 \pm 2\%$ (1 SD) compared with the wild type. In contrast, the proportion of MC variants, cellular growth rates, as well as the transcriptional rates of other *mcy* genes (*mcyB*) were not altered (fig. 2). The synthesis rate of the related, coproduced nonribosomally synthesized (NRS) peptides such as aeruginoside 126A, 126B (Ishida et al. 2007) was not significantly affected ($37 \pm 71\%$ increase compared with the wild type). It is concluded that *mcyT* is directly involved in MC synthesis. In one nontoxic strain, we were unable to amplify *mcyT* but detected another *mcy* operon remnant at the other (3') end of the *mcy* gene cluster, *mcyJ*, which was an O-methyltransferase that was previously shown to be involved in MC synthesis (Christiansen et al. 2003).

Characterization of the Sequence Breaking Points of the *mcy* Gene Cluster

There were identical flanking sequences observed directly upstream and downstream of all the *mcy* operon remnants: at the 5' end similarity was 99.0–100% (300 bp, the strain with the *mcyJ* remnant only had 219 bp) and at the 3' end similarity was 98.7–100% (207 bp, the strain with the *mcyJ* remnant had 241 bp) (fig. 3, supplementary figs. S1 and S2, Supplementary Material online). Those flanking sequences that were found in the nontoxic strains also had the highest similarity to the corresponding region of the toxic strain CYA126/8: at the 5' end similarity was 99.0–99.7% (300 bp, for AJ441056, Positions 149–449) and at the 3' end similarity was 93.2–94.2% (207 bp, located 1,406 bp downstream of the stop codon of *mcyJ* AJ441056). In between the 2 regions that were originally flanking the *mcy* gene cluster, shorter fragments containing the inverted repeated sequences “CAGGACTTACGCAAGCACGC-TATATATAG” (29 bp) occurred. These shorter fragments were found directly adjacent to the *mcy* operon remnants (*mcyT* and *mcyJ*) and were identified as terminal inverted repeats, part of the remnants of an IS element (197 bp) *ISPlag1* that was sequenced from the toxic strain CYA126/8 (1,306 bp). *ISPlag1* encoded a single ORF (337 aa) with similarity to the IS701 group that was originally a part of the heterogeneous IS4 family (Chandler and Mahillon 2002); ISMhu9 from *Methanospirillum hungatei*

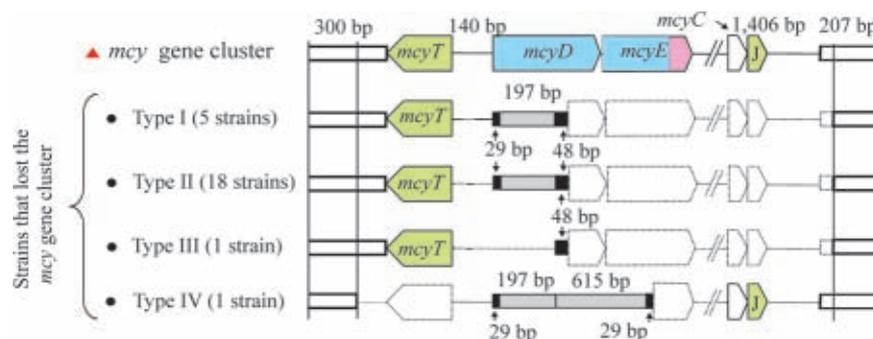


FIG. 3.—Schematic view of the *mcy* operon remnants and flanking regions in strains that lost the *mcy* gene cluster. The 4 types (I–IV) of gene cluster deletion events are shown. Vertical straight lines enclose the identical 5' and 3' ends. The gray gene regions represent the remnants of the IS elements (197 bp) containing terminal inverted repeats (29 bp or 48 bp) (black boxes). The dotted areas indicate the deletions. Red triangle, strains containing the *mcy* gene cluster and black dots, nontoxic strains lacking the *mcy* gene cluster.

strain JF-1 (E value 5×10^{-43} , YP_501731). Residues 257–270 (CAIRWKIEEFHREIK) corresponded to the [Y/L](2)R(3)[I/L/V]E(6)K signature characteristic of the C1 domain of bacterial transposases (Rezsöházy et al. 1993). Notably, all the nontoxic strains contained remnants of the same mobile element that was located between the former flanking regions of the *mcy* gene cluster. According to the presence of the *mcy* operon remnants and the location of the remnants of the IS element 4 different types of *mcy* gene cluster deletion events were distinguished: types I (5 strains), II (18 strains), and III (1 strain), all of which contained *mcyT* but differed in the remaining intergenic promoter region between *mcyT* and *mcyD* (type I vs. type II) or in the sequence length of the remnant of the IS element (types I and II vs. type III). In contrast, type IV contained *mcyJ* instead of *mcyT* and 1 additional larger remnant of the same IS element (615 bp) that was inserted in opposite direction to the shorter remnant (197 bp) found also in types I and II. We conclude, therefore, that the remnants of the IS element that was found directly adjacent to the *mcy* operon remnants were derived from functional IS elements that were inserted into the *mcy* gene cluster.

In silico Characterization of the Remnants of the *mcy* Gene Cluster

To determine whether *mcyT*, as a remnant of the *mcy* gene cluster, is still a functional gene that is involved, for example, in the biosynthesis of other NRS peptides occurring frequently in *Planktothrix* (Fujii et al. 2000; Ishida et al. 2007), it was sequenced (751 bp) from all the strains that contained (37 strains) or that had lost the *mcy* gene cluster (24 strains). The nontoxic strains formed a phylogenetic lineage that was distinct from the lineage that was formed by strains containing the *mcy* gene cluster (fig. 4). The ratio of nonsynonymous (d_N) and synonymous (d_S) substitution rates was used to differentiate between purifying selection and relaxation of selective constraints (Yang 1998). Typically, the gene regions that show a high degree of purifying selection have d_N values $<$ d_S values (negative purifying selection), whereas d_N values \approx d_S values are indicative of a relaxation of selective constraints (Yang 2005). For various genes of the *mcy* gene cluster, a d_N/d_S ratio = 0.2 was calculated (Tanabe et al. 2004; Kurmayer and Gumpenberger 2006). A likelihood ratio test was performed in order to test the hypothesis of the relaxation of selective constraints against the purifying selection for *mcyT* of both lineages. Only for the strains that had lost the *mcy* gene cluster ($d_N/d_S = 1.45$), the likelihood was significantly improved (degree of freedom = 1, $P < 0.0001$), whereas for the strains still containing the *mcy* gene cluster ($d_N/d_S = 0.46$), the estimated likelihood did not differ significantly from the null model ($d_N/d_S = 0.2$). Thus, it is concluded that purifying selection for *mcyT* was lost subsequent to its separation from the *mcy* gene cluster.

Phylogenetic Origin of the Deletion of the *mcy* Gene Cluster

The phylogenetic origin of the *mcy* gene cluster deletion was identified by sequencing all the strains for gene

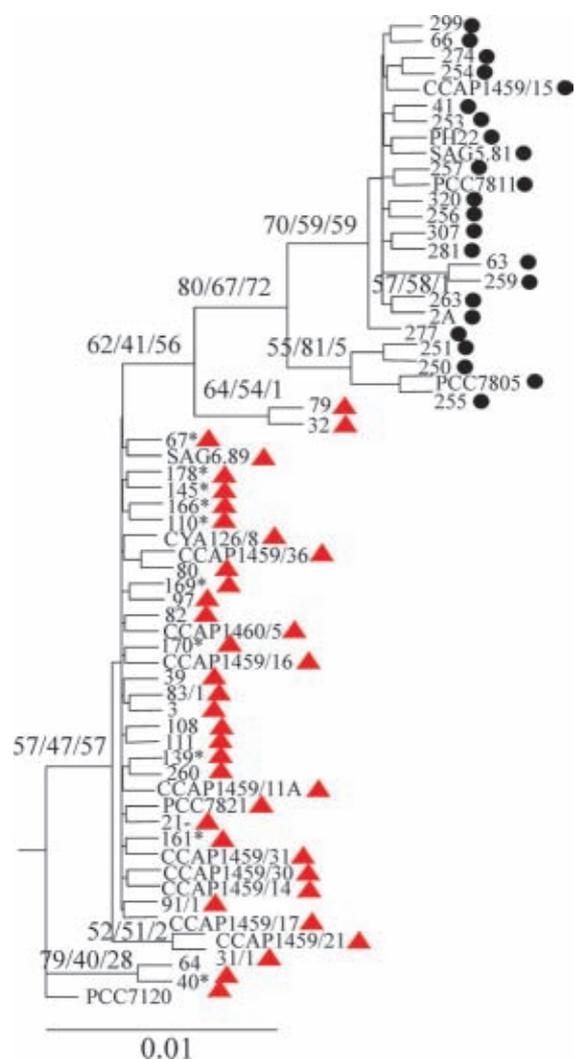


FIG. 4.—Maximum likelihood tree of *Planktothrix* strains containing *mcyT* as part of the *mcy* gene cluster (red triangles) and as a remnant of the *mcy* gene cluster (black dots). The numbers at the nodes indicate the percent bootstrap frequency (100 replicates) that was obtained from maximum likelihood–Neighbor-Joining–maximum parsimony calculated using the PHYLIP package. The tree was rooted using the *Nostoc* sp. strain PCC7120 as an outgroup. Only the bootstrap values of $>50\%$ are shown. Asterisks indicate strains that were inactivated by transposable elements but still contained the whole *mcy* gene cluster (Christiansen et al. 2006).

regions that are representative of essential housekeeping genes, that is, the 16S rDNA region (302 bp), the IGS between *cpcB* and *cpcA*, PC-IGS (211 bp), the ITS that is located between the 16S and 23S rDNA, 16S rDNA-ITS (317 bp), and the IGS between *psaA* and *psaB*, PSA-IGS (615 bp). All the strains shared nearly identical 16S rDNA sequences, in contrast to the number of polymorphic sites was higher at the other more variable spacer regions (table 2). In total, 25 unique genotypes were detected with 19 genotypes occurring only once. By using MLST (Feil et al. 2004), 2 clonal complexes were observed: 1) lineage 1 was comprised of both the strains that lost and that contained the *mcy* gene cluster and 2) lineage 2 was comprised of the strains containing the *mcy* gene cluster

Table 2
Number of Unique Genotypes (Alleles) and Variable Sites of Sequences at the Gene Loci that Were Analyzed in the *Planktothrix* Strains that Lack, or Contain, the *mcy* Gene Cluster

Locus	Bp ^a	Maximum Dissimilarity (%)	N ^b	Number of Variable Sites	Number of Alleles
Strains lacking the <i>mcy</i> gene cluster (n = 25)					
<i>mcyT</i>	751	0.93	24	36	22
16S ITS	316	2.23	25	10	5
PC-IGS	211	6.16	25	13	2
PSA-IGS	615	0.49	25	5	6
16S	302	1.32	25	4	3
Strains containing the <i>mcy</i> gene cluster (n = 37)					
<i>mcyT</i>	751	0.67	37	14	11
16S ITS	317	2.23	37	10	2
PC-IGS	211	7.11	37	17	7
PSA-IGS	615	3.74	37	24	6
16S	302	0	37	0	1
All strains (n = 62)					
<i>mcyT</i>	751	1.74	61	48	33
16S ITS	317	3.82	62	16	6
PC-IGS	211	7.11	62	17	7
PSA-IGS	615	3.9	62	28	10
16S	302	1.32	62	4	3

^a Bp, base pair number sequenced.

^b N, number of sequences.

including all the red-pigmented strains that are assigned to *P. rubescens* (fig. 5). In lineage 1, the primary founder (11 strains), which is defined as the ST with the greatest number of SLVs, contained the 2 most divergent types of *mcy* gene cluster deletion (types II and IV). The other types of deletions (I and III) were detected as SLVs or double locus variants. Therefore, nontoxic strains are all derived from a single ancestral strain that became inactive due to IS element-mediated IS followed by *mcy* gene cluster deletions and divergence.

Discussion

IS elements are generally recognized as important mutagenic agents (Doolittle and Sapienza 1980; Chandler and Mahillon 2002). Little is known, however, about the relative importance of the IS- or excision-induced variation in natural populations of bacteria as opposed to other mechanisms, for example, lateral gene transfer. In the present study, all the strains that lost the *mcy* gene cluster still contained inverted terminal repeated sequences between the 5' and 3' end *mcy* operon remnants that were probably derived from more than one copy of a putative IS element. The most likely mechanism that caused the *mcy* gene cluster deletion in all the strains was conservative site-specific recombination (Craig 1988), which resulted from the IS of 2 copies of the IS element at both ends of the *mcy* gene cluster. Indeed, in the vast majority of the strains that lost the *mcy* gene cluster, the inverted repeated sequences showed direct orientation when flanking the *mcy* operon remnants at the 5' and the 3' ends. It is, therefore, concluded that the loss of the

mcy genes is the result of a 2-step process, that is, the inactivation of the *mcy* gene cluster via the peripheral IS of 2 copies of an IS element that finally led to its deletion.

It is anticipated that the genotypes that become inactivated in MC synthesis by an IS element must be able to persist under natural conditions until the inactive *mcy* gene cluster is lost due to site-specific recombination. We previously described the inactivation of the *mcy* gene cluster by another IS element among the strains of the second lineage that always contain the *mcy* gene cluster (Christiansen et al. 2006). Those *mcy* genotypes that became inactivated by an IS element cannot be distinguished from active *mcy* genotypes via MLST (figs. 4 and 5) and have been observed to occur in deep-stratified lakes for at least 5 years. Although the inactive *mcy* genotypes make up the minor part of the population only (e.g., 21% in Lake Mondsee, Kurmayer et al. 2004), it is obvious that the inactivation of the *mcy* gene cluster through IS elements does not imply a selective disadvantage to the individual. On the other hand, the insertional inactivation of MC synthesis in *Microcystis aeruginosa* did not increase growth under different light conditions (4–110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) compared with the MC-producing wild type (Hesse et al. 2001). This implies that the metabolic costs that are attributable to MC synthesis are not necessarily of relevance for the cell division rate. In the present study, only those strains that lost more than 90% of the *mcy* gene cluster were spread throughout Europe. One explanation for this could be that only larger gene deletion events may provide sufficient selective advantage for a specific genotype due to the energy requirements that are involved in the translational machinery (Mira et al. 2001). Under laboratory conditions, a sudden appearance of mutants that lost a larger part of the *mcy* gene cluster has in fact been reported (Schatz et al. 2005). Because the strain CYA126/8 is the only toxin-producing cyanobacterium that has been repeatedly transformed in several laboratories (Christiansen et al. 2003; Ishida et al. 2007), the experimental deletion of parts or the full *mcy* gene cluster of this strain is proposed as a tool for differentiating between the costs that are attributable to MC synthesis (e.g., $\Delta mcYT$) and the costs of the replication/translation of the *mcy* gene cluster (e.g., constructing a mutant by deleting larger parts of the *mcy* gene cluster) compared with the wild type.

In contrast to observations in the laboratory (Schatz et al. 2005), the results of this study point to a much slower replacement of toxic strains by nontoxic strains that lost the *mcy* gene cluster under natural conditions. Assuming a random spontaneous mutation rate of 4.1×10^{-10} (Drake 1991) along with an annual mean growth rate of 0.14 per day (Davis and Walsby 2002), the time necessary to create 5 random spontaneous mutations (the minimum dissimilarity between *mcyT* [791 bp] of nontoxic strains compared with toxic strains, fig. 4) was calculated to be 3.6 Myr. It could be argued that, for most of the time, cells do not grow exponentially but rather linearly, and nontoxic strains may competitively exclude toxic strains under nearly exponential growth conditions during prebloom periods in eutrophic lakes (e.g., Kardinaal et al. 2007). Indeed, *Planktothrix* occurring in deep-stratified lakes can dominate phytoplankton for years without pronounced periods of exponential growth/decline, whereas *Planktothrix*

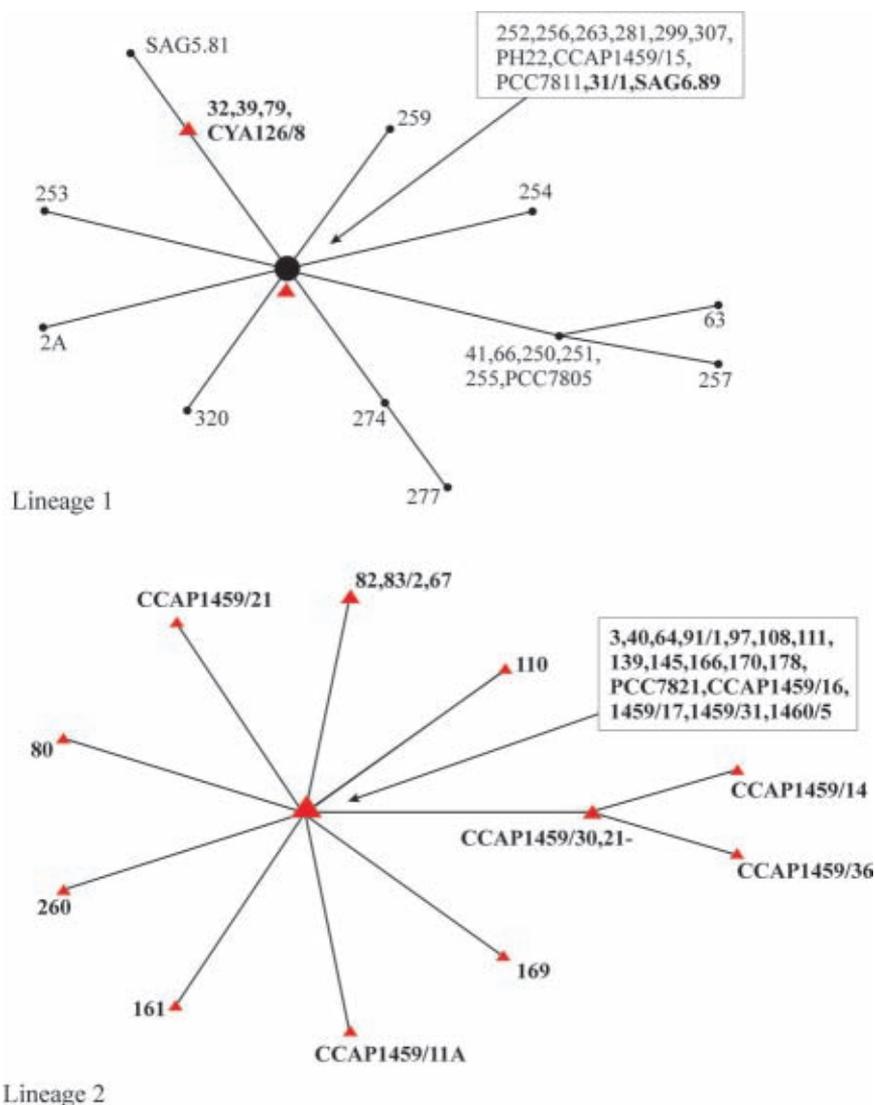


FIG. 5.—MLST diagrams showing 2 clonal complexes of strains that lost (lineage 1) or still contained the *mcy* gene cluster (lineages 1 and 2). Red triangles and bold letters: strains containing the *mcy* gene cluster encoding the synthesis of the toxic heptapeptide MC (37 strains) and black dots and normal letters: nontoxic strains that lost the *mcy* gene cluster (25 strains). Lineage 1, central founder (11 strains), bootstrap confidence 85% and lineage 2, central founder (17 strains), bootstrap confidence 92%. The connected STs differ at only 1 sequenced locus. The size of the symbols is proportional to the number of strains representing each ST.

occurring in more shallow lakes may show an exponential increase/decline during the season (Salmaso and Padisak 2007). However, even a 1,000-fold underestimation of a random spontaneous mutation rate for *mcyT* would imply that shifts between toxic strains and nontoxic strains as observed during seasonal succession in lakes cannot be directly of relevance to the evolution of the *mcy* gene cluster. Due to the extremely rare event of the *mcy* gene cluster deletion, the sole occurrence of toxic genotypes in *P. rubescens* populations in deep-stratified lakes (Kurmayer et al. 2004) can be explained by the evolutionary diversification of a genotype that still contains the *mcy* gene cluster. It has been suggested that *P. rubescens* diversified from *P. agardhii* due to its pigment adaptation to an underwater light climate relatively recently (Suda et al. 2002). We anticipate that evolutionary diversification that is driven by selective

factors other than an underwater light climate, for example cyanophages or hydrostatic pressure, will lead to a clonal dependence of MC production also in other taxa. In a recent study, numerous cyanophages active against *Anabaena*, *Planktothrix*, and *Microcystis* were reported (Deng and Hayes 2008). Cyanophage dynamics may further select phage-resistant genotypes and indirectly affect the shifts between MC-producing and non-MC-producing genotypes in *Microcystis* (Yoshida et al. 2008). Correspondingly, Tanabe et al. (2007) by using MLST found a clonal population structure of *Microcystis* sp., suggesting that each phylogenetic cluster might represent a “cryptic” ecotype (Cohan 2002). It is noteworthy that the occurrence of *mcyG* showed a clonal dependence, that is, all the strains containing *mcyG* were part of 2 lineages (groups A and B), whereas the other groups (C, D, and E) consisted of strains lacking

the *mcyG* gene. Consequently, the frequently observed co-occurrence of toxic and nontoxic strains (Carmichael and Gorham 1981; Vezie et al. 1998) can only be understood if it is interpreted in terms of evolutionary diversification that is driven by selective factors including those not directly linked to MC production. Future experiments that aim at a cost–benefit analysis of MC production need to consider the fact that even closely related strains that differ in MC production might also differ in other ecological traits, reflecting the process of adaptation to their respective environment. For example, it is well known that the natural isolates of bacteria (Mikkola and Kurland 1992) and cyanobacteria (Van Liere and Mur 1980) usually differ widely in their maximum specific growth rate under standardized laboratory conditions. This implies that the measured growth rates of nontoxic and toxic strains under experimental conditions cannot be used to relate the fitness of a particular strain to the presence/absence of MC production.

Supplementary Material

Supplementary figures S1 and S2 and table S1 are available at *Molecular Biology and Evolution* online (<http://www.mbe.oxfordjournals.org/>).

Acknowledgments

We are most grateful to our colleagues for sending water samples to us or who delivered strains (in alphabetical order): Antonio Camacho, Peter Henriksen, Kaarina Sivonen, and Linda Tonk. Johanna Schmidt provided rather valuable assistance in the laboratory. We very much appreciate the comments of 3 anonymous reviewers. This study was financed by a grant from the Austrian Science Fund P18185 “Microevolution of toxin synthesis in cyanobacteria.”

Literature Cited

- Carmichael WW, Gorham PR. 1981. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In: Carmichael WW, editor. *The water environment: algal toxins and health*. New York: Plenum Press. p. 161–172.
- Cary J, Ehrlich K. 2006. Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia*. 162:167–177.
- Chandler M, Mahillon J. 2002. Insertion sequences revisited. In: Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM, editors. *Mobile DNA II*. Washington (DC): American Society for Microbiology. p. 305–366.
- Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Börner T, Dittmann E. 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J Bacteriol*. 185:564–572.
- Christiansen G, Kurmayer R, Liu Q, Börner T. 2006. Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Appl Environ Microbiol*. 72:117–123.
- Cohan FM. 2002. What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol*. 56:457–487.
- Craig NL. 1988. The mechanism of conservative site-specific recombination. *Ann Rev Genet*. 22:77–105.
- Davis PA, Walsby AE. 2002. Comparison of measured growth rates with those calculated from rates of photosynthesis in *Planktothrix* spp. isolated from Blelham Tarn, English Lake District. *New Phytol*. 156:225–239.
- Deng L, Hayes PK. 2008. Evidence for cyanophages active against bloom-forming freshwater cyanobacteria. *Freshwater Biology*. 53:1240–1252.
- Dittmann E, Neilan BA, Erhard M, von Döhren H, Börner T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol Microbiol*. 26:779–787.
- Doolittle WF, Sapienza C. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*. 284:601–603.
- Drake J. 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:7160–7164.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. 2004. Eburst: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*. 186:1518–1530.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (phylogeny inference package). Version 3.5c. Seattle (WA): Department of Genetics, University of Washington.
- Fujii K, Sivonen K, Naganawa E, Harada K. 2000. Non-toxic peptides from toxic cyanobacteria, *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron*. 56:725–733.
- Hesse K, Dittmann E, Börner T. 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiol Ecol*. 37:39–43.
- Ishida K, Christiansen G, Yoshida WY, Kurmayer R, Welker M, Bonjoch J, Hertweck C, Börner T, Hemscheidt T, Dittmann E. 2007. Biosynthetic pathway and structure analysis of aeruginoside 126A and B, cyanobacterial peptide glycosides bearing an unusual 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole moiety. *Chem Biol*. 14:565–576.
- Janse I, Meima M, Kardinaal WEA, Zwart G. 2003. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 69:6634–6643.
- Kaebnick M, Neilan BA, Börner T, Dittmann E. 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol*. 66:3387–3392.
- Kardinaal W, Tonk L, Janse I, Hol S, Slot P, Huisman J, Visser P. 2007. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Appl Environ Microbiol*. 73:2939–2946.
- Kohl J, Nicklisch A. 1988. *Ökophysiologie der Algen. Wachstum und Ressourcennutzung*. Jena (Germany): Urban & Fischer.
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Börner T. 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol*. 6:831–841.
- Kurmayer R, Gumpenberger M. 2006. Diversity of microcystin genotypes among populations of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* and *Planktothrix agardhii*. *Mol Ecol*. 15:3849–3861.
- Kurmayer R, Kutzenberger T. 2003. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol*. 69:6723–6730.
- Meißner K, Dittmann E, Börner T. 1996. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol Lett*. 135:295–303.

- Mikkola R, Kurland CG. 1992. Selection of laboratory wild-type phenotype from natural isolates of *Escherichia coli* in chemostats. *Mol Biol Evol.* 9:394–402.
- Mira A, Ochman H, Moran NA. 2001. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet.* 17:589–596.
- Moffitt MC, Neilan BA. 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl Environ Microbiol.* 70:6353–6362.
- Mootz HD, Finking R, Marahiel MA. 2001. 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 276:37289–37298.
- Nakasugi K, Alexova R, Svenson CJ, Neilan BA. 2007. Functional analysis of *PiIT* from the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *J Bacteriol.* 189:1689–1697.
- Orr PT, Jones GJ. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol Oceanogr.* 43:1604–1614.
- Quadri LEN, Weinreb PH, Lei M, Nakano MM, Zuber P, Walsh CT. 1998. Characterization of *Sfp*, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry.* 37:1585–1595.
- Rantala A, Fewer DP, Hisbergues M, Rouhiainen L, Vaitoaa J, Börner T, Sivonen K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:568–573.
- Rezsöházy R, Hallet B, Delcour J, Mahillon J. 1993. The IS4 family of insertion sequences—evidence for a conserved transposase motif. *Mol Microbiol.* 9:1283–1295.
- Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Meth Enzymol.* 167:3–27.
- Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer BL, Buikema W, Haselkorn R, Sivonen K. 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl Environ Microbiol.* 70:686–692.
- Salmaso N, Padisak J. 2007. Morpho-functional groups and phytoplankton development in two deep lakes (Lake Garda, Italy and Lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia.* 578:97–112.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning—a laboratory manual, 2nd ed, Vol. 1–3. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schatz D, Keren Y, Hadas O, Carmeli S, Sukenik A, Kaplan A. 2005. Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains. *Environ Microbiol.* 7:798–805.
- Schober E, Kurmayer R. 2006. Evaluation of different DNA sampling techniques for the application of the real-time PCR method for the quantification of cyanobacteria in water. *Lett Appl Microbiol.* 42:412–417.
- Schwarzer D, Mootz HD, Linne U, Marahiel MA. 2002. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 22:14083–14088.
- Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA. 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23:1087–1088.
- Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34:D32–D36.
- Suda S, Watanabe MM, Otsuka NS, Mahakahant A, Yongmanitchai W, Nopartnaraporn, Liu Y Day JG. 2002. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52:1577–1595.
- Tanabe Y, Kasai F, Watanabe M. 2007. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbiology.* 153:3695–3703.
- Tanabe Y, Kaya K, Watanabe MM. 2004. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. *J Mol Evol.* 58:633–641.
- Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T, Neilan BA. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol.* 7:753–764.
- Touzet N, Franco JM, Raine R. 2007. Characterization of nontoxic and toxin-producing strains of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Appl Environ Microbiol.* 73:3333–3342.
- Van Liere L, Mur LR. 1980. Occurrence of *Oscillatoria agardhii* and some related species, a survey. *Dev Hydrobiol.* 2:67–77.
- Vezie C, Brient L, Sivonen K, Bertru G, Lefeuvre J-C, Salkinoja-Salonen M. 1998. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microb Ecol.* 35:126–135.
- Walsby A, Schanz F, Schmid M. 2005. The Burgundy-blood phenomenon: a model of buoyancy change explains autumnal waterblooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *New Phytol.* 169:109–122.
- World Health Organization. 2004. Guidelines for drinking-water quality, Vol. 1: recommendations, 3rd ed. Geneva (Switzerland): World Health Organization.
- Yang Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci.* 13:555–556.
- Yang Z. 1998. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Mol Biol Evol.* 15:568–573.
- Yang Z. 2005. The power of phylogenetic comparison in revealing protein function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:3179–3180.
- Yoshida M, Yoshida T, Kashima A, Takashima Y, Hosoda N, Nagasaki K, Hiroishi S. 2008. Ecological dynamics of the toxic bloom-forming *Microcystis aeruginosa* and its cyanophages in freshwater. *Appl Environ Microbiol.* 74:3269–3273.

Geoffrey McFadden, Associate Editor

Accepted May 15, 2008

'*Candidatus Aquirestis calciphila*' and '*Candidatus Haliscomenobacter calcifugiens*', filamentous, planktonic bacteria inhabiting natural lakes

Martin W. Hahn and Michael Schauer

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria

Correspondence

Martin W. Hahn
martin.hahn@oeaw.ac.at

Filamentous bacteria frequently occurring in the pelagic zone of natural freshwater lakes and ponds were previously identified as being related to *Haliscomenobacter hydrossis* based upon their 16S rRNA gene sequences. These bacteria exhibit a specific morphology characterized by the formation of straight, stick-like filaments of variable length (5 to > 100 µm) and quite stable, but narrow, width (0.25 to 0.35 µm). Bacteria with these morphological characteristics form a monophyletic but broad phylogenetic group with a maximal divergence of 16S rRNA gene sequences of 12.0%. This monophyletic group consists of at least three monophyletic subclusters. *H. hydrossis* is affiliated to one of these subclusters and represents the sole recognized species affiliated to the broad monophyletic group. '*Candidatus Haliscomenobacter calcifugiens*' and '*Candidatus Aquirestis calciphila*' are uncultured representatives of the other two subclusters and have 16S rRNA gene sequence dissimilarities of 5.4% and 8.2%, respectively, with the type strain of *H. hydrossis*. '*Candidatus H. calcifugiens*' and '*Candidatus A. calciphila*' have a 16S rRNA gene sequence dissimilarity of 8.5%. These large ribosomal divergences justify the classification of these environmentally important bacteria as a novel species and a new genus, respectively. Intensive attempts to cultivate these filamentous bacteria have resulted in the establishment of mixed cultures, however, attempts to establish pure cultures have failed.

The bacterioplankton of freshwater habitats is mainly comprised by bacterial groups that do not contain validly described species or cultivated representatives (Zwart *et al.*, 2002). One of these groups is the so-called LD2 group which was described in 2002 based on four environmental 16S rRNA gene sequences obtained from two Dutch lakes (Zwart *et al.*, 2002). Phylogenetic analysis of these environmental sequences indicated that the LD2 bacteria were related to *Saprospira grandis* and *Haliscomenobacter hydrossis* of the phylum *Bacteroidetes* (Zwart *et al.*, 2002). Pernthaler *et al.* (2004) demonstrated by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of samples obtained from a single lake that bacteria affiliated to the LD2 group share a characteristic filamentous morphology with *H. hydrossis*. We attempted to isolate bacteria possessing this *H. hydrossis*-like morphology by utilizing various cultivation

methods and media. This resulted in the enrichment of the targeted filamentous bacteria and the establishment of mixed cultures in which up to 42% of the total number of bacterial cells were of the targeted bacterial morphotype. However, the establishment of pure cultures of the targeted bacteria failed despite the achievement of enrichments of at least one order of magnitude (Schauer & Hahn, 2005).

In order to obtain insights into the phylogeny of the filamentous bacteria characterized by an *H. hydrossis*-like morphology, primers for the specific amplification of the 16S rRNA gene sequences of the targeted bacteria were developed by a step-wise approach (Schauer & Hahn, 2005). By using these primers, a large number of sequences potentially representing the targeted filamentous bacteria were obtained from enrichment cultures and from various samples from freshwater habitats. Based on these sequences, a suite of five nested FISH probes was developed (Table 1) and these probes were used for verification that the obtained sequences originated from the targeted bacteria with the *H. hydrossis*-like morphology. By this approach, it was demonstrated that a broad phylogenetic group, provisionally designated the SOL cluster, exclusively harbours bacteria possessing the typical *H. hydrossis*-like morphology (Schauer & Hahn, 2005).

Abbreviations: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; FISH, fluorescent *in situ* hybridization.

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the 16S rRNA gene sequences of '*Candidatus Aquirestis calciphila*' and '*Candidatus Haliscomenobacter calcifugiens*' are AJ786341 and AJ786327, respectively.

Table 1. FISH probes targeting the 16S rRNA gene for detection and discrimination of *H. hydrossis*, 'Candidatus *H. calcifugiens*' and 'Candidatus *A. calciphila*' GKS2-217, LD2 and HAL are subclusters of the SOL cluster (Schauer & Hahn, 2005). *H. hydrossis* is affiliated with the HAL subcluster. +, Positive; -, negative.

Probe	Sequence	Hybridization with			Reference
		<i>H. hydrossis</i> DSM 1100 ^T	'Candidatus <i>H. calcifugiens</i> '	'Candidatus <i>A. calciphila</i> '	
GKS-847	5'-TTCGCTTGG ACACAAATC-3'	-	+	-	Schauer & Hahn (2005)
LD2-1261	5'-GGCTCCGCTTCACAGCTT-3'	-	-	+	Schauer & Hahn (2005)
LD2-739	5'-GCGTCAATACAGATCCAG-3'	-	-	+	Pernthaler <i>et al.</i> (2004)
HAL-844	5'-CGCTTGGACACTCACTCC-3'	+	-	-	Schauer & Hahn (2005)
HHY-441	5'-CCAGATTTCTCCCAAGC-3'	+	-	-	Schauer & Hahn (2005)
HHY-655	5'-GCCTACCTCAACCTGATT-3'	+	-	-	Wagner <i>et al.</i> (1994)
SOL-852	5'-ACGCTTTCGCTTGGACAC-3'	+	+	+	Schauer & Hahn (2005)

*The probe matches with *H. hydrossis* and some other sequences within the HAL subcluster.

†The probe has unspecific matches with strains outside of the SOL cluster (Schauer & Hahn, 2005). The matching organisms outside the SOL cluster differ in morphology from the SOL bacteria.

Phylogeny of bacteria with *H. hydrossis*-like morphology

Sequences within the so-called SOL cluster are affiliated with the phylum *Bacteroidetes*. The SOL cluster is characterized by species with a minimum 16S rRNA gene sequence similarity of 88 % and consists of at least three monophyletic subclusters, provisionally designated the LD2, HAL and GKS2-217 subclusters (Schauer & Hahn, 2005). The HAL subcluster is the only subcluster that contains a recognized species, *H. hydrossis* (van Veen *et al.*, 1973). The HAL subcluster is characterized by a minimum 16S rRNA gene sequence similarity of 98.7 %, suggesting that all members of this subcluster belong to the species *H. hydrossis* (Rossello-Mora & Amann, 2001). Members of the other two subclusters are more distantly related to *H. hydrossis*. Sequences affiliated with the GKS2-217 subcluster share 16S rRNA gene sequence similarities of 93.8–95.5 % with members of the HAL subcluster. 16S rRNA gene sequences affiliated with the LD2 subcluster have sequence similarities of 90.1–92.7 % with those of the HAL subcluster. The minimal 16S rRNA gene sequence similarities within the GKS2-217 and LD2 subclusters are 97.6 % and 99.7 %, respectively. The low between-subcluster similarity values indicate that members of the different subclusters are not representatives of *H. hydrossis* and thus justify the proposal of two novel *Candidatus* species. Therefore, we propose to classify one member of the GKS2-217 subcluster (reference clone MS-oKlaff1-G) as a candidate for a novel *Haliscomenobacter* species and propose the designation 'Candidatus *Haliscomenobacter calcifugiens*'. Furthermore, we propose to classify one member of the LD2 subcluster (reference clone MS-Falk1-L) as a candidate for a novel species in a new genus and propose the designation 'Candidatus *Aquirestis calciphila*'. The novel taxa 'Candidatus *H. calcifugiens*' and 'Candidatus *A. calciphila*' share 91.5 % 16S rRNA gene sequence similarity with each other and 94.6 and 91.8 %, respectively, with the type strain of *H. hydrossis*. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences (Fig. 1) revealed that all three taxa cluster together within the family 'Saprospiraceae' (Garrity *et al.*, 2004).

Morphological traits

The application of FISH probes specific for the entire SOL cluster and its three subclusters, respectively, to samples from the pelagic zones of 115 freshwater habitats located on four continents and in three climatic zones revealed that all detected members of the SOL cluster share the same distinct morphology (Fig. 2). All these bacteria appeared as straight, stick-like filaments of variable length ranging from 5 to > 100 µm and of quite stable, but narrow, width of 0.25–0.35 µm. A sheath enclosing the filaments was sometimes visible in 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained preparations (epifluorescence microscopy). Branching filaments were never detected with the probes specific for the SOL cluster or its subclusters.

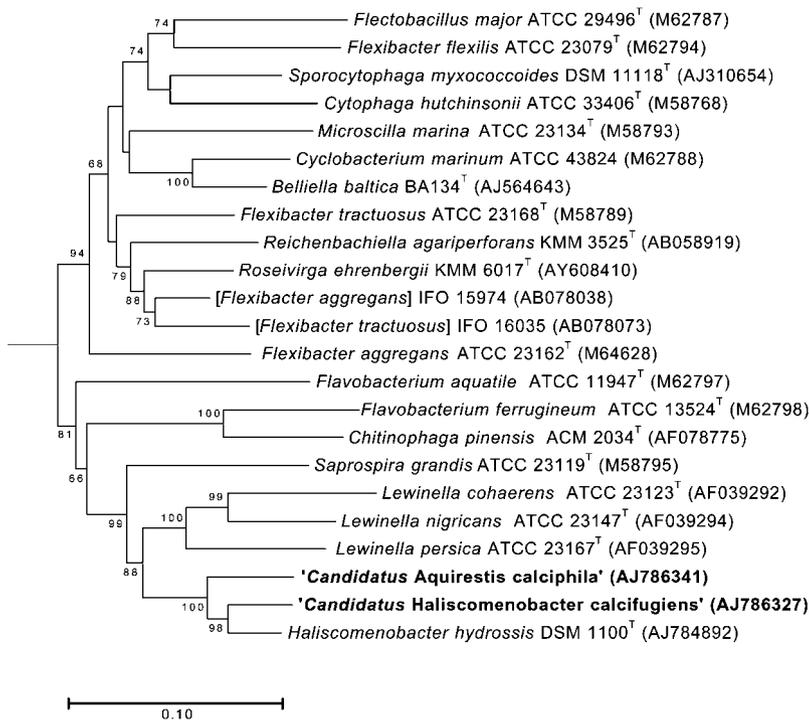


Fig. 1. Neighbour-joining tree based on almost full-length 16S rRNA gene sequences of species affiliated with the phylum Bacteroidetes. Bootstrap values represent percentage support of the nodes based on 1000 resamplings (only values > 60 are shown). Three sequences of Actinobacteria (GenBank accession numbers X77435, U09761 and U09763) served as an outgroup (not shown). Note that *Haliscomenobacter hydrossis*, 'Candidatus H. calcifugiens' and 'Candidatus A. calciphila' are representatives of the so-called HAL, GKS2-217 and LD2 subclusters, respectively, which together constitute the so-called SOL cluster (Schauer & Hahn, 2005). Bar, 10% estimated sequence divergence.

We purchased the type strain of *H. hydrossis* (DSM 1100^T) for comparison of morphological traits but found that this strain had lost its ability to form a sheath (van Veen *et al.*, 1973). It seemed that the loss of this trait resulted in the formation of erratically curved filaments which lacked the morphological characteristics originally described for this strain (van Veen *et al.*, 1973). The filamentous bacteria detected by the specific FISH probes in the investigated

freshwater lakes shared several of the morphological characteristics originally described for the *H. hydrossis* type strain (van Veen *et al.*, 1973; Eikelboom, 1975), but showed smaller filament width than that described for the type strain (van Veen *et al.*, 1973). These differences in the results of filament width measurements could result from the application of different sizing methods. Furthermore, we searched for *H. hydrossis* filaments in several samples from natural freshwater habitats with a species-specific probe (Schauer & Hahn, 2005) but never detected any probe-positive cells.

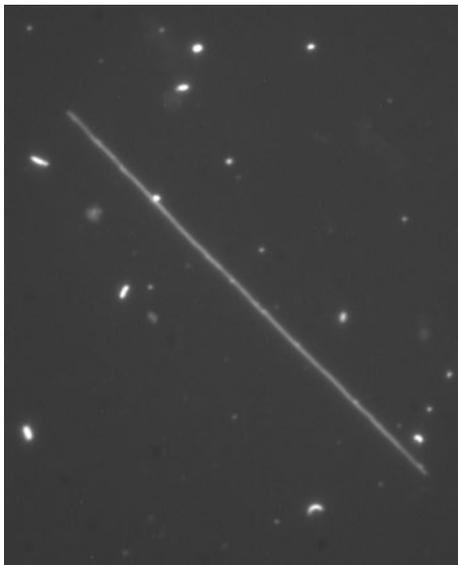


Fig. 2. Photomicrograph of a DAPI-stained water sample from the oligotrophic Lake Attersee (Austria). The image shows a 46 μm long filament of 'Candidatus A. calciphila' surrounded by several much smaller cells of planktonic bacteria.

A morphological comparison of filaments detected by the different subcluster-specific probes did not reveal any discriminatory features. Thus, bacteria affiliated with the SOL cluster (including the originally described *H. hydrossis* phenotype) can be discriminated from other bacteria by their unique morphology, but members of the three different subclusters cannot be discriminated from each other on the basis of morphological traits.

Physiology

Little is known about the physiology of these bacteria due to the lack of pure cultures. In order to estimate the growth rate of 'Candidatus A. calciphila' under natural conditions, 0.2 μm -filtered lake water was inoculated with predator-free (without water fleas and other metazooplankton species) water from Lake Mondsee, Austria, and incubated at 20 °C. The growth of the targeted bacteria was monitored by microscopic observations. 'Candidatus A. calciphila' bacteria grew in the filtered lake water with doubling times of 3.0 days (growth rate 0.23 day⁻¹) which indicates that the *in situ* growth rates of these bacteria are low. Growth under anoxic conditions was not observed, while control treatments

incubated under oxic conditions showed a clear increase in cell numbers. These observations may indicate an obligately aerobic physiology for 'Candidatus A. calciphila'.

Ecology

A large number of freshwater habitats have been investigated for the presence of the three SOL subclusters by specific FISH probes (Schauer *et al.*, 2005). Bacteria affiliated to the SOL subcluster were detected in 73 % of the 115 investigated habitats. The LD2 subcluster, which is represented by 'Candidatus A. calciphila', was detected in 62 % of all investigated samples, while the GKS2-217 subcluster, represented by 'Candidatus H. calcifugiens', was detected in 12 % of the investigated samples. The HAL subcluster, represented by *H. hydrossis*, was detected in 22 % of the hybridized samples. Members of the subclusters represented by 'Candidatus A. calciphila' and 'Candidatus H. calcifugiens' were never observed to co-occur in the same habitat, while members of the HAL subcluster, represented by *H. hydrossis*, usually co-occurred with members of one of the other two subclusters. Multivariate statistical analyses revealed that water chemistry parameters mainly control the occurrence of 'Candidatus A. calciphila' and 'Candidatus H. calcifugiens' in stagnant freshwater habitats. 'Candidatus A. calciphila' (i.e., subcluster LD2) is restricted to hard-water habitats characterized by medium to high concentrations of calcium and magnesium carbonate, with conductivity values $>60 \mu\text{S cm}^{-1}$ and pH values ≥ 7.7 . 'Candidatus A. calciphila' was also observed in the polysaline Lake Qinghai, China (salinity 20 g l^{-1} ; Wu *et al.*, 2006), which is the seventh largest saline lake in the world. Thus, this taxon is not restricted to freshwater habitats (salinity $<1 \text{ g l}^{-1}$). In contrast, 'Candidatus H. calcifugiens' is restricted to soft-water (low concentrations of calcium and magnesium carbonate) habitats and was never detected in saline lakes. The stagnant systems inhabited by 'Candidatus H. calcifugiens' are characterized by low concentrations of calcium and magnesium carbonate with conductivity values $\leq 60 \mu\text{S cm}^{-1}$ and pH values in the range 6.4–7.3. Members of both groups (as well as members of the HAL subcluster represented by *H. hydrossis*) were never observed in acidic freshwater habitats with pH values <6 .

'Candidatus H. calcifugiens' is characterized by a narrow ecological amplitude. The soft-water habitats preferred by this taxon have been found in the Austrian Alps and in northern Sweden (Schauer *et al.*, 2005). In contrast, 'Candidatus A. calciphila' was found over a broad range of habitat types which indicates a wide ecological amplitude. For instance, this taxon was detected in a hypertrophic part of Lake Taihu located in the subtropical part of China, in Lake Victoria and Lake Tanganjika located in tropical Africa and in the oligotrophic Lake Attersee in Austria (Fig. 2).

Both *Candidatus* organisms seem to be restricted to the pelagic zone of stagnant inland waters and were never reported from soil or marine habitats. Both organisms were detected over the entire water column of Lake Mondsee,

which has a maximum depth of 68 m. Furthermore, 'Candidatus A. calciphila' was detected year-round in the same lake, but showed pronounced seasonal differences in abundance. In two consecutive years differing strongly in climatic conditions, a very similar seasonal pattern of population dynamics was observed. Each year, the 'Candidatus A. calciphila' population formed a strong spring peak and showed minor population peaks in summer and early autumn. By contrast, the HAL group (to which *H. hydrossis* is affiliated) was detected in the same lake only during a short period of a few weeks in early autumn.

'Candidatus A. calciphila' was also detected in low numbers in running water systems fed with water from lakes inhabited by populations of these bacteria. On the other hand, these bacteria were not detected in running waters that lacked lakes or ponds located upstream. This observation seems to indicate that the primary habitat of these bacteria is the pelagic zone of stagnant inland waters.

Both 'Candidatus A. calciphila' and 'Candidatus H. calcifugiens' represent an important part of the freshwater bacterioplankton and appear in the water column of freshwater habitats with relative abundances of $<1\%$ to at least 11% of total bacterial numbers (Schauer & Hahn, 2005). The observed total cell numbers for these taxa ranged from several hundreds to $2 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$. Due to their filamentous morphologies and typical mean filament lengths of 20–50 μm , these bacteria contribute over proportionally to the total bacterial biomass in freshwater habitats. These bacteria comprise about 40% of the total bacterial biovolume in some habitats (Schauer & Hahn, 2005).

Recently, water flea (*Daphnia* spp.) and other metazooplankton species were identified as important predators of a 'Candidatus A. calciphila' population in the oligo-mesotrophic Lake Mondsee (Schauer *et al.*, 2006). On the other hand, these bacteria were found to be resistant to predation by bacterivorous protists (flagellates and ciliates) which are usually the major predators of planktonic bacteria in freshwater systems (Hahn & Höfle, 2001).

Biogeography

'Candidatus A. calciphila' is a cosmopolitan inhabitant of hard-water lakes. This taxon was detected in habitats located in Oceania (Australia, New Zealand), Central America (Mexico), Africa (Lake Victoria, Lake Tanganjika), Eurasia (Austria, China), as well as in habitats located in the temperate, subtropical and tropical zones. Furthermore, this taxon was also detected in a high mountain lake located at an altitude of 4987 m on the Tibetan Plateau (Schauer *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). Altogether, these observations indicate that 'Candidatus A. calciphila' may inhabit all appropriate hard-water lakes located on all continents and in all climatic zones.

'Candidatus H. calcifugiens' has so far been exclusively detected in soft-water lakes located in Austria and Sweden.

However, soft-water lakes suitable for this taxon located outside of these two regions have not so far been investigated for the presence of '*Candidatus* H. calcifugiens'. Thus, a wider biogeographic distribution for this taxon cannot be ruled out.

Cultivation

Despite extensive efforts to grow representatives of subclusters LD2 and GKS2-217 in pure culture by using various media and isolation methods (Schauer & Hahn, 2005), pure cultures have not yet been successfully established. However, until cultivation of these important representatives of freshwater bacterioplankton is achieved or additional phenotypic data become available, we assign members of the two species-like subgroups of the SOL cluster to the provisional *Candidatus* status as proposed by Murray & Stackebrandt (1995).

Description of '*Candidatus* Aquirestis calciphila'

'*Candidatus* Aquirestis calciphila' [A.qui.res'tis. L. n. *aqua* water; L. fem. n. *restis* thread, rope; N.L. fem. n. *Aquirestis* water thread; cal.ci'phi.la. L. fem. n. *calx* limestone (calcium carbonate); Gr. adj. *philos* loving, friendly to; N.L. fem. adj. *calciphila* loving limestone].

[(*Bacteroidetes*) NC; F; NAS (GenBank number AJ786341), oligonucleotide sequence complementary to unique region of 16S rRNA 5'-AAGCTGTGAAGCGGAGCC-3'; FL (freshwater and saline lakes, planktonic); Aer, long straight filaments with width ≤ 0.35 μm ; M]. Schauer & Hahn, *Appl Environ Microbiol* **71**:1931–1940, 2005.

Description of '*Candidatus* Haliscomenobacter calcifugiens'

'*Candidatus* Haliscomenobacter calcifugiens' [cal.ci.fu'-gi.ens. L. fem. n. *calx* limestone (calcium carbonate); L. part. pres. *fugiens* fleeing, shy; N.L. part. pres. *calcifugiens* fleeing from limestone].

[(*Bacteroidetes*, genus *Haliscomenobacter*); NC; F; NAS (GenBank AJ786327), oligonucleotide sequence complementary to unique region of 16S rRNA 5'-CGGATTGTGTGTCCAAGCGAA-3'; FL (freshwater lakes with soft-water, planktonic); Aer, long straight filaments with width ≤ 0.35 μm ; M]. Schauer & Hahn, *Appl Environ Microbiol* **71**:1931–1940, 2005.

Acknowledgements

We are very grateful to Hans G. Trüper for etymological advice. This study was supported by the Austrian Science Fund (project P15655).

References

- Eikelboom, D. H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Res* **9**, 365–388.
- Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the Prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, release 5.0. New York: Springer. DOI: 10.1007/bergeysoutline200405
- Hahn, M. W. & Höfle, M. G. (2001). Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 113–121.
- Murray, R. G. E. & Stackebrandt, E. (1995). Taxonomic note: Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described prokaryotes. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 186–187.
- Pernthaler, J., Zöllner, E., Warnecke, F. & Jürgens, K. (2004). Bloom of filamentous bacteria in a mesotrophic lake: identity and potential controlling mechanism. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6272–6281.
- Rossello-Mora, R. & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 39–67.
- Schauer, M. & Hahn, M. W. (2005). Diversity and phylogenetic affiliations of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1931–1940.
- Schauer, M., Kamenik, C. & Hahn, M. W. (2005). Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, *Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*). *Appl Environ Microbiol* **71**, 5900–5907.
- Schauer, M., Jiang, J. & Hahn, M. W. (2006). Recurrent seasonal variations in abundance and composition of filamentous SOL cluster bacteria (*Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*) in oligomesotrophic Lake Mondsee (Austria). *Appl Environ Microbiol* **72**, 4704–4712.
- van Veen, W. L., van der Kooij, D., Geuze, E. C. W. A. & van der Vlies, A. W. (1973). Investigations on the sheathed bacterium *Haliscomenobacter hydrossis* gen.n., sp.n., isolated from activated sludge. *Antonie van Leeuwenhoek* **39**, 207–216.
- Wagner, M., Amann, R., Kämpfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N. & Schleifer, K.-H. (1994). Identification and in situ detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst Appl Microbiol* **17**, 405–417.
- Wu, Q. L., Zwart, G., Schauer, M., Kamst-van Agterveld, M. P. & Hahn, M. W. (2006). Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5478–5485.
- Zwart, G., Crump, B. C., Kamst-van Agterveld, M. P., Hagen, F. & Han, S.-K. (2002). Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* **28**, 141–155.

Low Intraspecific Diversity in a *Polynucleobacter* Subcluster Population Numerically Dominating Bacterioplankton of a Freshwater Pond

Martin W. Hahn,^{1*} Matthias Pöckl,¹ and Qinglong L. Wu^{1,2}

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria,¹ and Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, 73 East Beijing Road, Nanjing 210008, People's Republic of China²

Received 20 December 2004/Accepted 15 February 2005

Cultivation-dependent and -independent methods were combined to investigate the microdiversity of a *Polynucleobacter* subcluster population (Betaproteobacteria) numerically dominating the bacterioplankton of a small, humic freshwater pond. Complete coverage of the population by cultivation allowed the analysis of microdiversity beyond the phylogenetic resolution of ribosomal markers. Fluorescent in situ hybridization with two probes specific for the narrow subcluster C (PnecC bacteria) of the *Polynucleobacter* cluster revealed that this population contributed up to 60% to the total number of bacterioplankton cells. Microdiversity was investigated for a date at which the highest relative numbers of PnecC were observed. A clone library of fragments of the ribosomal operon (16S rRNA genes, complete 16S-23S internal transcribed spacer 1 [ITS1], partial 23S rRNA genes) amplified with universal bacterial primers was constructed. The library was stepwise screened for fragments from PnecC bacteria and for different ITS genotypes of PnecC bacteria. The isolated PnecC strains were characterized by sequencing of the 16S rRNA genes and the ITS1. Both the clone library and the established culture collection contained only the same three ITS genotypes, and one of them contributed 46% to the entire number of clones. Genomic fingerprinting of the isolates with several methods always resulted in the detection of only one fingerprint per ITS genotype. We conclude that a *Polynucleobacter* population with an extremely low intraspecific diversity and an uneven structure numerically dominated the bacterioplankton community in the investigated habitat. This low intraspecific diversity is in strong contrast to the high intraspecific diversities found in marine bacterial populations.

Microdiversity of prokaryotes, i.e., the genetic diversity within species-like (>97% similarity of 16S rRNA genes) phylogenetic groups, receives increasing attention in microbial ecology (1, 5, 18, 19, 24, 28); however, the ecological significance of this diversity is still unknown. The coexistence of different bacterial genotypes belonging to the same species-like phylogenetic group is well documented for marine (1, 18, 19, 35, 45) and freshwater habitats (8, 9, 10, 11, 27, 30, 43). Recently, Acinas et al. (1) demonstrated by the construction and analysis of 16S rRNA clone libraries that a coastal bacterioplankton community contained a very high diversity of ribotypes, the vast majority of which fell into phylogenetically microdiverse sequence clusters (<1% divergent 16S rRNA sequences). Similarly, extensive microdiversities were also observed in populations of sulfate-reducing bacteria inhabiting a salt marsh (29) and in a *Vibrio splendidus* population from coastal bacterioplankton (42). The *V. splendidus* population consisted of at least a thousand distinct genotypes, which demonstrated a high variability in genome size and allelic composition (42).

The major aim of the study presented here was the investigation of the intraspecific structure (microdiversity) of a bacterial population occurring in freshwater bacterioplankton with high numbers. Specifically, we wanted to reveal (i) if populations of freshwater bacteria share with marine popula-

tions the characteristic of a high intraspecific diversity and (ii) if a population contributing >50% of the total numbers of bacterioplankton cells possesses a high genotypic diversity, which could potentially indicate a high intraspecific ecological diversity within the population.

A *Polynucleobacter* subcluster C (PnecC) (23) population (operationally defined as a narrow ribotype cluster), which temporarily dominated the bacterioplankton of a small dystrophic freshwater habitat, was selected for the study. The monophyletic PnecC cluster is characterized by a high minimum sequence similarity of 98.5% (23) and resembles in this feature the microdiverse clusters of marine bacteria (1, 42). Sequences affiliated with PnecC were previously obtained from endosymbionts of aquatic ciliates (40, 44), from many freshwater habitats investigated with culture-independent methods (11, 21, 27, 50), and from strains isolated from several freshwater habitats (23). Reports on the detection of PnecC bacteria in soil or marine systems are lacking. Due to the differences in origin of the sequences, it was previously speculated that the species-like PnecC cluster contains ecologically diverse strains, i.e., obligately endosymbiotic, as well as free-living, strains (23); however, evidence for the fundamental differences in lifestyle between PnecC strains observed in the cytoplasm of benthic ciliates (19, 44) and strains isolated from the pelagic zones of several freshwater habitats (23) is still lacking. Furthermore, it is not known if the many PnecC sequences retrieved by culture-independent methods from freshwater habitats, as well as the isolated strains, originate from cells contained in ciliate cells or from free-living cells. This knowledge is important for the interpretation of the ecological role of PnecC bacteria, because

* Corresponding author. Mailing address: Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria. Phone: 43 6232 3125-29. Fax: 43 6232 3578. E-mail: martin.hahn@oeaw.ac.at.

TABLE 1. Newly designed FISH probes specific for *Polynucleobacter* bacteria^a

Probe	Sequence	Length (nt)	Target	Position ^b	Formamide concn ^c (%)	Specificity	No. of unspecific matches ^d
PnecABD-445	5'-GAG CTG CTG TTT CTT CCC-3'	18	16S rRNA	445-463	35	Subclusters A, B, and D	0
PnecC-16S-445	5'-GAG CCG GTG TTT CTT CCC-3'	18	16S rRNA	445-463	35	Subcluster C (PnecC)	1 ^f
PnecC-23S-166	5'-GTT CGC TTC TCA TAC CCT-3'	18	23S rRNA	166-182	35	Subcluster C (PnecC)	0
PnecD1-181	5'-TTT CCC CCT AAG GGA TT-3'	17	16S rRNA	181-197	15	Part of subcluster D ^e	1 ^g
PnecD2-181	5'-TTT CCC CCT TAG GGA TT-3'	17	16S rRNA	181-197	15	Other part of subcluster D ^e	3 ^h

^a Information on the division of the *Polynucleobacter* cluster in four subclusters (A to D) can be found elsewhere (23).

^b *E. coli* numbering.

^c Concentration in hybridization buffer.

^d Number of known sequences which match the probes but do not belong to the target group.

^e Sequences of isolate MWH-CaK1 (AJ550667) and clone 27 (AF361194) are not targeted by these probes (both belong to subcluster D).

^f Uncultured *Cytophagales* bacterium clone LiUU-1-2B (AF550604). Sequence was published by Eilers et al. (13).

^g Environmental sequence (AY592152) was obtained by Heijs et al. (unpublished data) from an anaerobic marine site.

^h Two *Beggiatoa* sequences (AF110273, AF110274) and one alphaproteobacterial sequence from a hot spring (AF445716).

free-living and endosymbiotic stages have different ecological functions and participate differently in carbon and nutrient fluxes of ecosystems.

The microdiversity of the selected PnecC population was investigated by construction and analysis of a clone library containing fragments of the bacterial ribosomal operons. In order to characterize the microdiversity of the population beyond the phylogenetic resolution of ribosomal markers, a culture collection of PnecC strains was established and analyzed by way of the sequencing of ribosomal markers and genomic fingerprinting by five different methods. The combination of culture-independent and cultivation methods provided deep insights into the genotypic structure of a bacterial population numerically dominating a freshwater community.

MATERIALS AND METHODS

Study site. The *Polynucleobacter* subcluster C (PnecC) population in a permanent, small (surface area, ~150 m²), shallow (maximum depth, 1.3 m), humic pond called Kleine Lacke was investigated. This fishless pond is located in the Austrian Alps (13°18'N, 47°44'E) near Salzburg at an altitude of 1,300 m above sea level. The pond contains acidic water with a brown water color. The entire shore of the pond is formed by "schwimmmoor" (i.e., floating peat moss [*Sphagnum*]-dominated vegetation). The pond is lacking a permanent surface inflow and possesses an almost permanent outflow with low water charge. The surrounding terrestrial area is approximately equally covered by grass, blueberries, ferns, and coniferous trees. The area is usually used as a pasture, stocked with a small number of cattle and horses, in the period from June to mid-September. In the investigation period, the pond was permanently ice and snow covered from December 2003 to early May 2004. In February, the ice cover was ca. 0.5 m thick and consisted of several layers of different consistencies.

Sampling. The pond was repeatedly sampled over a period of 13 months (September 2003 to October 2004). Oxygen concentration, pH, conductivity, and water temperature were measured on location. For the determination of microbiological data, water samples were transported to the lab and immediately processed upon arrival. Transportation times were usually less than 1 h.

Determination of total bacterial cell numbers. Water samples were fixed with formaldehyde (2% final concentration), stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma), and filtered onto black 0.2- μ m-pore-size Nuclepore filters (Millipore). Total bacterial cell numbers were determined with an epifluorescence microscope (Zeiss Axioplan) under UV excitation at a magnification of $\times 1,250$. Calculated cell numbers are based on at least 10 counted microscopic fields.

Development of probes for FISH. A set of five probes specific for subclusters or for groups of subclusters of the *Polynucleobacter* cluster (23) was designed by using the ARB software package (32). Additional theoretical evaluation of the specificity of probes by the submission of probe sequences to BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) resulted in a few unspecific matches (Table 1); however, the prokaryotes potentially matching the probes are with one exception not known from the pelagic zone of freshwater habitats. The results obtained with

the only probe (PnecC 16S-445) unspecifically matching a planktonic freshwater bacterium were checked by a second probe specific for the same phylogenetic group. The determination of stringent conditions for fluorescent in situ hybridization (FISH) was performed by using paraformaldehyde-fixed cells of target and nontarget strains. These experiments were performed with cultures of *Polynucleobacter* strains, as well as with strains not affiliated with this cluster. Fluorescence intensities of hybridized nontarget and target cells were analyzed in experiments with a series of increasing concentrations of formamide in the hybridization buffer. Under stringent hybridization conditions, the subcluster-specific probes did not hybridize with members of the other subclusters. The sequences of the five developed probes and their stringent hybridization conditions are provided in Table 1.

Analysis of samples by FISH. Samples (20 ml) were fixed with paraformaldehyde solution (2% [wt/vol] final concentration) at room temperature for 2 h. After fixation, samples were filtered onto 0.2- μ m-pore-size Isopore membrane filters (47 mm; Millipore), rinsed with phosphate-buffered saline buffer and sterile Milli-Q water, dried at room temperature, and stored at -20°C. Whole-cell in situ hybridizations of sections from the polycarbonate filters were performed with the five newly designed oligonucleotide probes, as well as with probes BET2-870 (*Polynucleobacter* cluster and a few related sequences outside the cluster, 16S rRNA targeted) (7), BET42a (*Betaproteobacteria*, 23S rRNA targeted) (34), GAM42a (*Gammaproteobacteria*, 23S rRNA targeted) (34), ALF968 (*Alphaproteobacteria*, 16S rRNA targeted) (37), CF319a (many *Bacteroidetes*, 16S rRNA targeted) (33), and EUB338 (most bacteria, 16S rRNA targeted) (3). All probes were obtained as Cy3-monolabeled probes (Thermo-Hybaid, Ulm, Germany). Hybridization and analysis were performed according to the protocol by Alfreider et al. (2).

Isolation and cultivation of PnecC strains. For the isolation of PnecC strains from a water sample taken on 15 October 2003, the acclimatization method (25) was used in two variations. The first variant, the filtration-acclimatization method, uses filtration through 0.2- μ m-pore-size filters for the enrichment of *Polynucleobacter* bacteria, as well as for the exclusion of many bacteria that are able to overgrow the target bacteria. The second variant, the novel dilution-acclimatization method (DAM), uses dilution steps for separation of the most abundant bacteria from the less abundant ones. In general, the cultivation experiments were performed as described previously (25). The only differences were the dilution steps in DAM, as well as the use of additional media. Three different dilutions (10^{-4} , 10^{-5} , and 10^{-6}) were incubated in the different DAM experiments. Three different media were used for the initial cultivation steps of filtration-acclimatization method and DAM experiments. These media were the artificial inorganic IBM medium (25) enriched with 0.1% NSY medium (25) and the 0.2- μ m-filtered water from the investigated habitat, sterilized either by autoclaving or by microwave treatment (39). Cultures were screened by FISH for the identification of PnecC-positive cultures. Only PnecC strains were further processed and analyzed.

Phylogenetic analysis of the isolated PnecC strains. Partial (all strains) and almost complete (12 strains) sequencing of the 16S rRNA gene was performed as described previously (23). Furthermore, sequencing of the complete 16S-23S internal-transcribed spacer (ITS) was performed for 10 strains by using the primers 1406F (31) and 23Sr (16). A set of reference ITS sequences from 20 other PnecC strains and 19 other non-PnecC *Polynucleobacter* strains was established for the proper alignment and analysis of the obtained sequences. Align-

TABLE 2. Primers developed for the screening of the clone library

Primer	Type	Sequence (5'-3')	Length (nt)	Melting temp (°C)	Target	Specificity
19F ^a	Forward	MTG GCT CAG ATT GAA CGC T	19	55.6	16S rRNA gene	Many bacteria
PnecCr-4 ^b	Reverse	AAC GAG CAC CAT TGC TAG T	19	54.5	16S-23S ITS	PnecC
PnecCr-5 ^b	Reverse	AAC GAG CAC CAT TGC TAG Y	19	55.6	16S-23S ITS	PnecC
PnecCG1F	Forward	TAA ATG TCA AAA CTA AGC GAT CTA A	25	54.8	16S-23S ITS	ITS genotype 1 (PnecC)
PnecCG1+2strF	Forward	TAG AGA AAA GAT GCT GAA TCC TA	23	55.3	16S-23S ITS	ITS genotypes 1 and 2 and a few other genotypes (PnecC)
PnecCG2F	Forward	AGA CCC ACC AAT CAG CGT	18	56.0	16S-23S ITS	ITS genotype 2 (PnecC)
PnecCG3F	Forward	ACC CAC CAT CAG CAG CA	17	55.2	16S-23S ITS	ITS genotype 3 (PnecC)

^a Primer targets a conserved sequence close to the 5' end of the 16S rRNA gene. Melting temperature was optimized for combination with primers PnecCr-4 and PnecCr-5.

^b Primers PnecCr-4 and PnecCr-5 differ in only 1 nucleotide and target the same position of the ITS. Primer PnecCr-4 may not work in the case of one PnecC genotype.

ment of the ribosomal sequences was performed by using the ARB software package (32). Phylogenetic trees were constructed as described previously (23).

Preliminary taxonomic classification of the isolated strains. The isolated strains are closely related to the endosymbiotic type strain of *Polynucleobacter necessarius* (16S rRNA similarity, 99.2 to 99.4%). This species was described as an obligate endosymbiont of a ciliate (26). Despite the close phylogenetic relationship, the isolates were preliminarily not classified as *Polynucleobacter necessarius* strains due to the potential differences in lifestyle (obligate endosymbionts versus potentially completely free-living planktonic). Instead, the isolates are considered members of the subcluster C of the *Polynucleobacter* cluster (PnecC) (23). For the sister group of PnecC, the subcluster D of the *Polynucleobacter* cluster, the term PnecD is used.

Construction and analysis of a clone library. For construction of a clone library of fragments of the ribosomal operons of bacteria, water samples (200 ml) were taken on 15 October 2003, filtered on a membrane filter (pore size, 0.2 µm; diameter, 47 mm; Millipore), and stored at -70°C until processing. For the extraction of DNA, the FastDNA kit and the FastPrep instrument (Q-Biogene) were used. Fragments of the ribosomal operons were amplified with primers 27F (31) and 23Sr (16). Both primers are universal bacterial primers, which bind to positions 8 to 27 (*Escherichia coli* numbering) of the 16S rRNA gene and positions 130 to 114 (*E. coli* numbering) of the 23S rRNA gene, respectively. Amplification was performed in a Primus 96^{plus} thermocycler (MWB-Biotech) in 50-µl reaction mixtures containing PCR buffer, approximately 100 ng of DNA, 200 µM concentrations of deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 2 mM MgCl₂, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (QIAGEN), and 0.2 µM concentrations of (each) primer. The cycling conditions were initially denatured at 94°C for 3 min, which was followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 53.0°C for 1 min, and 72°C for 2 min. Cycling was finished with an extension step of 10 min at 72°C. The PCR products were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN), ligated in pDrive cloning vector (PCR Cloning plus kit; QIAGEN, Hilden, Germany), and cloned into competent *E. coli* cells according to the instructions by the manufacturer. The harvested clones were screened for the length of the inserts, and only clones with inserts of >1,500 bp were considered for further analysis. For the detection of PnecC clones, the library was screened by using primer pair 19F/PnecCr-4 (annealing temperature, 63.0°C) (Table 2). The reverse primer PnecCr-4 is specific for ITS sequences of PnecC bacteria. For identifying different ITS genotypes, the PnecC clones were further screened by using the restriction enzyme EcoNI. Only 3 out of the 21 ITS genotypes (strains with different ITS sequences) known from PnecC bacteria possess one restriction site (instead of two) in the cloned 27F/23Sr fragment. Two out of these three ITS genotypes are exclusively known from the investigated pond (isolated strains). Further differentiation of PnecC ITS genotypes was performed by using ITS genotype-specific primer pairs (Table 2). The two primer pairs PnecCG1F/23Sr (annealing temperature, 62.5°C) and PnecCG1+2strF/PnecCr-5 (annealing temperature, 66.0°C) were used for the detection of clones belonging to ITS genotypes 1. The first primer pair is specific for the ITS genotype 1, while the second primer pair targets ITS genotype 1 and two more genotypes (out of 21) affiliated with PnecC. The two forward primers target sequences located at different positions of the ITS sequences. Primers PnecCG2F and PnecCr-5 (annealing temperature, 67.0°C) were used for the detection of ITS genotype 2 clones, and primers PnecCG3F and PnecCr-5 (annealing temperature, 65.0°C) were used for the identification of ITS genotype 3 clones. Theoretical evaluation of the specificity of the newly designed primers (by BLAST) revealed for all primers no 100% match to any known sequence. PCR conditions for the newly designed

primers were optimized by using a gradient temperature cycler (Eppendorf) and template DNA from target and nontarget organisms. Besides the annealing temperatures, PCR conditions were as described above.

Twenty-five clones, including representatives of all the PnecC genotypes detected in the clone library, were sequenced. The sequences were aligned and analyzed as described for the sequences of the isolates.

Whole genome fingerprinting of cultured strains. The three different techniques enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR, repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR), and random amplification of polymorphic DNA (RAPD) were used for fingerprinting of the isolates obtained from the investigated pond. (i) For ERIC, the primers ERIC1R and ERIC2 (12) were used. The 20-µl PCR mixture contained 0.5 U *Taq*, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM concentrations of dNTPs, 2 µl 10× PCR buffer, 0.2 µM concentrations of (each) primer, and 1 µl template DNA. The cycling conditions were 3 min at 94°C; 41 cycles with 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, and 2 min at 72°C; and a final cycle at 72°C for 10 min. (ii) For REP-PCR, the primers REP1R and REP2-I (12) were used. The 20-µl PCR mixture contained 2 U *Taq*, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM concentrations of dNTPs, 2 µl 10× PCR buffer, 0.25 µM concentrations of (each) primer, and 1 µl template DNA. Cycling conditions were 6 min at 94°C; 41 cycles with 1 min at 94°C, 1 min at 45°C, and 2 min at 72°C; and a final cycle at 72°C for 10 min. (iii) Three different RAPD fingerprintings were performed by using the primers A, B, and C (49). The PCR conditions were according to the protocol by Ziemke et al. (49).

Nucleotide sequence accession numbers. Twenty-five 16S rRNA gene and ITS1 sequences of clones and isolates obtained from the investigated pond were deposited under accession numbers AJ879778 to AJ879802. The submission of 10 ITS1 sequences, as well as several partial 16S rRNA sequences identical with one or more other sequences, was omitted.

RESULTS

Basic chemophysical characteristics of the investigated pond. The water of the pond was characterized during the investigation period by a low conductivity (7 to 52 µS cm⁻¹) and an acidic pH (4.3 to 6.0). Measured water temperatures ranged from 0.1 to 17.3°C, and the oxygen saturation was usually around 100% but dropped during the ice-covered period (Fig. 1) to <1% saturation (February 2004).

Determination of PnecC numbers by FISH. Water samples taken in the period from September 2003 to October 2004 were investigated by FISH. Probe PnecC-16S-445, which is specific for the narrow, species-like *Polynucleobacter* subcluster C (PnecC, 98.5% minimum 16S rRNA gene sequence similarities), detected cell numbers in the range of 0.02 × 10⁶ to 1.12 × 10⁶ cells ml⁻¹ (Fig. 1). These numbers equal the relative abundances of 4 to 59% of the total numbers of bacterioplankton cells. All of the detected cells were freely suspended planktonic bacteria, and no probe-positive cells were found to be located inside ciliate cells. Probe PnecC-23S-166, which is also

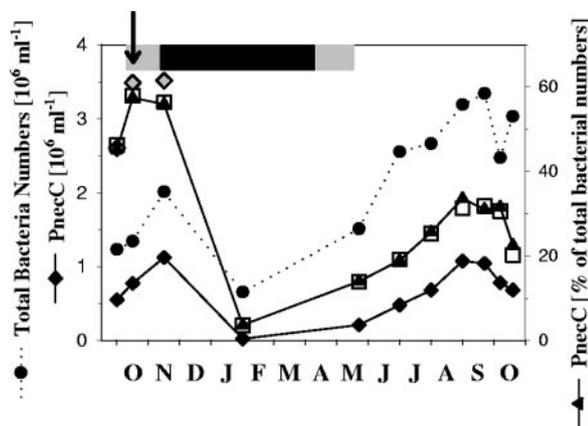


FIG. 1. Annual cycle of PnecC population dynamics in the water column of the investigated dystrophic pond in the period from September 2003 to October 2004. Relative abundances of the PnecC population were obtained by using probes PnecC-16S-445 (16S rRNA targeted [black triangles]) and PnecC-23S-166 (23S rRNA targeted [gray diamond], only data for 2003). The entire *Polynucleobacter* cluster plus a few related sequences outside the cluster were targeted with probe BET2-870 (open squares). The absolute numbers of the PnecC population are based on the data obtained with probe PnecC-16S-445. The period of ice cover on the pond is depicted by the gray (temporary, e.g., overnight) and black (presumably permanent-cover) parts of the horizontal bar. The arrow indicates the date of sampling for construction of the clone library and the establishment of the culture collection.

PnecC specific but targeting the 23S rRNA, was applied to samples from 2003 and detected very similar percentages of total bacterial numbers. Probe PnecABD-445, specific for the other three subclusters of the *Polynucleobacter* cluster, detected no bacteria in any of the samples. The two probes PnecD1-181 and PnecD2-181, which together cover almost the entire subcluster D, were applied to the sample from 15 October 2003 and also detected no bacteria. Application of the relatively broad probe BET2-870, targeting the entire *Polynucleobacter* cluster and a few related sequences outside

the cluster, resulted in very similar data as obtained by probes PnecC-16S-445 and PnecC-23S-166 (Fig. 1). Obviously, only *Polynucleobacter* bacteria belonging to PnecC could be detected in the pond during the 13-month investigation period. Results from FISH with probes targeting large phylogenetic groups support the image of the large contribution of PnecC bacteria to total bacterioplankton (Fig. 2).

Isolation and genotyping of PnecC strains. In total, 22 strains belonging to PnecC were isolated from the water sample taken on 15 October 2003. The 16S rRNA genes of all strains were partially or almost completely sequenced. Only three genotypes could be found among the isolated strains. The almost complete sequences differed only in four sequence positions (minimum sequence similarity, 99.80%). Sequencing of the 16S-23S ITS sequences of representatives of each of the three genotypes did not further increase the revealed genetic diversity of the isolates (Fig. 3). All investigated strains of the same 16S rRNA genotype possessed identical ITS sequences (including two tRNA genes) of 515 or 519 nucleotides in length. The ITS sequences of the three genotypes differed in 33 positions (including insertions and deletions). Both the three 16S rRNA gene sequences and the three ITS sequences are novel genotypes different from the genotypes previously found among investigated PnecC isolates (23; unpublished data).

By fingerprinting the 22 strains with ERIC, REP-PCR, or RAPD (three different RAPD primers were used), only three genomic genotypes could be detected. All applied fingerprinting methods could not reveal any genotypic differences between strains of the same ITS genotype but always revealed pronounced differences between strains of different ITS genotypes (Fig. 4). Thus, the three genomic genotypes revealed by fingerprinting were in perfect congruence with the ribosomal genotypes.

Analysis of the clone library. A clone library containing 103 clones of ribosomal operon fragments obtained from the water sample taken on 15 October 2003 was established. The library was systematically screened for PnecC sequences, as well as for

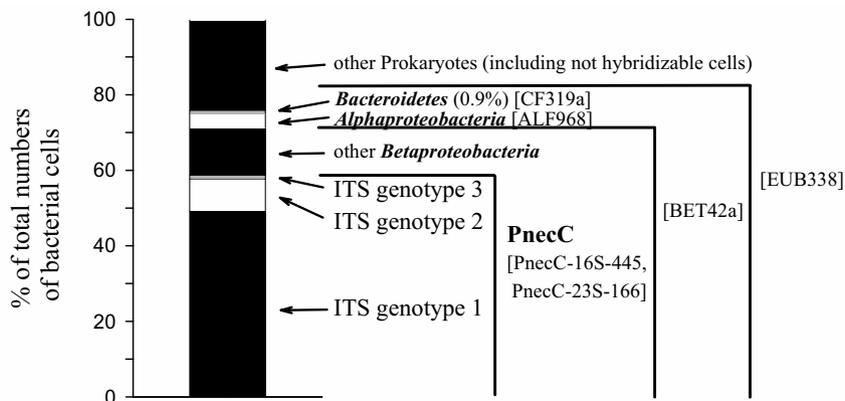


FIG. 2. Composition of the bacterioplankton community in the investigated dystrophic pond on 15 October 2003. The presented percentages are based mainly on results from hybridization with FISH probes. The data for the *Polynucleobacter* subcluster C population are the average data from hybridization with two different probes (probe BET2-870 also resulted in the detection of ~60% of the DAPI-stained cells). The percentage of other *Betaproteobacteria* is the difference between counts with probe BET42a and the percentage of *Polynucleobacter* bacteria. The fraction of other prokaryotes includes bacteria not hybridized with the used group-specific probes and the 19% of DAPI-stained cells which gave no detectable signals with probe EUB338. Percentages of *Polynucleobacter* ITS genotypes represent estimates based on the analysis of the clone library. *Gammaproteobacteria* were detected but could not be enumerated due to very low cell numbers. Names of probes are shown in square brackets.

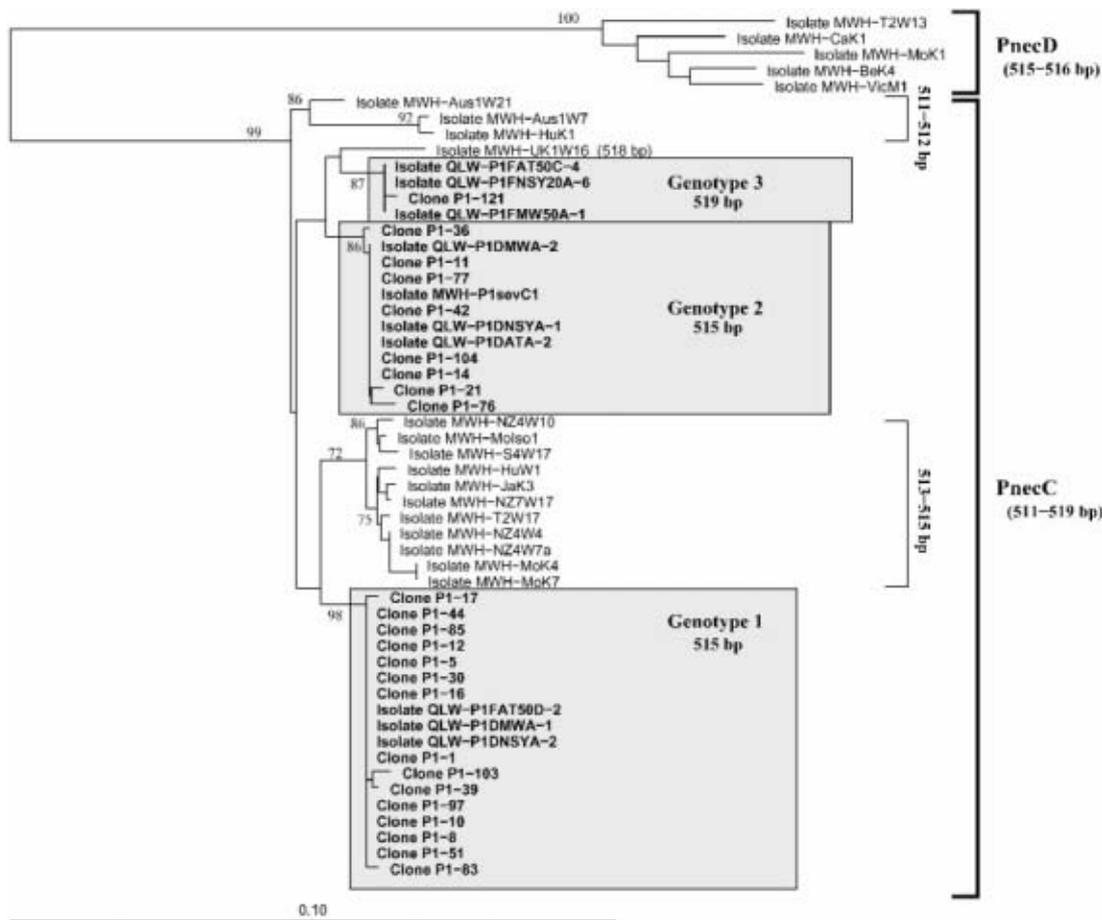


FIG. 3. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of isolated and uncultured strains affiliated with PnecC and PnecD. The tree was calculated with complete 16S-23S ITS sequences (511 to 519 nucleotides). The length of the complete ITS sequences (including two tRNA genes) is indicated for single sequences or for groups of sequences. The two subclusters, PnecC and PnecD, are indicated by the outermost right brackets. Isolates and clones of the three genotypes found in the investigated pond are indicated by gray boxes. The three ITS genotypes known from the investigated pond and the other 13 ITS genotypes shown together represent 76% of the currently known ITS genotypes affiliated with PnecC. The ITS sequence (510 bp) of *Ralstonia solanacearum* (NC_003295) served as the outgroup (data not shown). Bootstrap (1,000 iterations) values of >70% are shown. The scale bar indicates 10% estimated sequence divergence. Clone P1-31 (genotype 1) is not shown in the tree. Its ITS sequence is identical with the sequences of the genotype 1 isolates, as well as with the majority of the genotype 1 clones.

different PnecC genotypes. In total, 56 PnecC clones were detected. Thus, 54.4% of the total number of clones was comprised of PnecC clones, which is close to the 58.8% (standard deviation, 1.9; results from hybridizations with three different FISH probes) contribution of PnecC cells to the total number of bacterioplankton cells.

Screening of the clone library for different PnecC ITS genotypes by restriction fragment length polymorphism analysis and by four PCR probes specific for the three ITS genotypes known from the isolates resulted in the detection of only three ITS genotypes. Based on this approach, each PnecC clone could be assigned to one of the three ITS genotypes known from the isolates obtained from the same habitat at the same time. No contradiction between the results obtained by the two screening methods was observed. For further confirmation, 25 PnecC clones (including all clones assigned by screening to genotypes 2 and 3, as well as 16 clones assigned to genotype 1) were selected for complete ITS sequencing, as well as partial or complete 16S rRNA gene sequencing. Sixty-seven percent of

the analyzed cloned ITS sequences was identical with the sequences of isolates obtained from the same water sample. The other sequences differed in one to three sequence positions (0.2 to 0.6% of sequence positions). In phylogenetic analysis, these slightly different sequences clearly clustered with the three ITS genotypes of the isolates (Fig. 3). None of the observed sequence differences within a group of ITS genotypes was found in more than one sequence. In order to identify potential PCR artifacts among the sequence differences between cloned sequences and directly sequenced isolates of the same ITS genotype, the cloned ITS sequences were compared with a large set of PnecC and PnecD reference sequences. These reference sequences were obtained by direct sequencing from cultured representatives of the two *Polynucleobacter* subclusters (Table 3). Only 1 of the 13 identified potential PCR artifacts was located at a sequence position, which is variable within PnecC. The other 12 potential artifacts were located in positions which were found to be invariable within PnecC or even within both subclusters. Based on this sequence compar-

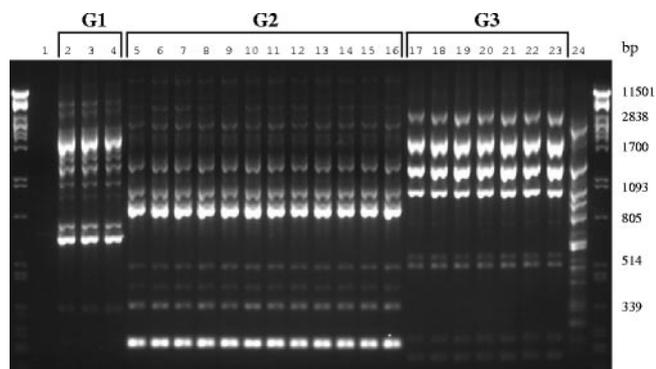


FIG. 4. Genomic fingerprints of PnecC strains isolated from the dystrophic pond. The presented RAPD fingerprints were obtained by using primer A (49). Use of two other RAPD primers, as well as the application of two other fingerprinting methods (ERIC and REP-PCR), did not result in differences in the fingerprints of strains of the same ITS genotype. The isolates were assigned to the respective genotypes based on their ribosomal sequences. Relatively large amounts of PCR products were applied to the gel to make weak bands also visible. Lane 1, negative control (no template DNA); lanes 2 through 4, genotype 1 (G1) strains; lanes 5 through 16, genotype 2 (G2) strains; lanes 17 through 23, genotype 3 (G3) strains; lane 24, *E. coli*; outermost left and right lanes, lambda ladder.

ison, we assume that the 25 cloned ITS sequences analyzed represent only three ITS genotypes.

Reconstruction of the PnecC population structure and the bacterioplankton community structure. The cloned ribosomal fragments of the three PnecC ITS genotypes differ in length by only 3 nucleotides (1 bp in 16S rRNA genes and 4 bp in ITS sequences); therefore, we do not expect significant differences in PCR amplification of these sequences. If one further assumes for these very closely related strains no pronounced differences in ribosomal copy numbers per cell, as well as no genotype-specific differences in the efficiency of DNA extraction, then the established clone library could be used for the estimation of the PnecC population structure in the investigated pond. Quantitative analysis of the screening of the PnecC clones revealed that 84% of the PnecC clones belong to ITS genotype 1, 14% to ITS genotype 2, and only 2% to ITS

genotype 3. This indicates a strongly uneven genotypic structure of the PnecC population at the day of sampling.

For estimation of the contribution of the single PnecC ITS genotypes to the total bacterioplankton, their potential under representation in the clone library was estimated by comparison of the PnecC percentage determined by FISH (58.8%) and the PnecC percentage in the clone library (54.4%). This approach resulted in the estimation that PnecC genotype 1 contributed ca. 50% to the total number of bacterial cells in the investigated dystrophic pond (Fig. 2).

Comparison of cloned PnecC sequences with sequences obtained from the isolates (Fig. 3) demonstrates complete coverage of the PnecC population by cultivation. Therefore, the genomic fingerprinting of the isolates provides insights into the population structure beyond the phylogenetic resolution of ribosomal markers. The detection of only three genotypes by fingerprinting indicates a low microdiversity of the PnecC population even on the genome level.

DISCUSSION

In order to verify the surprisingly large contribution of the PnecC population to the bacterioplankton in the investigated habitat, a set of nested FISH probes was applied. Two independent probes specific for subcluster PnecC, as well as a broader probe (7) specific for the entire *Polynucleobacter* cluster (23) and a few sequences outside of this cluster, provided very similar results. Application of a probe covering the entire non-PnecC part of the *Polynucleobacter* cluster resulted in no detections. These consistent results clearly verify the dominance of the PnecC population; however, we cannot exclude an underestimation of the PnecC numbers by the presence of PnecC cells giving only undetectable hybridization signals.

The difference of 4% in the contribution of PnecC to total bacterial numbers (FISH) and the total number of clones in the library could be a result of several factors (14, 41, 46). On the other hand, we do not expect a strongly biased representation of the different PnecC ITS genotypes in the clone library because we assume neither significant differences in DNA extraction efficiency for the closely related PnecC strains nor strong differences in rRNA gene copy numbers, or a strong

TABLE 3. Analysis of the 25 ITS sequences affiliated with PnecC obtained from the established clone library for potential PCR artifacts^a

Analyzed ITS sequences (source)	Affiliation of sequences	No. of sequences	No. of analyzed sequence positions	Potential PCR artifacts (no. of sequence positions)	No. of potential artifacts in positions:		
					Conserved in PnecC and PnecD	Conserved in PnecC	Variable within PnecC and PnecD
PnecC reference sequences ^b	PnecC	34	17,511		No variation ^d	No variation ^e	Variable ^f
PnecD reference sequences ^c	PnecD	18	9,279		No variation ^d	No variation ^e	Variable ^f
Clones (this study)	PnecC	25	12,879	13	11	1	1

^a Sequence positions, which differed in the cloned sequences from sequences of isolates belonging to the same ITS genotype, were considered potential PCR artifacts. In total 13 positions, i.e., 0.1% of the total number of cloned ITS sequence positions with potential PCR artifacts, were identified. These positions were compared with the homologous positions in a set of 52 reference sequences affiliated with subclusters C and D of the *Polynucleobacter* cluster. All reference sequences were obtained by direct sequencing. Only one potential PCR artifact was found to be located in a variable sequence position. The other sequence differences were located in sequence positions absolutely invariable in both subclusters or at least within PnecC.

^b Sequences from directly sequenced isolates and endosymbionts belonging to *Polynucleobacter* subcluster C (PnecC), including isolates obtained from the dystrophic pond.

^c Sequences from directly sequenced isolates belonging to *Polynucleobacter* subcluster D (PnecD).

^d No variation within PnecC and PnecD, and identical in both subclusters.

^e No variation within PnecC and PnecD, but not identical in both subclusters.

^f Variable within PnecC and PnecD.

difference in the template-to-product ratio in the PCR of PnecC sequences. Polz and Cavanaugh (38) compared template and product ratios in PCR amplifications of the ribosomal genes of closely related species and observed shifts by factors of 1.0 to 1.8. The sequences of the different PnecC ITS genotypes are much more similar to each other than the sequences of these closely related species; however, the frequencies of the ITS genotypes in the clone library differed by factors of 5.9 and 47.0. Thus, it appears to be unlikely that the uneven ITS genotype distribution in the clone library is predominantly a result of PCR bias. We assume that the ITS genotype frequencies observed in the established clone library provide a semiquantitative image of the genotypic structure of the investigated PnecC population.

Large PnecC numbers in the pelagic zone of the investigated pond. To our knowledge, the absolute numerical dominance of a species-like bacterial population in a nonextreme aquatic habitat, as well as the occurrence of such a planktonic population with cell numbers of $>1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, was not reported previously. Bacterial groups demonstrated to occur in nonextreme habitats with high relative numbers represented much broader phylogenetic groups (7, 36). For instance, the well-investigated SAR11 cluster, which comprises up to 50% and, on average, 30% of bacterioplankton in marine surface waters (36), represents a broad phylogenetic group with a minimum 16S rRNA sequence similarity of 88.8% (PnecC, 98.5%). This low similarity value indicates that this cluster potentially harbors several species belonging to one or several genera.

The PnecC group is a phylogenetically narrow, but potentially ecologically diverse, group (23, 26, 44). Strains affiliated with this group are thought to be obligate endosymbionts of at least two benthic ciliate species living in fresh and brackish water (26, 44). We demonstrated by FISH the presence of free-living PnecC cells in the pelagic zone of a freshwater habitat. This indicates that many or all of the environmental PnecC sequences collected from the pelagic zones of freshwater habitats (7, 10, 11, 21, 27, 50) originate from free-living cells; however, it is still not known if these cells represent completely free-living strains or facultative endosymbionts of ciliates. The numerically significant contribution of free-living stages of facultative endosymbionts or facultative parasites of protists (e.g., *Legionella* spp.) to total numbers of bacterial communities has not been observed (17). However, detailed studies on PnecC bacteria have to reveal whether the endosymbiotic stages (26, 44) and the observed free-living stages represent two completely independent lifestyles or only two stages of the same lifestyle (i.e., facultative endosymbionts). This knowledge will be essential for the understanding of the reasons for the observed numerical dominance of the PnecC bacteria.

Low microdiversity of the PnecC population. Only a few studies have revealed the microdiversity of free-living bacterial populations (1, 29, 42, 45). The investigated PnecC population differed from these populations in a low microdiversity and a strongly uneven population structure. The observed low microdiversity may reflect a low overall genotype richness of the PnecC population in the pond or may be a snapshot of a more diverse population with a dynamic structure. Low genotype richness of the PnecC population would be in conflict with the "everything is everywhere" hypothesis (4, 15), which assumes

that free-living microorganisms are easily dispersed. Therefore, the presence of only a small fraction of the existing PnecC ITS genotypes would not be expected. On the other hand, dispersal restrictions exist for other aquatic bacteria, which result in the appearance of biogeography in these species (20, 22); therefore, we cannot exclude the existence of dispersal restrictions in PnecC bacteria. Further on, the frequencies of potential invasion and the extinction of genotypes could be of importance in small habitats occupied by relatively small populations. The PnecC population in the pond may get bottlenecked during ice-covered periods with oxygen depletion. Bottlenecking in combination with low invasion rates may result in limited genotype richness. Obviously, insights into the dynamics of population structures, as well as a detailed knowledge of the dispersal of free-living aquatic bacteria, are necessary for a better understanding of the intraspecific diversity of bacterial populations in freshwater.

Uneven structure of the PnecC population. Thompson et al. (42) estimated that a marine *V. splendidus* population consisted of >1,000 unique genotypes and deduced from allele frequencies within the investigated sample of 232 cultured strains a relatively even population structure. The strongly uneven population structure observed in the PnecC population could either be the result of genetic drift or be the result of ecological selection of particular genotypes. Explanation by genetic drift would require a small effective population size, which is usually not given in populations of free-living bacteria but was demonstrated in populations of endosymbiotic bacteria (47). As we do not know the intensity of gene flow (i.e., dispersal of genotypes) between the PnecC population of the investigated pond and the populations of other habitats, it is not possible to rule out the influence of genetic drift. On the other hand, the observed uneven population structure could be explained by genotype-specific selection in predation or genotype-specific differences in the ability to utilize available substrates. Pronounced differences in grazing mortality between four closely related ($\geq 99.6\%$ 16S rRNA similarity) strains affiliated with the *Polynucleobacter* subcluster D (PnecD) were observed (5). Strain-specific grazing mortality differed under predation by the same flagellate strain by up to threefold, and the grazing mortality of the same bacterial strain differed under grazing by three closely related flagellates (100% identity of the 18S rRNA genes) by up to fourfold. Intraspecific differences in grazing sensitivity were also observed for *Hylemonella gracilis* strains (48).

Ecological importance of microdiversity. Thompson et al. (42) suggested that much of the huge genotypic diversity observed in a *V. splendidus* population is ecologically neutral, i.e., redundant. The observed large contribution of a PnecC population with a low microdiversity demonstrates that ecologically successful bacterial populations do not need to possess a high genetic diversity. A high intraspecific diversity could result in a high degree of ecological differentiation within the population, which could contribute to the ecological success of the population. The observed combination of a low intraspecific diversity and high contribution to the total bacterioplankton community may support the assumed ecological redundancy within genetically diverse populations (42). However, the observed coexistence of only a few of the known PnecC genotypes leaves the possibility open that some PnecC genotypes differ in

their ecological adaptation and occupy partially separated ecological niches. Such ecological differences in closely related bacteria are known from other bacterial groups (6, 24, 28).

For a deeper understanding of the ecology and function of aquatic bacteria, the ecological meaning of intraspecific diversity (microdiversity) and the potential intraspecific ecological diversification in bacterial populations and species have to be fully revealed.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Peter Stadler and Tanja Furtner for their help with sampling and Martin F. Polz for stimulating discussions.

This study was supported by the Austrian Science Fund (project P15655) and the Austrian Academy of Sciences. Q.L.W. was supported by a scholarship (EZA project 894/01) from the North-South Dialogue Program, Ministry of Foreign Affairs, Vienna, Austria.

REFERENCES

- Acinas, S. G., V. Klepac-Ceraj, D. E. Hunt, C. Pharino, I. Ceraj, D. L. Distel, and M. F. Polz. 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* **430**:551–554.
- Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F. Glöckner, A. Wille, and R. Psenner. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2138–2144.
- Amann, R. L., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919–1925.
- Baas-Becking, L. G. M. 1934. *Geobiologie of Inleiding tot de Milieukunde*. Van Stockum & Zon, The Hague, The Netherlands.
- Boenigk, J., P. Stadler, A. Wiedlroither, and M. W. Hahn. 2004. Strain-specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5787–5793.
- Bronikowski, A. M., A. F. Bennett, and R. E. Lenski. 2001. Evolutionary adaptation to temperature. VIII. Effects of temperature on growth rate in natural isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from different thermal environments. *Evolution* **55**:33–40.
- Burkert, U., F. Warnecke, D. Babenzien, E. Zwirnmann, and J. Pernthaler. 2003. Members of a readily enriched β -proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6550–6559.
- Casamayor, E. O., Pedrós-Alió, C., Muyzer, G., and R. Amann. 2002. Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1706–1714.
- Crosbie, N. D., M. Pöckl, and T. Weisse. 2003. Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and cpcBA-intergenic spacer sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5716–5721.
- Crump, B. C., E. V. Armbrust, and J. A. Baross. 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3192–3204.
- Crump, B. C., G. W. Kling, M. Bahr, and J. E. Hobbie. 2003. Bacterioplankton community shifts in an Arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2253–2268.
- de Bruijn, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2180–2187.
- Eiler, A., S. Langenheder, S. Bertilsson, and L. J. Tranvik. 2003. Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3701–3709.
- Farrelly, V., F. A. Rainey, and E. Stackebrandt. 1995. Effect of genome size and *rm* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2798–2801.
- Finlay, B. J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**:1061–1063.
- Fisher, M. M., and E. W. Triplett. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4630–4636.
- Fliermans, C. B. 1996. Ecology of *Legionella*: from data to knowledge with a little wisdom. *Microb. Ecol.* **32**:203–228.
- García-Martínez, J., and F. Rodríguez-Valera. 2000. Microdiversity of uncultured marine prokaryotes: the SAR11 cluster and the marine Archaea of group I. *Mol. Ecol.* **9**:935–948.
- García-Martínez, J., S. G. Acinas, R. Massana, and F. Rodríguez-Valera. 2002. Prevalence and microdiversity of *Alteromonas macleodii*-like microorganisms in different oceanic regions. *Environ. Microbiol.* **4**:42–50.
- Glaeser, J., and J. Overmann. 2004. Biogeography, evolution, and diversity of epibionts in phototrophic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4821–4830.
- Glöckner, F. O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler, and R. Amann. 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of *Actinobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5053–5065.
- Gugger, M., R. Molica, B. Le Berre, P. Dufour, C. Bernard, and J.-F. Humbert. 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1097–1100.
- Hahn, M. W. 2003. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5248–5254.
- Hahn, M. W., and M. Pöckl. 2005. Ecotypes of planktonic *Actinobacteria* with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:766–773.
- Hahn, M. W., P. Stadler, Q. L. Wu, and M. Pöckl. 2004. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J. Microbiol. Methods* **57**:379–390.
- Heckmann, K., and H. J. Schmidt. 1987. *Polynucleobacter necessarius* gen. nov., sp. nov., an obligately endosymbiotic bacterium living in the cytoplasm of *Euplotes aediculatus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:456–457.
- Hiorns, W. D., E. A. Methé, S. A. Nierzwickbauer, and J. P. Zehr. 1997. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2957–2960.
- Jaspers, E., and J. Overmann. 2004. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4831–4839.
- Klepac-Ceraj, V., M. Bahr, B. C. Crump, A. P. Teske, J. E. Hobbie, and M. F. Polz. 2004. High overall diversity and dominance of microdiverse relationships in salt marsh sulphate-reducing bacteria. *Environ. Microbiol.* **6**:686–698.
- Kurmayer, R., G. Christiansen, J. Fastner, and T. Börner. 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ. Microbiol.* **6**:831–841.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüßmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K. H. Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**:1363–1371.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K.-H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* **142**:1097–1106.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593–600.
- Moore, L. R., R. Roco, and S. W. Chisholm. 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**:464–467.
- Morris, R. M., M. S. Rappé, S. A. Connon, K. L. Vergin, W. A. Siebold, C. Carlson, and S. J. Giovannoni. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**:806–810.
- Neef, A. 1997. Ph.D. thesis. Technical University, Munich, Germany.
- Polz, M. F., and C. M. Cavanaugh. 1997. A simple method for quantification of uncultured microorganisms in the environment based on in vitro transcription of 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1028–1033.
- Schauer, M., and M. W. Hahn. 2005. Diversity and phylogenetic affiliations of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1931–1940.
- Springer, N., R. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, and H. Schmidt. 1996. *Polynucleobacter necessarius*, an obligate bacterial endosymbiont of the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*, is a member of the beta-subclass of Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**:333–336.
- Suzuki, M., and S. J. Giovannoni. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:625–630.
- Thompson, J. R., S. Pacocha, C. Pharino, V. Klepac-Ceraj, D. E. Hunt, J. Benoit, R. Sarma-Rupavarm, D. L. Distel, and M. F. Polz. 2005. Genotypic

- diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* **307**:1311–1313.
43. **Urbach, E., K. L. Vergin, L. Young, A. Morse, G. L. Larson, and S. J. Giovannoni.** 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultratrophic Crater Lake. *Limnol. Oceanogr.* **46**:557–572.
44. **Vannini, C., G. Petroni, F. Verni, and G. Rosati.** 2005. *Polynucleobacter* bacteria in the brackish-water species *Euplotes harpa* (Ciliata, Hypotrichia). *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**:116–122.
45. **Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, and H. O. Smith.** 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**:58–60.
46. **von Wintzingerode, F., U. B. Göbel, and E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213–229.
47. **Wernegreen, J. J., and N. A. Moran.** 1999. Evidence for genetic drift in endosymbionts (*Buchnera*): analyses of protein-coding genes. *Mol. Biol. Evol.* **16**:83–97.
48. **Wu, Q. L., J. Boenigk, and M. W. Hahn.** 2004. Successful predation of filamentous bacteria by a nanoflagellate challenges current models of flagellate bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:332–339.
49. **Ziemke, F., I. Brettar, and M. G. Höfle.** 1997. Stability and diversity of the genetic structure of a *Shewanella putrefaciens* population in the water column of the central Baltic. *Aquat. Microb. Ecol.* **13**:63–74.
50. **Zwart, G., B. C. Crump, M. P. Kamst-van Agterveld, F. Hagen, and S. K. Han.** 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:141–155.

Ecotypes of Planktonic Actinobacteria with Identical 16S rRNA Genes Adapted to Thermal Niches in Temperate, Subtropical, and Tropical Freshwater Habitats

Martin W. Hahn* and Matthias Pöckl

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondsee, Austria

Received 18 August 2004/Accepted 15 September 2004

Seven strains with identical 16S rRNA genes affiliated with the Luna2 cluster (*Actinobacteria*) were isolated from six freshwater habitats located in temperate (Austria and Australia), subtropical (People's Republic of China), and tropical (Uganda) climatic zones. The isolates had sequence differences at zero to five positions in a 2,310-nucleotide fragment of the ribosomal operon, including part of the intergenic spacer upstream of the 16S rRNA gene, the complete 16S rRNA gene, the complete 16S-23S internal transcribed spacer (ITS1), and a short part of the 23S rRNA gene. Most of the few sequence differences found were located in the internal transcribed spacer sequences. Two isolates obtained from habitats in Asia and Europe, as well as two isolates obtained from different habitats in the People's Republic of China, had identical sequences for the entire fragment sequenced. In spite of minimal sequence differences in the part of the ribosomal operon investigated, the strains exhibited significant differences in their temperature response curves (with one exception), as well as pronounced differences in their temperature optima (25.0 to 35.6°C). The observed differences in temperature adaptation were generally in accordance with the thermal conditions in the habitats where the strains were isolated. Strains obtained from temperate zone habitats had the lowest temperature optima, strains from subtropical habitats had intermediate temperature optima, and a strain from a tropical habitat had the highest temperature optimum. Based on the observed temperature responses, we concluded that the strains investigated are well adapted to the thermal conditions in their home habitats. Consequently, these closely related strains represent different ecotypes adapted to different thermal niches.

Many free-living bacterial, archaeal, and protist species have a cosmopolitan distribution and differ in this trait from almost all macroorganisms (9). Closely related strains of several microbial species have been detected in distant habitats (4, 6, 8, 10, 12, 26). For some free-living bacteria and archaea, restricted geographical distributions have been demonstrated for strains inhabiting rare, extreme environments (e.g., hot springs) (17, 24). These distributions might be a result of isolation of populations due to limited dispersal potential resulting from small population sizes combined with the rare occurrence of appropriate habitats separated by wide distances. In the case of free-living microorganisms inhabiting nonextreme environments, the existence of a restricted geographical distribution has rarely been demonstrated (6). For free-living microbes easy dispersal and frequent population of appropriate habitats are assumed (2, 9). Intensive gene flux between habitats should prevent the isolation of populations. On the other hand, local adaptation of populations may prevent colonization of a habitat by less adapted competitors originating from an ecologically different habitat. It is not known, however, if free-living cosmopolitan microbial species consist of many locally adapted populations or if they form a single global population with intensive gene flux.

Intraspecific differences in physiological and ecological traits are well known for free-living microorganisms (3, 14, 18, 21, 22,

23), but so far it has been shown only rarely that this intraspecific variation is linked to local adaptation. For instance, Bronikowski et al. (5) demonstrated that there was a positive correlation between the optimal growth temperatures of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains and the body temperatures of their cold-blooded (turtles) or warm-blooded hosts (swine and squirrels). These findings indicate that there is local adaptation of members of the same species to thermal niches, which are different due to differences in the body temperatures of their hosts.

In order to test for local adaptation in free-living bacteria, we isolated seven *Actinobacteria* strains with identical 16S rRNA gene sequences (genotype 1 strains) from freshwater habitats located in different climatic zones. These habitats provide different thermal conditions; therefore, bacteria inhabiting these freshwater systems may be differently adapted. We investigated the thermal adaptation of six of the seven genotype 1 strains and found pronounced differences in the thermal adaptation of the strains investigated. These differences reflect the different thermal conditions of the habitats from which the strains originated. Therefore, we concluded that the strains investigated represent different ecotypes adapted to different thermal niches.

MATERIALS AND METHODS

Sampling sites and isolation of bacterial strains. The seven strains investigated were isolated by the filtration-acclimatization method (10, 11) from surface waters (depth, 0.5 to 1 m) of six freshwater habitats located in Austria, Australia, the People's Republic of China, and Uganda. Details on the sampling habitats are shown in Table 1 and elsewhere (10–12).

* Corresponding author. Mailing address: Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria. Phone: 43 6232 3125-29. Fax: 43 6232 3578. E-mail: martin.hahn@oeaw.ac.at.

TABLE 1. Characteristics of habitats from which the seven genotype 1 strains were isolated

Habitat	Habitat characteristics	No. of sampling sites	Country	Geographic coordinates	Climatic zone	Monthly avg air temp (°C) ^d		Yearly maximum water temp (°C)
						Minimum	Maximum	
Lake Mondsee ^e	Deep submontane lake in prealpine region	1	Austria	47°50'N, 13°22'E	Temperate	-1.6	18.0	22-28
Lake Wolfgangsee ^e	Deep submontane lake in prealpine region	1	Austria	47°46'N, 13°22'E	Temperate	-1.6	18.0	22-26
Pond in Sydney ^b	Artificial shallow pond	1	Australia	33°52'S, 151°13'E	Temperate	12.0	22.1	26-31
Lake Taihu ^c	Large shallow lake	2	People's Republic of China	31°30'N, 120°20'E	Subtropical	2.2	27.8	29-34
Huqiu (Tiger Hill) pond	Small pond, influenced by a spring	1	People's Republic of China	31°20'N, 120°40'E	Subtropical	2.2	27.8	ND ^f
Pond near Jinja	Shallow natural pond	1	Uganda	0°25'N, 33°12'E	Tropical	20.1	22.4	31 ^g

^a Lake Mondsee and Lake Wolfgangsee are located in the Salzkammergut area. The distance between the two sampling sites is 10 km.

^b Located in the Sydney Royal Botanic Gardens.

^c The greatest distance between sampling sites in Lake Taihu and the Huqiu pond is ca. 60 km.

^d At locations in the same area as the habitats sampled (Salzburg, Sydney, Nanjing, Kampala).

^e ND, not determined.

^f Maximum temperature measured in another pond in the area of Jinja (data from Asayo [1]).

Water temperatures. Data for the water temperatures of Lake Mondsee (1999 to 2003), Lake Wolfgangsee (1999 to 2003), Lake Taihu (1991 to 2002), and the pond in the Sydney Royal Botanic Gardens (2000 to 2004) were analyzed. For Lake Mondsee depth profiles of the water temperatures that were recorded in monthly (cold season) to fortnightly (warm season) intervals were available. Data for Lake Wolfgangsee were obtained at a depth of 0.5 m at 15-min intervals. Data for Lake Taihu were recorded at several sampling points at a depth of ca. 1 m at monthly intervals. Temperature data for the Huqiu pond, as well as the pond near Jinja, Uganda, were not available.

Sequencing of 16S rRNA genes and flanking regions. Parts of the ribosomal operon, including the flanking region (intergenic spacer) upstream of the 16S rRNA gene, the 16S rRNA gene, the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS1), and a short fragment of the 23S rRNA gene, of eight Luna2 cluster strains (seven strains with identical 16S rRNA sequences and one reference strain) were directly sequenced. For sequencing of the 16S rRNA gene, standard primers and PCR conditions were used (15). Primer LEAD1 (5'-CCT TGA GAA CTC AAC AGC GTG-3') was designed for amplification and sequencing of parts of the intergenic spacer (IGS) upstream of the 16S rRNA gene. This primer targets a conserved sequence located ca. 180 to 300 bp upstream of the 16S rRNA genes, which was found in *Streptomyces* spp. (e.g., *Streptomyces griseus*; accession number M76388) *Microbispora bispora* (accession number U83909), *Frankia* spp. (accession number M88466), and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedoni* (ongoing genome sequencing project; http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_michiganensis/). Amplification with primers LEAD1 and 1492R (15) was performed with Primus or Primus 96^{Plus} thermocyclers (MWG-Biotech) by using 50-µl reaction mixtures containing approximately 100 ng of DNA, each deoxynucleotide at a concentration of 200 µM, 2 mM MgCl₂, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (QIAGEN), and each primer at a concentration of 0.2 µM. The cycling conditions were initial denaturation at 94°C for 3 min, which was followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 54°C for 1 min, and 72°C for 2 min. The cycling was finished with an extension step of 7 min at 72°C.

For amplification and sequencing of ITS1, primers 1406Fmod (5'-TGT ACA CAC CGC CCG TCA AG-3'; modified primer 1406F [16]) and L189R (25) were used. In the case of the Luna2 strains investigated the 3' end of primer 1406F matched its target sequence in the 16S rRNA gene, as well as a sequence in ITS1. This resulted in amplification of two fragments that were different sizes. Fragments obtained from one strain were separated and sequenced. Based on the sequences obtained, primer 1406Fmod specific for the 16S rRNA gene was designed and used for sequencing ITS1 of all the strains investigated. Amplification was performed basically as described above for amplification with primers LEAD1 and 1492R. The only differences were the MgCl₂ concentration (3 mM), the primer concentration (0.3 µM), the annealing temperature (41°C), a shorter extension time at 72°C (1 min), and a shorter final extension step at 72°C (5 min). The sequences obtained were aligned and analyzed by using the ARB software package (<http://www.arb-home.de> [20]). Phylogenetic analysis was performed as described previously (10).

Determination of temperature-dependent growth characteristics of temperature-acclimatized bacterial strains. The growth of six strains was monitored by spectrophotometric measurement of the optical density at 575 nm. Experiments were performed at 15, 20, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 36, 37, and 38°C. Prior to the experiments, bacteria were acclimatized for at least 10 generations to the temperature conditions in the growth experiments. All cultures were grown in liquid NSY medium (11) (3 g liter⁻¹) on a rotary shaker (100 rpm) in the dark. Precultures of acclimatized strains that were used for setting up growth experiments were grown overnight. Cultures used for growth rate measurement were adjusted to an initial optical density of 0.015 to 0.02. Experiments were performed in 100-ml Erlenmeyer flasks in triplicate for each strain. The medium used for the experiments was preincubated for several hours under the same temperature conditions as the temperature conditions in the experiment. Measurement of the optical density was started 30 to 60 min after inoculation and then was performed at 30- to 60-min intervals (depending on the growth rates of the bacteria tested) over a period of 4 to 5 h. Experiments at each temperature were performed simultaneously for all six strains investigated. Experiments at 30 and 32.5°C were repeated three and four times, respectively, and experiments at 25, 36, and 37°C were repeated two times.

For calculation of growth rates the optical density data were ln transformed and analyzed by linear regression. Only optical density values in the range from 0.02 to 0.1 (at least three measurements) were considered for calculation. For previous growth rate measurements (10) the data used for calculation were not restricted to this range of optical density values.

The optimal growth temperature was determined graphically. For all strains investigated there was a linear increase in the temperature-dependent growth curves at the temperature range below 25 to 35°C. With further increases in

TABLE 2. Characteristics of the seven genotype 1 strains and reference strain MWH-Tana7 (16S rRNA genotype 7)

Strain	Habitat	Water temp (°C) ^a	Season of sampling ^b	No. of sequence differences ^c	Optimum temp (°C)	Maximum temp (°C)	Highest growth rate (h ⁻¹) ^e	Shortest doubling time (h) ^e	Cell size (μm ³) ^f
MWH-Mo1	Lake Mondsee	4.7	w		28.8	35.0	0.344	2.0	0.062
MWH-Wo1	Lake Wolfgangsee	4.5	w	3	27.5	37.0	0.352	2.0	0.059
MWH-Aus1	Pond, Sydney	31.0	s	3	25.0	36.0	0.321	2.2	0.064
MWH-HuqW11	Pond, Huqiu	ND ^d	a	2	31.8	37.0	0.365	1.9	0.057
MWH-Ta1	Lake Taihu (site 1)	7.2	w	3	34.2	37.0	0.442	1.6	0.055
MWH-TaSIW17	Lake Taihu (site 2)	14.3	a	2	ND	ND	ND	ND	ND
MWH-Uga2	Pond near Jinja	>20 ^g	r	5	35.6	37.0	0.388	1.8	0.061
MWH-Tana7 ^h	Tana River, Kenya	>20 ^g	r	59	ND	ND	ND	ND	0.065

^a Water temperature at the time of sampling for isolation of bacteria.

^b w, winter; s, summer; a, autumn; r, rainy season.

^c Number of different sequence positions in a 2,310-bp fragment of the ribosomal operon compared with the sequence of MWH-Mo1.

^d ND, not determined.

^e Growth in liquid NSY medium (3 g liter⁻¹) at the temperature allowing the highest growth rate.

^f Growth in liquid NSY medium (3 g liter⁻¹) at ca. 25°C.

^g The temperature was not measured; the temperature usually does not drop below 20°C.

^h The genotype I strains and strain MWH-Tana7 have a level of 16S rRNA gene sequence similarity of 99.8%.

temperature the growth curves showed either a plateau or a linear decrease. The optimal growth temperature was defined as the crossing point of the linear regression lines of the increasing part of the growth curve and the plateau line or the decreasing part of the curve.

Determination of minimum and maximum temperatures allowing growth of nonacclimatized bacterial strains. Bacteria were precultured in liquid NSY medium on a rotary shaker (100 rpm) at room temperature. Samples (10 μl) from the precultures were spotted on NSY agar plates, and the plates were sealed with Parafilm and incubated at 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, and 38°C. The plates were inspected for growth weekly for 8 weeks. Formation of macroscopically visible colonies was recorded as growth.

Statistical analysis. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to test for strain-specific differences in temperature response curves, as well as for interactions of the variables temperature and strain with the temperature response. A multiple-comparison procedure was used to test for significant differences in the growth rates of the strains investigated at a given temperature. These pairwise comparisons (Tukey test) were restricted to the temperature-specific data sets, which passed the normality and equal variance tests.

Nucleotide sequence accession numbers. The ribosomal sequences of the eight isolates obtained in this study have been deposited under accession numbers

AJ507460, AJ507464, AJ507466, AJ565414, AJ565435, AJ565436, AJ630367, and AJ630368.

RESULTS

The seven strains isolated with identical 16S rRNA gene sequences (Table 2) belong to the Luna2 cluster (*Actinobacteria*) (10), which contains at least 11 different 16S rRNA genotypes (Fig. 1). The minimal sequence similarity within the Luna2 cluster is 95.9% (Fuku N101 and ARK 10165). Members of the cluster were isolated from habitats in Europe, East Asia, East Africa, Central America, and Australia and from Arctic sea ice (10, 11). The seven identical strains represent a 16S rRNA genotype (genotype 1) present in pelagic freshwater habitats located in at least three climatic zones on at least three continents. The strains were isolated from oligotrophic (e.g., Lake Wolfgangsee), oligomesotro-

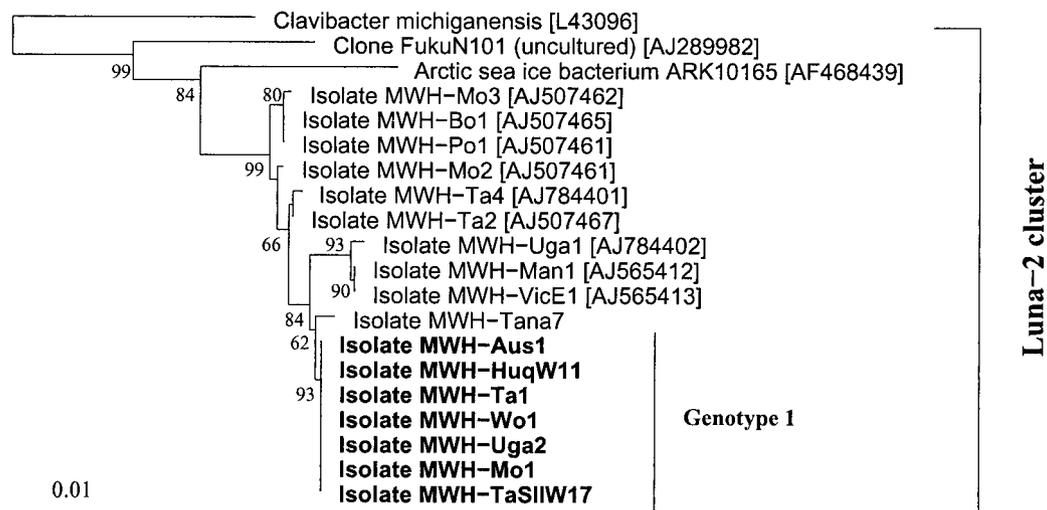


FIG. 1. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of *Actinobacteria* affiliated with the Luna2 cluster. The tree was calculated by using homologous 1,427-nucleotide sequence fragments (*E. coli* positions 51 to 1499) of the 16S rRNA genes. Bootstrap values (1,000 replicates) that are >60% are indicated at the nodes. Scale bar = 1% estimated sequence divergence. The numbers in brackets are accession numbers.

phic (e.g., Lake Mondsee), and hypertrophic (e.g., Lake Taihu, Meiling Bay) habitats. The seven genotype 1 isolates have very similar small cell sizes (Table 2) and identical C-shaped cell morphologies, and they all produce colonies with identical coloration, surface, and border characteristics on agar plates. More detailed descriptions of phenotypic characteristics of three genotype 1 strains can be found elsewhere (10).

Sequence analysis. A 2,310-nucleotide sequence stretch starting 181 or 184 nucleotides upstream of the 16S rRNA gene and ending 198 nucleotides downstream of the 5' end of the 23S rRNA gene was obtained for the seven genotype 1 strains, as well as the closest reference strain (MWH-Tana7, genotype 7). The 1,525-nucleotide 16S rRNA gene sequences of the genotype 1 strains and MWH-Tana7 differed at three sequence positions (99.8% sequence similarity). More differences were found in the parts of the IGS upstream of the 16S rRNA gene analyzed. The homologous sequences of the seven genotype 1 strains had the same 181-nucleotide sequence, while the homologous sequence of MWH-Tana7 was three nucleotides longer. The partial IGS sequence of MWH-Tana7 differed at 22 to 24 positions (sequence similarity, 87.0 to 88.0%) from the sequences of the other seven strains. The sequences of six of the seven genotype 1 strains were identical, while strain MWH-Mo1 differed at two positions (98.9% sequence similarity). The 16S-23S internal transcribed spacer of the seven genotype 1 strains had the same 406-nucleotide sequence, while the sequence of MWH-Tana7 was three nucleotides shorter. The internal transcribed spacer sequences of the seven strains differed at zero to four sequence positions (sequence similarities, 99.0 to 100%), while the sequence of MWH-Tana7 differed at 29 to 31 positions (sequence similarity, 92.4 to 92.9%). The partial (198-bp) 23S rRNA gene sequences of the seven genotype 1 strains were identical but differed at one position from the sequence of MWH-Tana7. For the entire sequenced fragment of the ribosomal operon the seven genotype 1 strains differed at zero to five positions, while MWH-Tana7 differed at 55 to 59 positions. Strains MWH-Wo1 (Austria) and MWH-Ta1 (People's Republic of China), as well as strains MWH-HuqW11 (People's Republic of China) and MWH-TaSIW17 (People's Republic of China), had identical sequences. The sequence differences among the genotype 1 strains correlated neither with the geographical origins nor with the climatic conditions in the home habitats.

Thermal adaptation. Due to limited space in the incubator used, the temperature adaptation experiments were performed with only six genotype 1 strains. In the maximum and minimum growth temperature experiments, which were performed without prior temperature acclimatization, no pronounced differences in the temperature ranges of the strains were found. All strains grew at 5°C (the lowest temperature tested), but they performed differently. Very weak growth was observed for strains MWH-Aus1 and MWH-Uga2, which do not experience temperatures below 10 and 20°C, respectively, in their home habitats. The maximum growth temperatures were found to be in a narrow range, from 35.0 to 37.0°C (Table 2). The maximum growth temperatures observed in experiments with and without prior temperature acclimatization were identical. While the temperature ranges of all the strains were very similar ($\leq 5^\circ\text{C}$ to 35 to 37°C), pronounced differences in the

optimal growth temperatures and shapes of the temperature response curves were observed (Table 2 and Fig. 2). Some of the strains investigated produced response curves with marked peaks, while other curves had plateau-like shapes. The optimum growth temperatures determined ranged from 25.0 to 35.6°C. With the exception strains MWH-Wo1 and MWH-Uga2, all of the strains had temperature response curves that were significantly different from each other (as determined by two-way ANOVA). The curves for strains MWH-Wo1 and MWH-Uga2 crossed at 31.5°C and showed that the optimum temperatures were different (27.5 and 35.6°C). At all temperatures less than 31.5°C strain MWH-Wo1 had higher growth rates than strain MWH-Uga2, and at all temperatures more than 31.5°C strain MWH-Wo1 had lower growth rates than strain MWH-Uga2. Furthermore, these two strains had significantly different growth rates at almost all temperatures (as determined by one-way ANOVA).

Besides strain-specific differences, there was also a significant interaction effect of the variables temperature and strain on the temperature responses. Thus, the differences in thermal adaptation of the strains did not simply result from shifts in the temperature response curves to higher or lower temperatures. This interaction effect resulted in strain-specific modifications of the shapes of the temperature response curves.

Growth rates of the strains were also compared separately for five temperatures by one-way ANOVA (Tukey test). For the other temperatures, the data did not pass the test for normality and/or for equal variance; therefore, an ANOVA could not be performed by the Tukey test. An increase in the percentage of significantly different pairs with increasing temperature was observed (Fig. 3). At lower temperatures (i.e., 15 and 20°C) the only tropical strain, strain MWH-Uga2, was involved in the majority of significantly different pairs. At temperatures that were $\leq 30^\circ\text{C}$ strain MWH-Uga2 had the lowest growth rate of all strains, but at 35°C this strain had the highest growth rate of all strains. At 35°C only 1 of 15 pairs showed no significant difference in the growth rates. The isolates in this pair (MWH-Ta1 and MWH-HuqW11) were from subtropical habitats.

Water temperatures in habitats from which the bacteria were isolated. The surface water temperatures in the dimictic lakes Mondsee (Fig. 4) and Wolfgangsee usually range from 0°C to 22 to 25°. In exceptional years (e.g., 2003) maximum surface water temperatures of 26 to 28°C were measured. The water temperatures in the hypolimnion range from 4 to 6°C. Lake Taihu is a large shallow lake with a maximum water depth of 2.6 m. The shallowness of the lake prevents any long-lasting thermal stratification of the water body. The water temperatures ranged from 1.5 to 34°C (Fig. 4). The temperatures in the pond located in the Sydney Royal Botanic Gardens ranged from 13 to 31°C. Systematic water temperature records were not available for the Huqiu pond or for the pond near Jinja, Uganda. Asiyo (1) reported temperature data for a pond which is located in the same area as the pond near Jinja. She measured a minimum water temperature of 24.6°C and a maximum temperature of 30.6°C. Due to the short period of measurements (May to August 2003), these data may not reflect the real maximum and minimum water temperatures in the pond from which strain MWH-Uga2 was isolated.

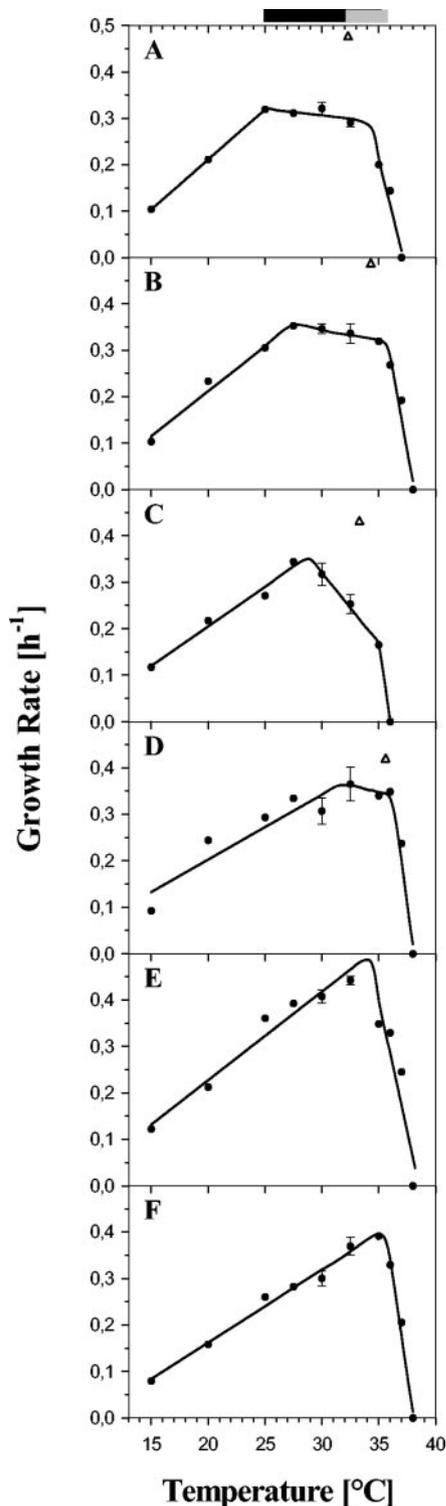


FIG. 2. Temperature response curves for temperature-acclimatized genotype 1 strains. The graphs are sorted (top to bottom) by increasing optimum temperature. (A) Strain MWH-Aus1 (isolated from a habitat in a temperate climatic zone); (B) strain MWH-Wo1 (temperate zone); (C) strain MWH-Mo1 (temperate zone); (D) strain MWH-HuqW11 (subtropical zone); (E) strain MWH-Ta1 (subtropical zone); (F) strain MWH-Uga2 (tropical zone). In panels A to D the crossing points of the linear regressions of the increasing and decreasing parts of the curves are indicated by open triangles. The vertical bar at the top indicates the range of optimum temperatures determined for the six

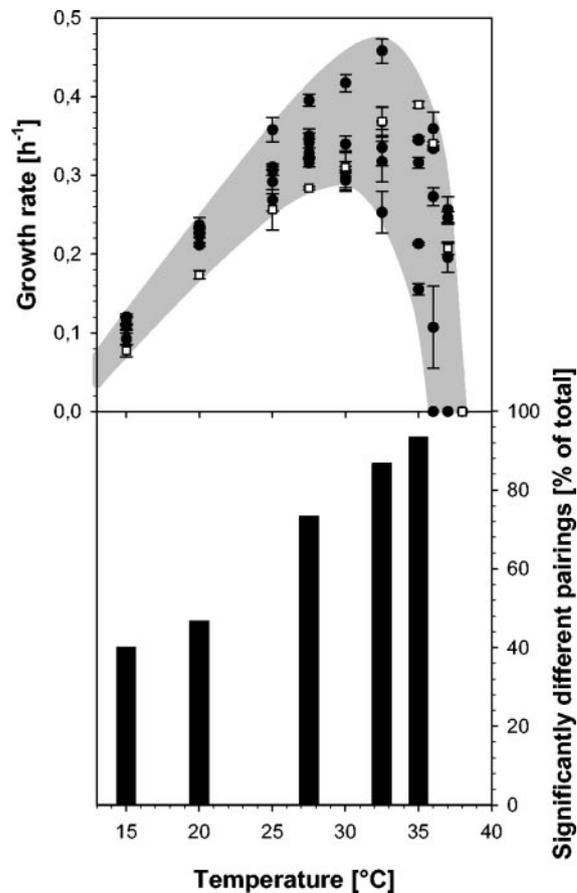


FIG. 3. (Top) Distribution of growth rate data measured for the six genotype 1 strains at different temperatures. Each symbol indicates the mean and standard deviation measured for one strain at one temperature. The data for tropical strain MWH-Uga2 are indicated by open squares. (Bottom) Pairwise comparison of strain-specific growth rates for significant ($P < 0.05$) differences by a one-way ANOVA (Tukey test). The percentage of pairs with significant differences increased with temperature. At lower temperatures the tropical zone isolate MWH-Uga2 is involved in the majority of significantly different pairs.

DISCUSSION

We investigated the thermal adaptation of closely related planktonic freshwater bacteria isolated from habitats located in three climatic zones. The low numbers of differences in the IGS and ITS1 sequences demonstrate the close phylogenetic relationship of the genotype 1 strains. Jaspers and Overmann (13) demonstrated relatively distant relatedness between two groups of strains, all of which had identical 16S rRNA gene sequences. Strains belonging to the two different groups had low levels of genomic DNA similarity, differences in ITS1 detectable by restriction fragment length polymorphism analysis, pronounced differences in cell morphology, and different genomic fingerprints. It is highly likely that these two groups of

strains. The gray part of the bar represents the temperature range in which the crossing points (A to D) and the optimum temperatures for strains MWH-Ta1 (E) and MWH-Uga2 (F) fall. The error bars indicate the standard deviations of the average growth rates from repeated experiments (only for 30.0 and 32.5°C data).

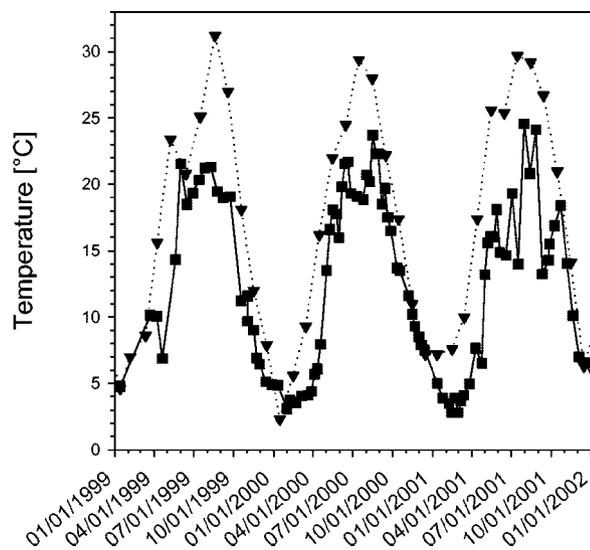


FIG. 4. Water temperatures in the nonstratified Lake Taihu (∇) and surface water (0 m) of Lake Mondsee (\blacksquare) for 1999 to 2001. The maximum water temperatures reported for these lakes were observed during other years.

strains represent two different bacterial species. We did not perform DNA-DNA hybridization experiments with our strains; thus, we cannot safely conclude that the genotype 1 strains belong to a single species. On the other hand, bacterial strains with DNA-DNA homology values of $<70\%$ and 16S rRNA gene sequence similarity values of $>97\%$ were found in only a few cases (19). In contrast to the strains investigated by Jaspers and Overmann (13), the genotype 1 strains form a homogeneous group in terms of cell morphology, size, pigmentation, colony characteristics, and several other phenotypic traits (data not shown). Furthermore, it is highly unlikely that the few single-nucleotide differences in ITS1 of the genotype 1 strains could be detected by randomly selected restriction enzymes. Thus, the group of strains investigated in our study appears to be a homogeneous group, both in terms of sequence data and in terms of several phenotypic traits. We tentatively concluded that these strains belong to the same species.

Thermal adaptation. Bacterial growth rates increase with temperature up to the optimum temperature, at which the growth rate is maximal. Enzymatic processes are thought to limit further increases in growth rates at temperatures above the optimum temperature. The maximum temperature is reached immediately before an essential enzymatic process is inhibited. Temperature response curves that are shown in textbooks always have a clear peak. In contrast, for three of six strains investigated we observed a plateau-like curve shape (Fig. 2A, B, and D). For these strains the entire range of the plateau or a particular temperature within the range of the plateau could be considered the optimum temperature for growth. For two reasons we argue that the temperature at the onset of the plateau is the ecologically relevant optimum temperature for growth. First, we observed that for strains from temperate zone habitats much larger inoculum volumes were required for successful growth at higher temperatures. The inoculum volumes used for subculturing at lower temperatures ($\leq 30^\circ\text{C}$) frequently did not result in growth after the same

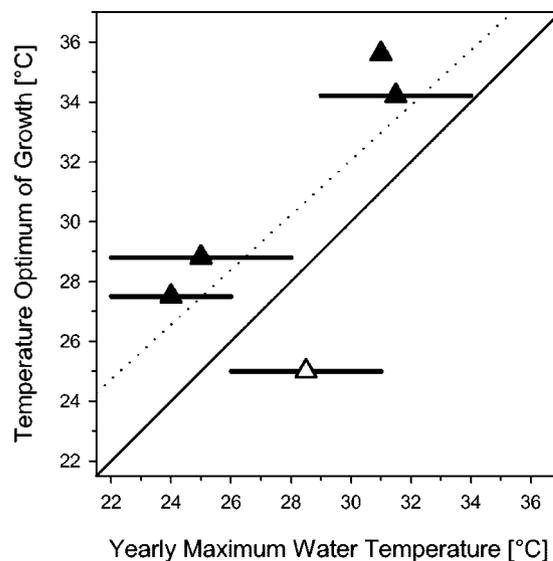


FIG. 5. Yearly maximum water temperatures of habitats plotted versus the optimum temperatures of genotype 1 strains obtained from these habitats. The horizontal bars indicate the ranges of yearly maximum water temperatures observed in different years. The average of the lowest and highest yearly maximum temperatures was plotted versus the optimum temperatures determined (triangles). The dotted line indicates a linear regression of the data plotted. Data for the strain isolated from an artificial pond in Sydney Royal Botanic Gardens are indicated by an open triangle. Water temperature data for several years were not available for ponds in the area of Jinja. Therefore, only the maximum temperature measured by Asiyu (1) in a field study lasting from May to August 2003 is plotted. No water temperature records for the Huqiu pond were available.

temperature-adapted strains were subcultured at higher temperatures ($\geq 32.5^\circ\text{C}$). This clearly indicates that temperatures of $\geq 32.5^\circ\text{C}$ are stressful growth conditions for the strains obtained from temperate habitats. In the case of strains MWH-Aus1 and MWH-Wo1 temperatures of $\geq 32.5^\circ\text{C}$ are well within the plateau ranges of their temperature curves. Stressful growth conditions and thermally optimal growth conditions are in clear conflict. Second, a lack of enhanced growth with further increasing temperature indicated that one or several enzymatic processes were suboptimal, thus reducing the fitness of the organism. This is also in conflict with the assumption that the entire range of a temperature curve plateau represents optimum growth temperatures.

The optimum temperature observed generally corresponded to the highest water temperatures observed or estimated for the home habitats of the strains investigated (Fig. 5). For almost all genotype 1 strains the optimum temperature determined was a few degrees higher than the average yearly maximum water temperature. The only exception, strain MWH-Aus1 from a pond in Sydney Royal Botanic Gardens, had an optimum temperature that was several degrees lower than the average and highest observed annual maximum temperature of its home habitat. This strain was isolated from a shallow artificial pond, which may heat up more than similar large but deeper natural ponds having the same area.

Do some features of the temperature curves of genotype 1 strains reflect the temperature adaptation of a common ancestor? The temperature curves for the six genotype 1

strains are significantly different from each other, and strains from different climatic zones clearly have different optimum temperatures. On the other hand, the temperature response curves of all strain also have some common features. Obviously, all genotype 1 strains are able to grow at a similar temperature range, from at least 5°C to 35 to 37°C. Other Luna2 strains from tropical habitats (MWH-Man1 and MWH-VicE1) still grow at 40°C. Another common feature is that the final, linear decreases in the curves to the maximum temperature are very similar for all strains (Fig. 2). Furthermore, for all strains linear increases in the curves toward the optimum temperature were observed. For all strains these increasing lines have similar slopes; thus, the lines have more or less parallel characteristics. The major differences in the temperature curves are in the middle parts of the curves (Fig. 3). Extension of the linearly increasing parts of the curves toward higher temperatures and extension of the final decreasing lines toward lower temperatures result in lines that have crossing points in a narrow temperature range, 32 to 36°C (Fig. 2). These manipulation for strains MWH-Aus1, MWH-Wo1, MWH-Mo1, and MWH-HuqW11 result in curves which are very similar to the peaked curves for strains MWH-Ta1 and MWH-Uga2. Based on these obvious similarities of the curves, one may speculate on the temperature adaptation of the common ancestor of the strains. The ancestor would have been adapted to thermal conditions in subtropical or tropical habitats (i.e., optimum temperature in the range from 32 to 36°C). After dispersal and population of temperate zone habitats, the ability to grow at temperatures more than 30 to 31°C provided no more selective advantage. Therefore, mutations that affected only growth at these higher temperatures may have accumulated in strains inhabiting temperate habitats.

Evolution of temperature adaptation in *E. coli* was found to be slow (7). After 20,000 generations of growth under constant temperature conditions, only small changes in temperature adaptation were observed. These adaptations were much smaller than the differences in temperature adaptations found in the genotype 1 strains investigated. Under environmental conditions that result in generation times of several hours to a few days, the genotype 1 strains may need more than 10 years for 20,000 generations. Assuming a rate of evolution similar to that observed for *E. coli* under constant environmental conditions, the observed thermal adaptations of the genotype 1 strains may be the result of many decades of evolution. Considering these long time spans, the presence of relicts from the ancestral thermal adaptation is not unlikely.

Thermal niches of the strains investigated. The different genotype 1 strains were isolated from water samples with a broad range of temperatures (Table 2); thus, viable genotype 1 strains were present over a wide range of temperatures. This and the temperature adaptations observed may indicate that the genotype 1 strains are well adapted to the entire range of temperatures that occur in their home habitats. On the other hand, the strains differ in adaptation at higher temperatures (Fig. 2, 4, and 6) and potentially also at lower temperatures (e.g., strains MWH-Aus1 and MWH-Uga2). Obviously, the strains obtained from different climatic zones are adapted to different thermal niches. For instance, strain MWH-Mo1 from temperate Lake Mondsee is expected to be the inferior competitor compared to strain MWH-Ta1 from subtropical Lake

Taihu when both strains are exposed to temperatures that typically occur in Lake Taihu during the hot season. Due to the different thermal adaptations, the strains obtained from different climatic zones have to be considered different ecotypes. These thermal adaptations may hamper the colonization of habitats by invading strains adapted to habitats with different thermal conditions. Local adaptation in combination with competition may limit the successful invasion of freely dispersed microbes and may lead to restricted geographical distributions of free-living microbes inhabiting nonextreme habitats.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Günther Stadler and Doris Hummer (Lenzing, Austria), Bernerd Mulwa Fulanda (Sagana, Kenya), and Godfrey Magezi (Jinja, Uganda) for providing water samples, Qinglong Wu for help during the sampling in the People's Republic of China, Peter Stadler for his technical assistance during the initial part of the project, Yuwei Chen (Nanjing, People's Republic of China) for water temperature data for Lake Taihu, John Coco and Brett Summerell for temperature data for the pond in Sydney Royal Botanic Gardens (Sydney, Australia), and Hans Wiesenegger and Udo Ebner (Hydrographic Service, Salzburg, Austria) for temperature data for Lake Wolfgangsee. Ssanyu Grace Asiyo (Kampala, Uganda) and Hans van Bruggen (Delft, The Netherlands) are acknowledged for their efforts to make temperature data for the pond near Jinja available. Thomas Weisse is acknowledged for providing valuable comments on an earlier version of the manuscript, and Jens Boenigk is acknowledged for help with the statistics.

This study was supported by Austrian Science Fund project P15655 and by the Austrian Academy of Sciences.

REFERENCES

1. Asiyo, S. G. 2003. The phytoplankton primary productivity, biomass and species composition in the Finger Ponds Uganda. M.Sc. Thesis, UNESCO-IHE Delft, The Netherlands.
2. Baas-Becking, L. G. M. 1934. Geobiologie of Inleiding tot de Milieukunde. Van Stockum & Zon, The Hague, The Netherlands.
3. Boenigk, J., P. Stadler, A. Wiedlroither, and M. W. Hahn. 2004. Strain-specific differences in the grazing sensitivity of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster. Appl. Environ. Microbiol. **70**:5787–5793.
4. Boenigk, J., K. Pfandl, P. Stadler, and A. Chatzinotas. Submitted for publication.
5. Bronikowski, A. M., A. F. Bennett, and R. E. Lenski. 2001. Evolutionary adaptation to temperature. VIII. Effects of temperature on growth rate in natural isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from different thermal environments. Evolution **55**:33–40.
6. Cho, J. C., and J. M. Tiedje. 2000. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 5448–5456.
7. Cooper, V. S., A. F. Bennett, and R. E. Lenski. 2001. Evolution of thermal dependence of growth rate of *Escherichia coli* populations during 20,000 generations in a constant environment. Evolution **55**:889–896.
8. Darling, K. F., C. M. Wade, I. A. Stewart, D. Kroon, R. Dingle, and A. J. Brown. 2000. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. Nature **405**:43–47.
9. Finlay, B. J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. Science **296**:1061–1063.
10. Hahn, M. W., H. Lünsdorf, Q. L. Wu, M. Schauer, M. G. Höfle, J. Boenigk, and P. Stadler. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. Appl. Environ. Microbiol. **69**:1442–1451.
11. Hahn, M. W., P. Stadler, Q. L. Wu, and M. Pöckl. 2004. The filtration-acclimatization-method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. J. Microbiol. Methods **57**:379–390.
12. Hahn, M. W. 2003. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. Appl. Environ. Microbiol. **69**:5248–5254.
13. Jaspers, E., and J. Overmann. 2004. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. Appl. Environ. Microbiol. **70**:4831–4839.
14. Kurmayer, R., G. Christiansen, J. Fastner, and T. Börner. 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. Environ. Microbiol. **6**:831–841.

15. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques, p. 115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Bacterial systematics. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
16. Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S RNA sequences for phylogenetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:6955–6958.
17. Papke, R. T., N. B. Ramsing, M. M. Bateson, and D. M. Ward. 2003. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. Environ. Microbiol. **5**:650–659.
18. Rynearson, T. A., and E. V. Armbrust. 2000. DNA fingerprinting reveals extensive genetic diversity in a field population of the centric diatom *Ditylum brightwellii*. Limnol. Oceanogr. **45**:1329–1340.
19. Stackebrandt, E., and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**:846–849.
20. Strunk, O., O. Gross, B. Reichel, M. May, S. Hermann, N. Stuckmann, B. Nonhoff, M. Lenke, A. Ginhart, A. Vilbig, T. Ludwig, A. Bode, K.-H. Schleifer, and W. Ludwig. 1998. ARB: a software environment for sequence data. Department of Microbiology, Technische Universität München, Munich, Germany.
21. Weisse, T., and D. J. S. Montagnes. 1998. Effect of temperature on inter- and intraspecific isolates of *Urotricha* (Prostomatida, Ciliophora). Aquat. Microb. Ecol. **15**:285–291.
22. Weisse, T. 2002. The significance of inter- and intraspecific variation in bacterivorous and herbivorous protists. Antonie Leeuwenhoek **81**:327–341.
23. Weisse, T., N. Karstens, V. C. M. Meyer, L. Janke, S. Lettner, and K. Teichgräber. 2001. Niche separation in common prostome freshwater ciliates: the effect of food and temperature. Aquat. Microb. Ecol. **26**:167–179.
24. Whitaker, R. J., D. W. Grogan, and J. W. Taylor. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic Archaea. Science **301**:976–978.
25. Yu, Z., and W. W. Mohn. 2001. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analyses and 16S ribosomal DNA sequencing. Appl. Environ. Microbiol. **67**:1565–1574.
26. Zwart, G., W. D. Hiorns, B. A. Methé, M. P. Van Agterveld, R. Huismans, S. C. Nold, J. P. Zehr, and H. J. Laanbroek. 1998. Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. Syst. Appl. Microbiol. **21**:546–556.



ELSEVIER

The microbial diversity of inland waters

Martin W Hahn

The conservation and sustainable use of freshwater resources is of global importance. Microorganisms are not only the most abundant organisms in natural freshwater systems, but are also key players in ecological processes controlling water quality. Detailed knowledge of the diversity and function of microorganisms dwelling in freshwater habitats is an essential prerequisite for the sustainable management of freshwater resources. Freshwater systems are inhabited by microbial communities that are indigenous to this habitat type and usually do not occur in marine systems, saline inland waters and terrestrial habitats. Despite recent advances in the characterization of the diversity of freshwater microorganisms, knowledge essential for a holistic understanding of their ecological roles is still lacking.

Addresses

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences,
Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria

Corresponding author: Hahn, Martin W (martin.hahn@oeaw.ac.at)

Current Opinion in Biotechnology 2006, 17:256–261

This review comes from a themed issue on
Environmental biotechnology
Edited by David A Stahl and Michael Wagner

Available online 15th May 2006

0958-1669/\$ – see front matter

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

DOI [10.1016/j.copbio.2006.05.006](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.006)

Introduction

Inland waters, including lakes, ponds, rivers, streams, wetlands and groundwater (water beneath the earth's surface), consist of either freshwater or saline water. Freshwater is water with a salt content (salinity) of less than 1 g L^{-1} , while saline waters are characterized by salinities $>1 \text{ g L}^{-1}$. The saline inland waters are mainly represented by saline ground water systems and saline lakes. The latter include inland seas such as the Caspian Sea and the Dead Sea. Inland waters contain only 0.5% of the total global water and only 20% of the total amount of freshwater (the other 80% are contained in glaciers and polar ice), but comprise almost 100% of the freshwater resources utilized by the human population. Freshwater is an essential element of daily life, as well as an essential resource for many industrial and agricultural processes. Clean and predictable supplies of freshwater drive the economic and ecological systems on which we depend, making the sustainable development of freshwater resources among the most pressing of global challenges today.

Microorganisms, including bacteria, archaea, protists (protozoa and algae) and fungi, numerically and biochemically dominate all inland water habitats. Some of these microorganisms are key players in biogeochemical processes (e.g. the metabolization of dissolved organic carbon or nitrogen cycling) that are crucial processes for entire ecosystems. Furthermore, microorganisms are major players in processes controlling the water quality of inland waters, and they are crucially involved in the fate of pollution released to the environment. Owing to the rapidly increasing importance of the sustainable management of freshwater resources, detailed knowledge on the diversity, specific functions and ecology of microorganisms inhabiting freshwater ecosystems is urgently needed. Obtaining such information was not possible for most aquatic microbes until the 1990s, because the majority of microorganisms lack morphological traits suitable for discriminating species and a large proportion of microorganisms are difficult to cultivate. The advent of molecular techniques opened up new avenues of research on the diversity and function of microorganisms in inland waters. This review summarizes recent advances in this important field of research, and especially highlights the advances in research on bacteria inhabiting inland waters. Important results obtained for other microorganisms dwelling in inland water habitats could not be included because of space constraints.

The discovery of 'typical freshwater bacteria'

Bacteria usually represent $>90\%$ of microorganisms in non-extreme aquatic habitats. In the 1980s, it was believed that bacterial species inhabiting freshwater systems do not differ taxonomically from bacteria inhabiting the surrounding terrestrial environments [1]. Only Gram-positive bacteria (i.e. *Actinobacteria* and *Firmicutes*) were considered to be absent from the water column (pelagic zone) of freshwater habitats. These assumptions were based on cultivation experiments that resulted, on the one hand, in the isolation of the same opportunistic taxa (e.g. *Pseudomonas* spp.) from soil and freshwater samples and, on the other hand, in the isolation of only a few Gram-positive bacteria (*Actinobacteria* and *Firmicutes*) from freshwater sites. The publication of the first investigations on the bacterial diversity of freshwater lakes conducted by cultivation-independent methods radically changed this view [2–5]. An inventory of the bacterial taxa was carried out using direct nucleic acid isolation, followed by the amplification and sequencing of bacterial 16S rRNA genes. Comparing sequences retrieved from freshwater habitats with sequences deposited in public databases enabled the identification of bacterial taxa present in the investigated habitats, or at least the

identification of their closest relatives. Most bacterial sequences retrieved from freshwater habitats were neither affiliated with known bacterial species nor represented those phylogenetic groups previously obtained from freshwater habitats using cultivation methods. Further investigations also demonstrated that freshwater and marine bacterioplankton differ substantially in composition [6,7]. Cultivation-independent investigations showed that, in contradiction to previous assumptions, Gram-positive bacteria are present in freshwater habitats [3,8,9]. In fact, *Actinobacteria* were found to comprise large fractions of bacterioplankton in many freshwater habitats [9] and *Firmicutes* were also detected in some freshwater systems [10]. In a meta-analysis of previously published studies, Zwart and coauthors [11] demonstrated that the majority of bacterial sequences retrieved from freshwater habitats were most closely related to other freshwater clones, whereas relatively few were most closely related to sequences recovered from soil or marine habitats. They concluded from the habitat-specific clustering that most bacteria inhabiting freshwater systems are indigenous to freshwater, and they coined the term 'typical freshwater bacteria' for these organisms [11]. The authors also presented 34 phylogenetic clusters of bacteria representing typical inhabitants of freshwater systems (Table 1). Most of these genus-like clusters did not contain either described species or cultivated representatives [11], and therefore nothing or little is known about the physiology and ecological function of members of these groups.

Ecological factors shaping the composition of bacterial communities

Several studies demonstrated that the bacterial community composition (BCC) of lakes varies temporarily and spatially within habitats [12–15], as well as between habitats [15–18]. Several ecological factors shaping

BCC have been identified so far. Important factors are water chemistry [19,20,21], water temperature [21], metazooplankton predation [22], protistan predation [23,24,25], phytoplankton composition [13], organic matter supply [26], intensity of ultraviolet radiation [27], habitat size [28] and water retention time [21,29]. Although it is well known that these factors shape the overall BCC, little is known about those factors specifically shaping the dynamics of particular populations of freshwater bacteria. Gray *et al.* [30] demonstrated that redox conditions controlled the distribution of *Achromatium* spp. in lake sediments. Schauer *et al.* [31] demonstrated that mainly water chemistry determined which of two closely related vicarious groups of SOL bacteria appeared in particular lakes. Šimek *et al.* [24] demonstrated that populations of the highly competitive R-BT065 bacteria (*Betaproteobacteria*) were strongly controlled by protistan predation. Wu and Hahn [32] revealed, for the first time, the recurrent seasonal population dynamics of planktonic freshwater bacteria. They also demonstrated that much of the dynamics of the investigated *Polynucleobacter* population could be predicted from the water temperature. Despite these recent advances, the prediction of the population dynamics of free-living bacterial species is currently only possible in a few exceptional cases.

Cosmopolitan distribution versus local adaptation

Many groups of typical freshwater bacteria [11] have a cosmopolitan distribution [5,11,33,34] (i.e. they appear in freshwater habitats located all over the world) that includes habitats located in different climatic zones that consequently differ in their environmental conditions. Ecophysiological investigations of closely related *Actinobacteria* strains, isolated from tropical, subtropical and temperate habitats but characterized by identical 16S

Table 1

Examples of typical freshwater bacteria.

Group	Phylum/class	Ecological plasticity	Highest relative abundance ^a	Cultivated strains
ACK-M1 ^b	<i>Actinobacteria</i>	High	<70% ^c	Yes
<i>Polynucleobacter</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	High	60%	Yes
GKS98	<i>Betaproteobacteria</i>	High	5%	Yes
R-BT065 ^d	<i>Betaproteobacteria</i>	nk ^e	50%	No
SOL ^f	<i>Bacteroidetes</i>	High ^g	11% ^h	Yes ⁱ

Zwart and coauthors initially described 34 putative clusters of typical freshwater bacteria [11], additional clusters were then identified [10,31,34,51].

^a Highest relative abundance (expressed as a percentage of total bacterial cell numbers) reported so far.

^b The ACK-M1 cluster is a subgroup of the acl clade [11,35].

^c The acl clade was found to contribute up to 70% of total bacterial numbers in high mountain lakes [35].

^d The R-BT065 cluster is a subgroup of the 'Rhodoferrax' sp. BAL47 cluster [11].

^e nk, not known.

^f The SOL cluster includes the previously described LD2 cluster [11].

^g Pronounced subcluster-specific differences in ecological adaptations were reported [31].

^h The filamentous SOL bacteria contribute disproportionately highly to total bacterial biovolume because of their large cell size. The highest observed contribution to bacterial biovolume was 45% [31].

ⁱ Only mixed cultures could be established.

rRNA genes, revealed a temperature adaptation to local conditions [34]. Members of this cosmopolitan group were therefore not generally adapted to a wide range of thermal conditions, but demonstrated a specific adaptation to local climatic conditions.

Ecological plasticity of groups versus ecological diversity within groups

High ecological plasticity was observed for several groups of typical freshwater bacteria [11,20,21^{*},33,35]. For instance, *Polynucleobacter* bacteria have been detected in acidic, neutral and alkaline habitats located in different climatic zones [33], and ACK-M1 bacteria have been detected in all freshwater habitats investigated for them so far [20,21^{*}] (Wu *et al.*, personal communication). These observations lead to the question of whether all members of such groups have a uniform ecology. Jaspers and Overmann [36^{*}] demonstrated that sympatric *Brevundimonas alba* strains that did not differ in 16S rRNA genes probably occupy separate trophic niches, so these strains probably do not have uniform ecological adaptations. Observed differences in the predation sensitivity of closely related bacteria [37], as well as within-group differences in the salinity adaptation of GKS98 bacteria (Wu *et al.*, personal communication), also indicate that the observed ecological plasticity of at least some groups of typical freshwater bacteria is attributed to ecological diversity within these groups.

The cultivation of freshwater bacteria

New cultivation strategies [38–41] resulted in the isolation and cultivation of a growing number of typical freshwater bacteria. Most of these methods utilized media mimicking the low substrate concentrations typically found in inland waters [39,41,42^{*},43]; it was, however, also demonstrated that an important part of the freshwater bacterioplankton could be acclimatized to substrate-rich media [33,38]. Acclimatization has allowed cultivation on standard agar plates, enabling a more convenient and less laborious maintenance of cultivated strains.

Strains with interesting traits have been found among the strains isolated from freshwater. For instance, aerobic anoxygenic phototrophic *Alphaproteobacteria* characterized by an unusual metabolism [42^{*}] and ultramicrobacterial *Actinobacteria* characterized by very small cell sizes [38] could be cultivated. Furthermore, an entire *Polynucleobacter* population, comprising almost 60% of total bacterioplankton in a humic pond, was successfully cultivated: that is, each ribosomal genotype detected using cultivation-independent methods could be cultured using the acclimatization method [44].

Saline inland waters

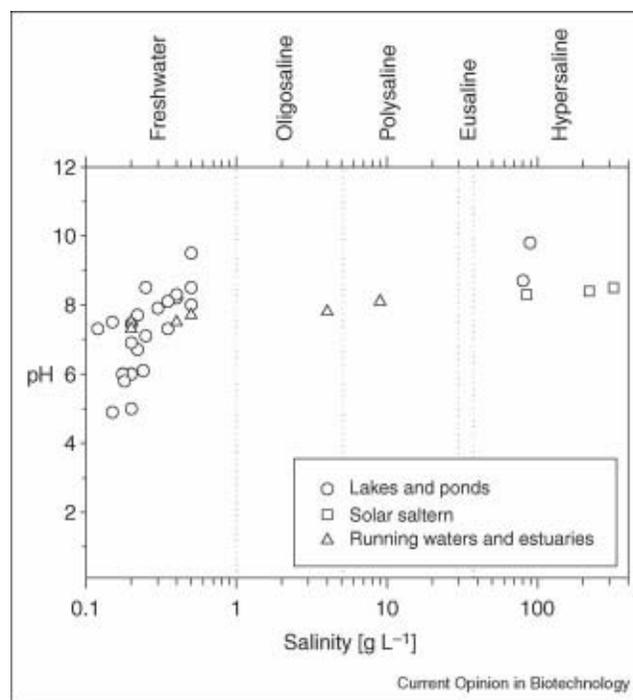
Despite saline lakes constituting 45% of the total water volume of inland waters, the diversity of their microbial inhabitants has received little attention [45–47], whereas

the microbial diversity of dynamic saline systems such as estuaries (e.g. [8,43,48,49]) and man-made solar saltern (e.g. [50]) has been studied more intensively (Figure 1). The currently available data indicate, however, that bacterial communities of freshwater and saline lakes show little taxonomical overlap [45,47] (Wu *et al.*, personal communication), that is, typical freshwater bacteria are absent, or almost absent, from saline inland waters.

Future research on microbial diversity in inland waters

There is a great ecological diversity of inland waters. Even stagnant surface waters (lakes and ponds) alone represent a large ecological diversity of habitats. In comparison with marine habitats, stagnant inland waters vary much more in their water chemistry, hydrological characteristics, productivity and influences from the surrounding terrestrial habitats. The number of investigations to study the microbial diversity of inland waters is far too low, relative to the large number of different types of

Figure 1



Undersampling of saline inland waters in cultivation-independent investigations. Only cultivation-independent investigations, which described the microbial diversity through the analysis of sequences of cloned ribosomal genes, were considered; investigations using other methods (e.g. denaturing gradient gel electrophoresis) or focusing on selected bacterial groups were not considered for this figure. There have been no investigations of oligosaline and polysaline stagnant inland waters. Note that the presented plot reflects only a very small part of the ecological diversity of inland waters. Eusaline inland waters have equivalent salinities to those found in marine systems. In the case of some published investigations, pH or salinity values were not reported and therefore had to be estimated for the purpose of this schematic figure.

inland waters, to even provide an overview of the microbial diversity in these habitats (Figure 1). Therefore, it has to be assumed that many microbial inhabitants of inland waters are so far undiscovered. Because most investigations focused on the diversity of planktonic bacteria, knowledge on the diversity of Archaea, sediment-dwelling bacteria, biofilm-forming microorganisms, and those eukaryotic microorganisms that cannot be studied using morphological approaches is scarcer than for the planktonic bacteria. Even for planktonic bacteria, however, one has to assume that the relatively small number of investigations mainly resulted in the discovery of those bacterial groups characterized by broad ecological plasticities. More investigations covering a broader range of habitats will result in the discovery of more specialized groups of bacteria that only occur in limited ranges of habitat types or only appear during temporarily limited situations. Recent investigations demonstrated that increased sampling efforts resulted in the discovery of bacterial groups and genotypes previously not found in freshwater habitats [10⁶,51⁶].

In contrast to surface freshwater habitats, the microbial diversity in groundwater has received little attention (e.g. [52⁶]). Currently, it is not known whether the microbial communities inhabiting surface and subsurface inland waters show a significant compositional overlap. The lack of knowledge of groundwater habitats is in contrast to the importance of groundwater in drinking-water production.

Conclusions

Our knowledge of the microbial diversity in inland waters and especially in freshwater habitats has changed fundamentally over the past ten years. It was demonstrated that freshwater and saline inland waters are each populated by indigenous bacterial communities that almost completely lack overlap and do not have a significant compositional overlap with communities of terrestrial and marine habitats. Major bacterial players in freshwater were identified, their ecological plasticity characterized, and some representatives have even been brought into culture. Almost nothing is known, however, about the ecological function of these important groups of freshwater bacteria. Despite the availability of a growing number of cultures, only a handful of freshwater isolates have been considered for genome sequencing projects, and only a single strain out of the groups of typical freshwater bacteria is currently being subjected to genome sequencing. The lack of genomic insight into the metabolic capacities of abundant freshwater bacteria is one of the reasons for the very limited functional insight into bacterial communities of freshwater habitats.

The current knowledge of the diversity and function of microorganisms in freshwater habitats is insufficient for the sustainable management of freshwater resources. In particular, the diversity of non-bacterial microorganisms

and the diversity–function relationship of bacterial communities have to be addressed by future investigations.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Rheinheimer G: *Aquatic Microbiology*. 2nd Edn. New York: Wiley; 1980.
2. Bahr M, Hobbie JE, Sogin ML: **Bacterial diversity in an Arctic lake: a freshwater SAR11 cluster**. *Aquat Microb Ecol* 1996, **11**:271-277.
3. Hiorns WD, Methé BA, Nierzwickbauer SA, Zehr JP: **Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences**. *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**:2957-2960.
4. Semenova EA, Kuznedelov KD: **A study of the biodiversity of Baikal picoplankton by comparative analysis of 16S rRNA gene 5'-terminal regions**. *Mol Biol* 1998, **32**:754-760.
5. Zwart G, Hiorns WD, Methé BA, Van Agterveld MP, Huismans R, Nold SC, Zehr JP, Laanbroek HJ: **Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria**. *Syst Appl Microbiol* 1998, **21**:546-556.
6. Methé BA, Hiorns WD, Zehr JP: **Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition: analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes**. *Limnol Oceanogr* 1998, **43**:368-374.
7. Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R: **Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization**. *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:3721-3726.
8. Crump BC, Armbrust EV, Baross JA: **Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean**. *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:3192-3204.
9. Glöckner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R: **Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of *Actinobacteria***. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:5053-5065.
10. Eiler A, Bertilsson S: **Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes**. *Environ Microbiol* 2004, **6**:1228-1243.
- The authors report the analysis of 1461 cloned 16S rRNA gene sequences, which is the largest number of clones analysed so far in a study dealing with freshwater bacteria. Novel clusters of freshwater bacteria were discovered, indicating that the diversity of freshwater bacteria is still not completely revealed.
11. Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, Hagen F, Han S-K: **Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers**. *Aquat Microb Ecol* 2002, **28**:141-155.
12. Lindström ES: **Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake**. *FEMS Microbiol Ecol* 1998, **27**:163-174.
13. Höfle MG, Haas H, Dominik K: **Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis**. *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:3164-3174.
14. Dominik K, Höfle MG: **Changes in bacterioplankton community structure and activity with depth in a eutrophic lake as revealed by 5S rRNA analysis**. *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:3606-3613.
15. Yannarell AC, Triplett EW: **Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities:**

- Investigations using multiple spatial scales.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:214-223.
16. Lindström ES: **Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content.** *Microb Ecol* 2000, **40**:104-113.
 17. Lindström ES: **Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes.** *Microb Ecol* 2001, **42**:598-605.
 18. Wu QL, Hahn MW: **Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake revealed at three phylogenetic levels.** *FEMS Microb Ecol* 2006. in press 10.1111/j.1574-6941.2006.00105.x.
 19. Methé BA, Zehr JP: **Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect lake water chemistry?** *Hydrobiologia* 1999, **401**:77-96.
 20. Zwart G, van Hannen EJ, Kamst-van Agterveld MP, van der Gucht K, Lindström ES, Van Wichelen J, Lauridsen T, Crump BC, Han S-K, Declerck S: **Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:5875-5883.
 21. Lindström ES, Kamst-Van Agterveld MP, Zwart G: **Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:8201-8206.
- The authors determined the distribution of 15 typical freshwater bacterial groups in 15 diverse lakes, and analysed statistically the environmental factors controlling the distributions. Pronounced taxa-specific differences in environmental control of distribution were revealed.
22. Langenheder S, Jürgens K: **Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation.** *Limnol Oceanogr* 2001, **46**:121-134.
 23. Šimek K, Pernthaler J, Weinbauer MG, Hornák K, Dolan JR, Nedoma J, Masín M, Amann R: **Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:2723-2733.
 24. Šimek K, Hornák K, Jezbera J, Masín M, Nedoma J, Gasol JM, Schauer M: **Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster of β -Proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:2381-2390.
- The authors analysed experimentally how resource-related (bottom-up) and predation-related (top-down) factors influence the population of a small group of *Betaproteobacteria*. The experimental approach chosen by the authors allowed the analyses of these influences under near *in situ* conditions.
25. Jezbera J, Hornák K, Šimek K: **Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence *in situ* hybridization.** *FEMS Microb Ecol* 2005, **52**:351-363.
- The authors demonstrated for the first time that *Actinobacteria* inhabiting the pelagic of freshwater habitats are much less sensitive to flagellate predation than other bacterial groups. Previously, this property had only been demonstrated for only two strains of cultured freshwater *Actinobacteria*.
26. Crump BC, Kling GW, Bahr M, Hobbie JE: **Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:2253-2268.
 27. Warnecke F, Sommaruga R, Sekar R, Hofer JS, Pernthaler J: **Abundances, identity, and growth state of *Actinobacteria* in mountain lakes of different UV transparency.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:5551-5559.
 28. Reche I, Pulido-Villena E, Morales-Baquero R, Casamayor EO: **Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness?** *Ecology* 2005, **86**:1715-1722.
- The authors demonstrated for the first time the influence of habitat size on the species richness of bacterioplankton communities.
29. Lindström ES, Forslund M, Algesten G, Bergström AK: **External control of bacterial community structure in lakes.** *Limnol Oceanogr* 2006, **51**:339-342.
- This study revealed that the structure of bacterial communities in lakes with water retention times <200 days is strongly influenced by external (i.e. catchment related) factors.
30. Gray ND, Comaskey D, Miskin IP, Pickup RW, Suzuki K, Head IM: **Adaptation of sympatric *Achromatium* spp. to different redox conditions as a mechanism for coexistence of functionally similar sulphur bacteria.** *Environ Microbiol* 2004, **6**:669-677.
 31. Schauer M, Kamenik C, Hahn MW: **Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, *Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*).** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:5900-5907.
 32. Wu QL, Hahn MW: **High predictability of the seasonal dynamics of a species-like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake.** *Environ Microbiol* 2006: in press.
 33. Hahn MW: **Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:5248-5254.
 34. Hahn MW, Pöckl M: **Ecotypes of planktonic *Actinobacteria* with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:766-773.
 35. Warnecke F, Amann R, Pernthaler J: **Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages.** *Environ Microbiol* 2004, **6**:242-253.
 36. Jaspers E, Overmann J: **Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiology.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:4831-4839.
- This paper highlights ecologically relevant ecophysiological differences in bacterial strains that cannot be discriminated by their 16S rRNA gene sequences. This work demonstrates the limited ecological resolution of ribosomal sequences, which are frequently used in ecological studies to group uncultured bacteria into taxa.
37. Boenigk J, Stadler P, Wiedroither A, Hahn MW: **Strain-specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:5787-5793.
 38. Hahn MW, Lünsdorf H, Wu QL, Schauer M, Höfle MG, Boenigk J, Stadler P: **Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:1442-1451.
 39. Bruns A, Nübel U, Cypionka H, Overmann J: **Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:1980-1989.
 40. Crosbie ND, Pöckl M, Weisse T: **Dispersal and phylogenetic diversity of non-marine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA* - intergenic spacer sequence analyses.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:5716-5721.
 41. Page KA, Connon SA, Giovannoni SJ: **Representative freshwater bacterioplankton isolated from Crater Lake Oregon.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:6542-6550.
 42. Gich F, Schubert K, Bruns A, Hoffelner H, Overmann J: **Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:5908-5919.
- The authors presented the first pure culture isolate affiliated with the actinobacterial *acl* clade. The environmentally important ACK-M1 cluster [11] is a subgroup of the *acl* clade.
43. Selje N, Brinkhoff T, Simon M: **Detection of abundant bacteria in the Weser estuary by culture-dependent and culture independent approaches.** *Aquat Microb Ecol* 2005, **39**:17-34.
 44. Hahn MW, Pöckl M, Wu QL: **Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:4539-4547.

45. Humayoun SB, Bano N, Hollibaugh JT: **Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:1030-1042.
46. Demergasso C, Casamayor EO, Chong G, Galleguillos P, Escudero L, Pedrós-Alió C: **Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile.** *FEMS Microbiol Ecol* 2004, **48**:57-69.
47. Donachie SP, Hou S, Lee K-S, Riley CW, Pikina A, Belisle C, Kempe S, Gregory TS, Bossuyt A, Boerema J *et al.*: **The Hawaiian Archipelago: A microbial diversity hotspot.** *Microb Ecol* 2004, **48**:509-520.
48. Crump BC, Hopkinson CS, Sogin ML, Hobbie JE: **Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:1494-1505.
49. Kirchman DL, Dittel AI, Malmstrom RR, Cottrell MT: **Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary.** *Limnol Oceanogr* 2005, **50**:1697-1706.
50. Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Øvreas L, Diez B, Goddard V, Gasol JM, Joint I, Rodríguez-Valera F, Pedros-Alió C: **Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multi-pond solar saltern.** *Environ Microbiol* 2002, **4**:338-348.
51. Crump BC, Hobbie JE: **Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers.** *Limnol Oceanogr* 2005, **50**:1718-1729.
 This paper demonstrated the highly synchronous seasonal development of bacterial communities in two nonintersecting rivers located in the same area. This observation indicates strong external control of the bacterial community composition in these running waters.
52. Miyoshi T, Iwatsuki T, Naganuma T: **Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0-2-micrometer-pore-size filters.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:1084-1088.
 This paper represents one of a few studies that investigated the general bacterial diversity in groundwater (most other studies focused on the diversity of selected bacterial groups). Only a small overlap between the groundwater community and surface freshwater communities was observed.

CHAPTER 11

PLANKTONIC BACTERIA IN CHINESE AND EUROPEAN LAKES: ARE THEY DIFFERENT?

Martin W. Hahn¹ and Qinglong L. Wu²

¹ Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestrasse 9A-5310 Mondsee, Austria

² Chinese Academy of Sciences, Nanjing Institute of Geography & Limnology, 73 East Beijing Road, Nanjing 210008, People's Republic of China

INTRODUCTION

Environmental microbiologists frequently investigate organisms, which do not represent validly described species. Many of these organisms were never cultivated, others were cultivated but not yet taxonomically described. Due to the lack of a suitable taxonomic framework environmental microbiologists usually assigned organisms to operational taxonomic units (OTUs) or to phylogenetically defined taxa. In almost all cases, such assignments were based on sequence information obtained by cultivation-independent methods from environmental samples or by sequencing of cultivated organisms. Frequently, partial or almost complete sequences of 16S rRNA genes (small subunit rRNA genes) were used for this purpose. OTUs were frequently defined by 97% sequence similarity thresholds, but some authors also used 98% or 99% similarity thresholds. Recently, Zwart et al. (2002) established a phylogenetic framework for classification of bacteria inhabiting the pelagic zone of freshwater habitats. This framework consists of several phylogenetically defined groups of bacteria, which were frequently detected in freshwater lakes and rivers (typical freshwater bacteria). The majority of these taxa do not contain validly described species.

OTUs as well as phylogenetically defined taxa consist of members slightly (or even strongly) differing in genetic traits. This microdiversity within such taxa is reflected by sequence polymorphisms of 16S rRNA genes of strains affiliated with the taxon (Fig. 1). However, more pronounced genetic differences between strains of such a taxon have to be expected in other parts of the genome, which do not encode highly conserved ribosomal RNA. Such differences may include polymorphism in amino acid sequences of encoded proteins, or even the absence of entire genes or the presence of additional genes.

Currently, only little is known about the genetic and ecological variability among members of microdiverse taxa. Therefore, it is unknown if all members of such a taxon share important ecological traits. It is not known if all members occupy the same or at

least similar ecological niches, or if members of such a taxon may occupy completely separated ecological niches. However, such knowledge is required if one ones to conclude from the affiliation of a strain to a certain OUT or species-like (narrow) phylogenetic cluster on ecological traits of the strain.

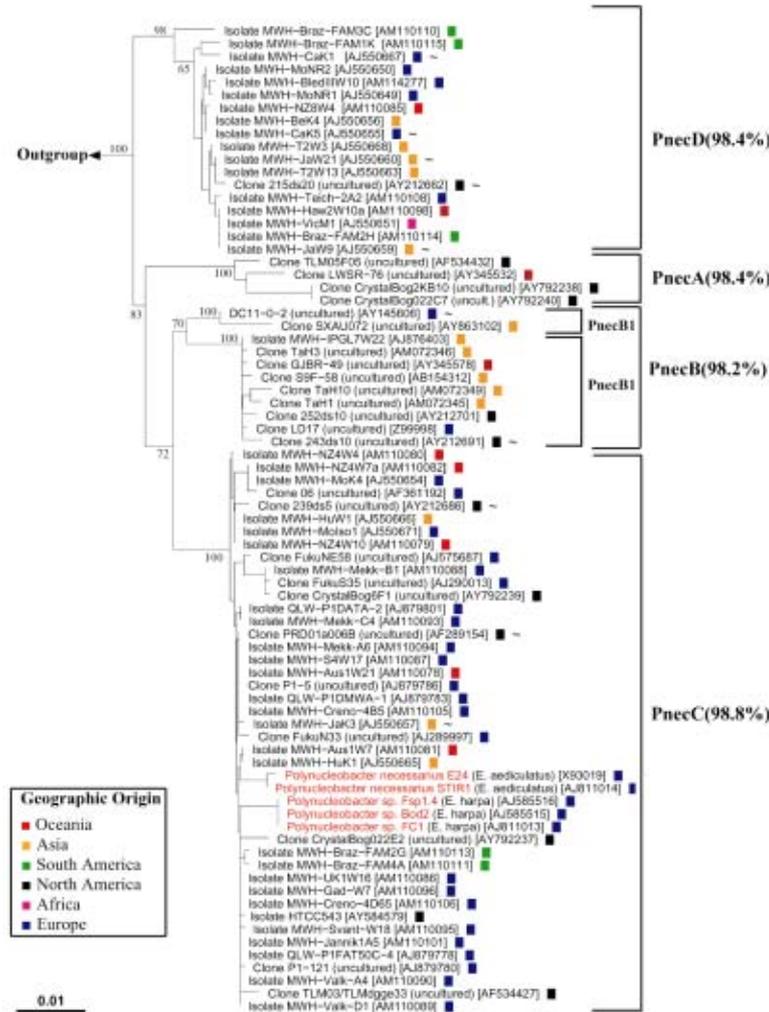


Fig. 1 The phylogenetically defined *Polynucleobacter* cluster. The tree was calculated with almost complete 16S rRNA sequences. The *Polynucleobacter* cluster represents a monophyletic group of *Betaproteobacteria*. The cluster consists of four species-like subclusters (PnecA, PnecB, PnecC, and PnecD), which are characterized by sequence similarities > 98%.

We repeatedly observed that Chinese and European lakes are inhabited by planktonic bacteria affiliated with the same taxon (e.g. *Polynucleobacter* subcluster C; Fig. 1). We investigated if closely related strains isolated from habitats in Austria (temperate

climate), China (subtropical climate), Uganda (tropical climate) and Australia (temperate climate) share the same thermal adaptation, or if they are specifically adapted to the thermal conditions in the region of their origin. Furthermore, we investigated the biogeography and ecophysiological adaptations of a genome-sequenced *Polynucleobacter* strain.

THERMAL ADAPTATION OF ACTINOBACTERIAL STRAINS WITH IDENTICAL 16S RRNA SEQUENCES

We isolated seven actinobacterial strains affiliated with the Luna-2 cluster, which share identical 16S rRNA genes and differed in 0 to 4 nucleotide positions of their 16S-23S ITS sequences (Hahn and Pöckl, 2005) (Fig. 2). The thermal adaptation of six strains was investigated in laboratory experiments. All strains differed significantly in their thermal adaptation (optimum and maximum temperature, increase of growth rate with temperature). Strains isolated from habitats located in temperate climatic zones (north and south hemisphere) showed lowest temperature optima, strains from the subtropical zone showed intermediate, and the strain isolated from a tropical habitat possessed the highest temperature optimum (Fig. 2). The optimal growth temperature of most of the strains was slightly higher than the maximum water temperature reported for their home habitats or other habitats in the same region. These findings demonstrate that strains affiliated to the same species-like phylogenetic group may differ significantly in important ecological strains. The investigated actinobacterial strains were thermally well adapted

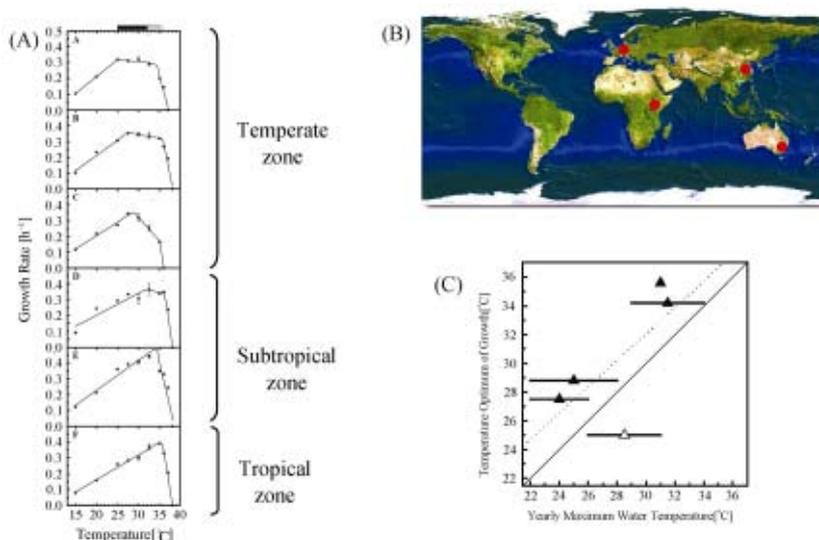


Fig. 2. Thermal adaptation of actinobacterial strains with identical 16S rRNA genes isolated from habitats located in different climatic zones. (A) Growth rates of strains incubated in NSY medium at different temperatures. (B) Geographic location of the home habitats of the strains. (C) Relationship between temperature optimum of growth of the strains and maximum water temperature reported from the respective home habitats of the strains. (Hahn and Pöckl, 2005)

to the conditions in their respective home habitats. Obviously, these strains occupy at least partially separated ecological niches. The observed differences in thermal adaptations indicate local adaptation of strains, and clearly demonstrate ecophysiological differences between closely related strains inhabiting Chinese and European habitats.

BIOGEOGRAPHY AND ECOPHYSIOLOGICAL ADAPTATION OF A GENOME-SEQUENCED *POLYNUCLEOBACTER* STRAIN

Subcluster C (PnecC) of the *Polynucleobacter* cluster (Fig. 1) is a cosmopolitan bacterial group with a ubiquitous distribution in stagnant freshwater habitats (lakes and ponds) and large rivers (Hahn, 2003; Wu and Hahn, 2006a). Strains affiliated with this species-like taxon (>98% 16S rRNA similarity) were detected in all climatic zones, in lowland and high mountain lakes (> 5000 m altitude), in acidic and alkaline habitats. PnecC bacteria were detected by cultivation-independent methods in many freshwater habitats, and recent quantitative investigations demonstrated that this small phylogenetic group could contribute up to 60% of bacterioplankton cells (Hahn et al., 2005). Furthermore, strains completely differing in lifestyle are affiliated to this subcluster. This taxon encompasses obligate endosymbionts of ciliates, as well as obligately free-living planktonic strains (Vannini et al., 2006). While the fundamental differences between endosymbiotic and free-living strains were demonstrated, it is currently not known if there are significant differences in ecological traits among the free-living strains affiliated to subcluster PnecC.

We designed genotype-specific PCR primers specific for the genome-sequenced PnecC strain QLW-P1DMWA-1. The primers predominantly target spacer sequences flanking short genes. The genotype specificity of the primers was demonstrated by using a set of 28 reference strains also affiliated with subcluster PnecC. Sixty-six freshwater habitats including alkaline and acidic lakes or ponds were investigated for the presence of the genome-sequenced genotype (genotype 1). In all 66 habitats PnecC bacteria could be detected by subcluster-specific PCR primers, and 22 habitats (33% of habitats) were positive for genotype 1. All habitats colonized by genotype 1 are acidic small ponds with high concentrations of humic substances and low conductivity. These dystrophic habitats differ significantly in the mentioned parameters from the majority of the investigated habitats. Thus, the detection results indicate a habitat-specific distribution of genotype 1 in the investigated area. In order to test this hypothesis, we investigated if PnecC strains isolated from habitats of different limnological characteristics (dystrophic ponds and alkaline hardwater lakes) were able to grow in sterile water obtained from this different habitat types. We observed that strains from dystrophic habitats sustainably grew in sterile water from dystrophic habitat but failed to grow in water from the second habitat type, while strains from hardwater lakes showed the opposite response. We conclude that the investigated PnecC strains possess habitat-specific adaptations, and that the distribution of the genome-sequenced strain within the investigated area was restricted by the availability of suitable habitats. Thus, single strains affiliated with *Polynucleobacter* subclus-

ter PnecC do not possess generalistic adaptations enabling the colonization of a broad range of habitat types.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Cosmopolitan distributions were reported for several narrow phylogenetic groups of free-living bacteria. For instance the species-like subcluster C (PnecC) of the *Polynucleobacter* cluster (β -*Proteobacteria*), which is characterized by a maximal divergence of 16S rRNA gene sequences of 1.2%, was detected in freshwater habitats located all over the world. The revealed distribution includes all continents and all climatic zones. Furthermore, this species-like group of bacteria inhabits an ecologically broad diversity of freshwater habitats ranging from acidic to alkaline, from lowland to high-mountain lakes (up to 5000 meters altitude), and from oligotrophic to hypertrophic lakes. Besides the ubiquitous presence in stagnant freshwater habitats, this species-like group of bacteria harbours strains completely differing in lifestyle. One group of strains live as free-living organisms in the water column of lakes, ponds and streams, while the other group of strains lives as endosymbionts in ciliates affiliated with the genus *Euplotes*. Such a geographically and ecologically wide distribution of phylogenetically narrow groups of free-living bacteria could either be explained by a generalistic adaptation of strains or by an ecological diversification within the group. In the first case, all occupied habitats would harbor similarly adapted genotypes, while in the second case strains occupying environmentally differing habitats (e.g., differing in pH, thermal conditions, etc.) should significantly differ in ecophysiological adaptations.

We isolated closely related bacterial strains from freshwater habitats located all over the world, and investigated if these strains differ in ecophysiological and genetic traits. We observed pronounced differences in ecophysiology, e.g. in thermal adaptation, which demonstrated habitat- or region-specific adaptations of strains. On the other hand, analyses of ribosomal markers (16S rRNA genes and 16S-23S ITS sequences) did not reveal phylogeographic pattern. Phylogenetic comparisons of less conserved markers are necessary for revealing potential biogeographic or habitat-specific differences within cosmopolitan, species-like groups of bacteria. In the case of the groups investigated so far, the cosmopolitan distribution seems to result from intra-group diversification and not from generalistic adaptations of the group members.

The two presented examples demonstrated niche separation among strains within the two investigated species-like groups of freshwater bacteria, respectively. In the case of the two investigated bacterial groups, the cosmopolitan and ubiquitous distribution resulted from within-group ecological diversification and not from generalistic adaptations of strains. In consequence, it has to be assumed that Chinese and European freshwater habitats are inhabited by differently adapted strains (local and habitat-specific adaptation).

REFERENCES

Hahn MW. 2003. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* clus-

- ter from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl Environ Microbiol*, 69: 5248–5254.
- Hahn MW and Pöckl M. 2005. Ecotypes of planktonic *Actinobacteria* with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats. *Appl Environ Microbiol*, 71: 766–773.
- Hahn MW, Pöckl M, Wu QL. 2005. Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Appl Environ Microbiol*, 71: 4539–4547.
- Vannini C, Pöckl M, Petroni G, et al. 2007. Endosymbiosis in statu nascendi: Close phylogenetic relationship between obligately endosymbiotic and obligately free-living *Polynucleobacter* strains (*Betaproteobacteria*). *Environ Microbiol*, 9: 347–359.
- Wu QL and Hahn MW. 2006a. Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microbiol Ecol*, 57: 67–79.
- Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP Hagen F, et al. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol*, 28: 141–155.

Regular paper

Application of fast repetition rate fluorometry to phytoplankton photosynthetic parameters in freshwaters

Christina Kaiblinger* & Martin T. Dokulil

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria;

**Author for correspondence (e-mail: christina.kaiblinger@oeaw.ac.at; fax: +43-6232-3578)*

Received 23 May 2005; accepted in revised form 29 August 2005

Key words: freshwater, FRRF, photosynthesis, primary productivity, quantum yield of fluorescence, seasonality, thermal stratification

Abstract

Fast repetition rate fluorometry (FRRF) was successfully applied to various studies in modern oceanography. In this study, for the first time, the seasonality of phytoplankton photosynthetic parameters in a deep alpine lake was observed using FRRF in combination with the traditional ^{14}C incubation technique. Special attention was given to the differences in photosynthetic behaviour during mixed and stratified conditions, characterised especially during summer by a deep chlorophyll maximum (DCM) dominated by the filamentous cyanobacterial species *Planktothrix rubescens*. Maximum light-utilisation efficiency ($\alpha^*_{14\text{C}}$) was in the range of $0.01\text{--}0.03 \text{ mgC (mg Chl-}a\text{)}^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol phot. m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$, while maximum quantum yields for carbon fixation ($\Phi_{\text{C,max}}$) varied from $0.01\text{--}0.07 \text{ molC (mol phot.)}^{-1}$. Higher values occurred during thermal stratification indicating acclimation of the phytoplankton assemblage. These findings were supported by FRRF-based estimates, although cyanobacterial blooms could not be characterised by FRRF-excitation due to methodological deficiencies. In general, however, instantaneous photosynthetic rates measured by FRRF-excitation correlate well at sub-saturating light-intensities with conventional ^{14}C -uptake rates, although they operate on different time-scales.

Introduction

Photosynthetic parameters of phytoplankton in freshwaters are commonly derived from well established methods. *In situ* incubation techniques usually use either changes in oxygen concentration or the incorporation of radiocarbon into particulate matter, the latter being a method which is especially suitable under oligotrophic conditions. However robust these methods are, they suffer from shortcomings like isolating natural phytoplankton assemblages in bottles (Eppley 1980) or the differentiation between net and gross photosynthesis (Bender et al. 1987). Their main deficiency is that instantaneous photosynthetic rates of phytoplankton assemblages cannot be acquired.

In modern oceanography active fluorescence methods, in particular fast repetition rate fluorometry (FRRF, Kolber et al. 1998), were applied to various studies. FRRF offers the possibility to obtain non-destructive, real time and *in situ* estimates of photosynthetic parameters (Falkowski 1995). The technique was used to assess the response of marine phytoplankton to iron enrichment (Greene et al. 1994; Kolber et al. 1994; Behrenfeld et al. 1996; Behrenfeld and Kolber 1999), to study the spatial and temporal distribution (Strutton et al. 1997) as well as photosynthetic characteristics of phytoplankton (Olson et al. 1996; Suggett et al. 2001; McMinn and Hegseth 2004). Aside from measurements of phytoplankton assemblages, FRRF was applied to estimate

cyanobacterial photosynthetic rates (Raateoja et al. 2004a, b) and changes of chlorophyll fluorescence yields of reef corals (Gorbunov et al. 2000; Lesser and Gorbunov 2001; Table 1)

In this study we tested the applicability of FRRF to oligotrophic freshwater systems. This technique is relatively novel to freshwaters, and measurements covering the seasonality of an annual cycle in a temperate deep holomictic lake have not been performed so far. Special attention was given to the differences in photosynthetic behaviour during mixed conditions, where phytoplankton is homogeneously distributed in the water column, and stratified conditions during summer,

when a deep chlorophyll maximum (DCM), mainly composed of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*, occurs at a depth of 10–12 m.

We hypothesise that the physiological performance of phytoplankton, expressed by instantaneous rates of phytoplankton photosynthesis varies (1) depending on mixing conditions which govern nutrient and light availability, and (2) seasonally with species composition. Additionally, the more traditional ^{14}C incubation technique (Steeman-Nielsen 1952) was used to validate fluorescence-derived primary productivity rates, since this technique has been routinely used for more than 20 years on Mondsee. We expect

Table 1. Notation

Parameter	Definition	Unit
FRRF		
F_0, F_m	Minimal and maximal <i>in vivo</i> fluorescence yields measured in dark adapted state	Arbitrary
F'_0, F', F'_m	Minimal, steady state and maximal <i>in vivo</i> fluorescence under ambient light	
F_v, F'_v	Variable fluorescence ($F_v = F_m - F_0$) in dark adapted and light adapted state	Dimensionless
$(F_v/F_m, F'_v/F'_m)$	Maximum quantum yield of photochemistry ($\Delta\Phi_m/\Delta\Phi'_m$) in dark adapted and light adapted state	Dimensionless
σ_{PSII}	Functional absorption cross-section of PS II	$\text{m}^2 \text{ quanta}^{-1}, \text{\AA} \text{ quanta}^{-1}$
q_p	Photochemical quenching; the fraction of open reaction centres under ambient photon flux	Dimensionless (0–1)
f	Fraction of potentially open reaction-centres in dark = $[(F_v/F_m)/0.65]$	Dimensionless (0–1)
η_{PSII}	Ratio of PS II reaction centres to Chl- <i>a</i> (1/500)	$\text{mol electrons} (\text{mol Chl-}a)^{-1}$
α^*_{FRRF}	Maximum light-utilisation coefficient based on FRRF-measurements	$\text{mgC} (\text{mg Chl-}a)^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol phot. m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$
E	Irradiance, ambient light at a distinct depth	$\mu\text{Einst m}^{-2} \text{ s}^{-1}, \mu\text{mol phot. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
M_C/M_{Chla}	Molecular masses of carbon and Chl- <i>a</i>	
^{14}C		
a^*	Chl- <i>a</i> specific absorption cross section	$\text{m}^2 (\text{mg Chl-}a)^{-1}$
$P^*_{^{14}\text{C}}$	Phytoplankton productivity based on ^{14}C -estimates normalised to Chl- <i>a</i>	$\text{mgC} (\text{mg Chl-}a)^{-1} \text{ h}^{-1}$
P^*_{max}	Maximum photosynthetic rate	$\text{mgC} (\text{mg Chl-}a)^{-1} \text{ h}^{-1}$
E_k	Light saturation parameter = $(P^*_{\text{max}}/\alpha^*)$	$\mu\text{Einst m}^{-2} \text{ s}^{-1}, \mu\text{mol phot. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
$\alpha^*_{^{14}\text{C}}$	Maximum light-utilisation coefficient based on ^{14}C -estimates	$\text{mgC} (\text{mg Chl-}a)^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol phot. m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$
$\Phi_{\text{C,max}}$	Maximum quantum yield of carbon fixation = (α^*/a^*)	$\text{molC} (\text{mol phot.})^{-1}$
Physicochemistry		
SRP	Soluble reactive phosphorus (orthophosphate)	$\mu\text{g l}^{-1}$
DIC	Dissolved inorganic carbon	$\mu\text{g l}^{-1}$
Z_{eu}	Euphotic zone (1% light)	m
Z_{mix}	Mixing depth	m
$Z_{\text{mix}}/Z_{\text{eu}}$	Mixing – light correlative	Dimensionless

that the parameters derived from instantaneous rates deviate more during stratification from parameters calculated from conventional ‘long-term’ ^{14}C incubations due to the presence of cyanobacteria, than during mixed conditions, as also reported in marine systems (Suggett et al. 2001; Raateoja et al. 2004a, b).

Materials and methods

Vertical profiles of active fluorescence were acquired with a commercial Fast Repetition Rate (FRR) – Fluorometer (Fast^{track}, Chelsea Instruments) from April 2003 to December 2004 in a deep alpine lake, Mondsee, Austria for the top 20 m (Figure 1). Baseline, scatter and reference calibration were carried out following the user manual, the instrument response function was calibrated for gain 0, 1, 4 and 16. Blanks were determined for the light and the dark chamber using GF/C filtered lake water. The acquisition protocol was set to provide 100 saturation flashes per sequence with a saturation flash duration of approximately 1.5 μs , spaced 15 μs apart, followed by 20 relaxation flashes ($\sim 1.1 \mu\text{s}$ duration), 80 μs apart. The sleeptime

between acquisition pairs was set to 50 ms. On each sampling tour, three vertical profiles were taken lasting in total 1.5–2 h. Data were quality controlled by deleting values of the instrument gain > 16 , depth < 0 and photosynthetic active radiation (PAR) > 200 . The controlled data were smoothed using a median filter and aggregated over fixed 0.5 m intervals. The initial fluorescence (F_0), the maximum fluorescence (F_m) and the functional absorption cross section of PS II (σ_{PSII}) were derived using the biophysical model of Kolber et al. (1998). The quantum efficiency of PS II was calculated from variable fluorescence ($F_v = F_m - F_0$) normalised to F_m , indicating the proportion of functional PS II reaction centres (Geider et al. 1993; Kolber and Falkowski 1993). Fluorescence-based productivity was calculated following the model of Kolber and Falkowski (1993) which qualitatively predicts photosynthetic rates from changes in the quantum yield of fluorescence:

$$P_{\text{FRRF}} = E\sigma_{\text{PSII}}q_p f\eta_{\text{PSII}}(3600/4)M_c/M_{\text{Chla}}A \quad (1)$$

where A is a factor containing the conversion-factors from quanta to mol photons for irradiance, and m^2 to \AA for σ_{PSII} . The term (3600/4) stands for

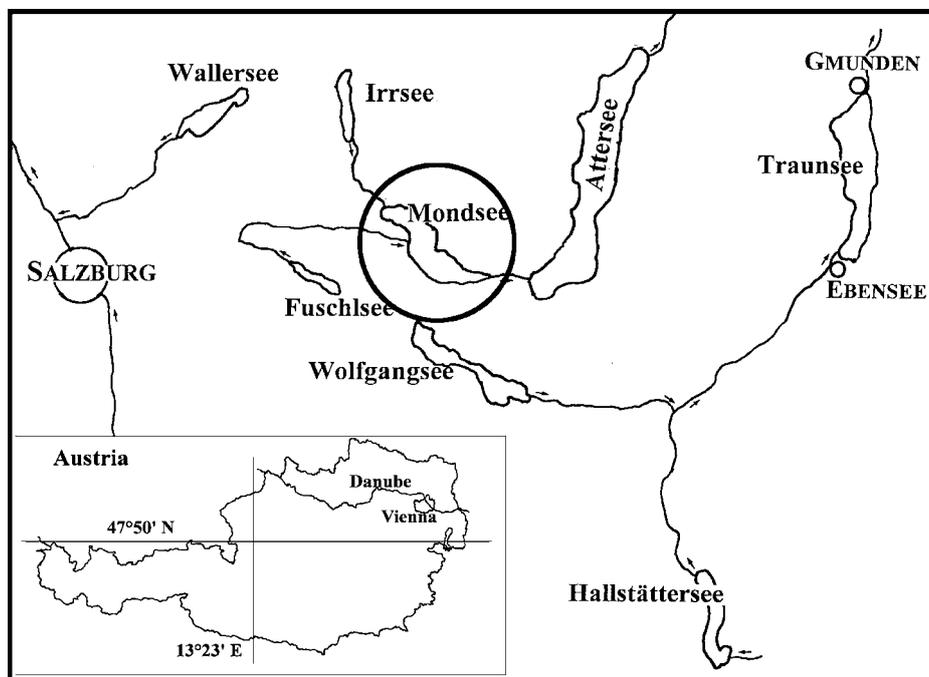


Figure 1. Location of Mondsee in the Salzkammergut lake-district. The insert indicates the position of the Salzkammergut in Austria, given by latitude and longitude.

the calculation from seconds to hours (3600), and 4 electrons, which are required to fix 1 molecule of carbon (1/4).

The maximum light-utilisation coefficient α (Equation (2)) was directly derived by re-arranging Equation (1), as also described by Moore et al. (2003), Babin et al. (1996), and Behrenfeld et al. (1998).

$$\alpha_{\text{FRRF}} = \sigma_{\text{PSII}} q_p f \eta_{\text{PSII}} (3600/4) M_c / M_{\text{chl}a} A \quad (2)$$

In situ phytoplankton photosynthetic rates were estimated from carbon uptake applying the ^{14}C technique after Steemann-Nielsen (1952). Water was collected from 11 different depths along a 15 m vertical profile (0, 1, 2, 3, 4.5, 6, 7.5, 9, 10.5, 12 and 15 m). For each depth one light and one dark glass-bottle was spiked with 4 μC (150 kBq) radioactive bicarbonate solution and horizontally suspended at *in situ* depth for 3 h. In the laboratory, 4 ml of 2N hydrochloric acid was added to 50 ml of the samples and bubbled directly in the incubation-bottles for 45 min (modified Acid bubbling method, ABM, Schindler et al. 1972). Ten millilitres sub-samples of each light and dark bottle were transferred to scintillation vials and mixed with 10 ml of scintillation cocktail (Packard Ultima Gold). The ^{14}C content was measured as cpm in a Packard 1600 TR liquid scintillation counter, quench corrected and converted to dpm by internal efficiency. Based on these data, the chlorophyll-specific maximum carbon uptake rate (P_{max}) and the maximum light-utilisation coefficient $\alpha^*_{^{14}\text{C}}$ were calculated using the tangent hyperbolic function (Jassby and Platt 1976).

$$P = P_{\text{max}} * \tanh(\alpha^* E / P_{\text{max}}) \quad (3)$$

This non-linear regression model usually represents the best fit for light dependent primary productivity observations.

Irradiance was measured as total photosynthetic available radiation (PAR) with a LiCor 4π optical sensor and a precise 3 nm interval spectroradiometer (RAMSES-SCC-VIS, TriOS).

Phytoplankton absorption spectra were measured applying the filter-technique after Kishino et al. (1986) and normalised to chlorophyll-*a* (Chl-*a*) to generate the chlorophyll-specific absorption ($a^*(\lambda)$). To obtain the chlorophyll-specific absorption coefficient (a^*), the spectra were averaged between 350 and 700 nm.

Water temperature, pH, dissolved oxygen, specific conductivity and turbidity were measured with an automatic Yellow Springs 6502 profiler.

Orthophosphate (SRP, soluble reactive phosphorus) was analysed according to the conventional chemical technique after Greenberg et al. (1992). Alkalinity was titrated automatically using a 716 DMS Titrino. Total dissolved inorganic carbon (DIC) concentration was calculated from alkalinity and pH according to Golterman et al. (1978).

Chlorophyll-*a* concentration was determined following DIN 38 412 (1984). Two litres of water from each depth were filtered through 47 mm diameter Whatman GF/C filters (pore size 1.2 μm) and deep-frozen for 24 h. After extraction with hot ethanol, Chl-*a* was determined from spectrometric measurements at 665 and 750 nm and corrected for phaeophytin using acidification according to Lorenzen (1967).

Phytoplankton abundance and biovolume were determined from counting and sizing Lugol fixed samples from each depth after Utermöhl's sedimentation technique (Utermöhl 1958).

Results

Sampling was carried out over a 20-month-period providing data acquired under variable physical stratification, changing light conditions and differing phytoplankton productivities.

Mixed and stratified seasons were defined from temperature profiles and corresponding density differences. Winter mixed conditions lasted from end of October 2003 to mid-April 2004 and from November until the end of the sampling programme in December 2004 and were associated with surface water temperatures between 2.7 and 9.8 °C. Stratification occurred from May to mid-October 2003 and from end of April to end of October 2004 reaching peak temperatures of 25.8 °C in the surface water layer (Figure 2a). Under isothermal conditions during winter, the water column in Mondsee was completely mixed to the bottom, while during summer the mixing depth varied from 6 to 8 m. Photosynthesis was restricted to the euphotic zone with an average depth of 11.7 m (7.9–18.4 m) as illustrated in Figure 2b.

Soluble reactive phosphorus concentrations during spring overturn were in the range of

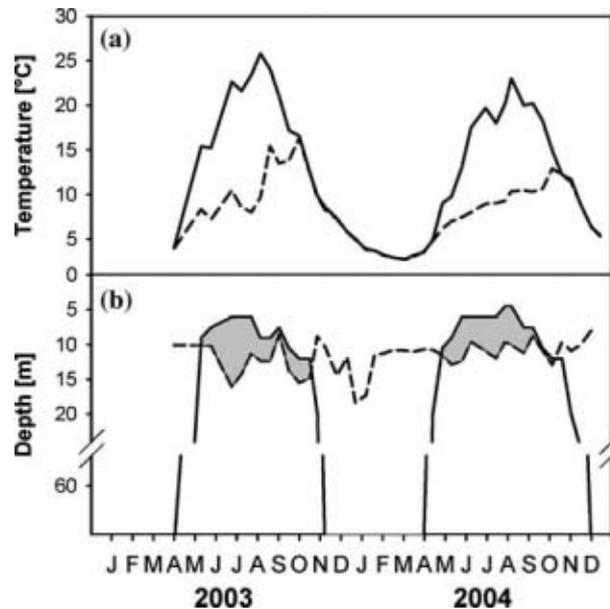


Figure 2. Physical variability during the sampling period 2003/2004. (a) surface water temperature (solid line) and metalimnetic temperature (dashed line) in °C; (b) mixing depth (Z_{mix} , solid line) and euphotic zone (Z_{eu} , dashed line) in m. The shaded area indicates the stratified period.

1.3–1.7 $\mu\text{g l}^{-1}$ and not detectable during the stratified period. DIC ranged from 2.6 to 3.6 mM (pH 7.6–8.4) under mixed conditions and varied between 2.2 and 3.3 mM (pH 7.1–8.6) in the epilimnion during stratification. In the metalimnion, DIC increased up to 3.9 mM at a pH of about 8.6.

The depth distribution of Chl-*a* was closely linked to thermal stratification. During the circulation period Chl-*a* was homogeneously distributed, while a DCM was observed in the thermocline during stratification, reaching a maximum of 16.2 mg m^{-3} . Microscopic evaluation of phytoplankton abundance indicated that the phytoplankton assemblage in the DCM was dominated by the filamentous cyanobacterium *P. rubescens*. During the rest of the year the phytoplankton assemblage was mainly composed of diatoms.

The quality of FRRF measurements near the water-surface was strongly influenced by light intensity. Maximum fluorescence in the light and the dark chambers (F_{mL} and F_{mD}) showed lower values in the high-light regions near the surface, caused by corruption of the detector. As a consequence, FRRF-measurements below 200 $\mu\text{Einst m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were exclusively used to calculate photosynthetic parameters. The inter-calibration of the light and dark chambers was tested by regression of all

available data below 200 $\mu\text{Einst m}^{-2} \text{s}^{-1}$ from the casts. The data were highly correlated (slope = 0.97, $r^2 = 0.98$, $n = 910$, $P < 0.001$), which was proved by filtered freshwater blanks.

The maximum quantum yield of photochemistry (F_v/F_m) varied from 0.49 to 0.60 (average 0.57, SD = 0.02) under mixed conditions and was more or less uniform with depth. Under stratified conditions, F_v/F_m was generally lower (average 0.50, SD = 0.04) and showed a characteristic vertical pattern: quenching near the surface, highest efficiencies at the bottom of the mixed zone and decreasing values further down the column corresponding to the light gradient.

σ_{PSII} varied from 195.4 to 366.2 (average 252.4 \AA m^{-2}) between 6 and 15 m depth during mixed conditions and from 173.2 to 311.1 (average 221.9 \AA m^{-2}) during stratification. σ_{PSII} depends on the vertical mixing rate (Moore et al. 2003), which is shown in Figure 3 depicting examples of typical profiles from August to December 2004. While the typical winter profile showed a uniform distribution, σ_{PSII} followed the vertical gradient of stratification in summer.

The relationship between fluorescence-based and ^{14}C -derived photosynthetic parameters was examined correlating estimates of primary productivity from both methods (Figure 4). Under

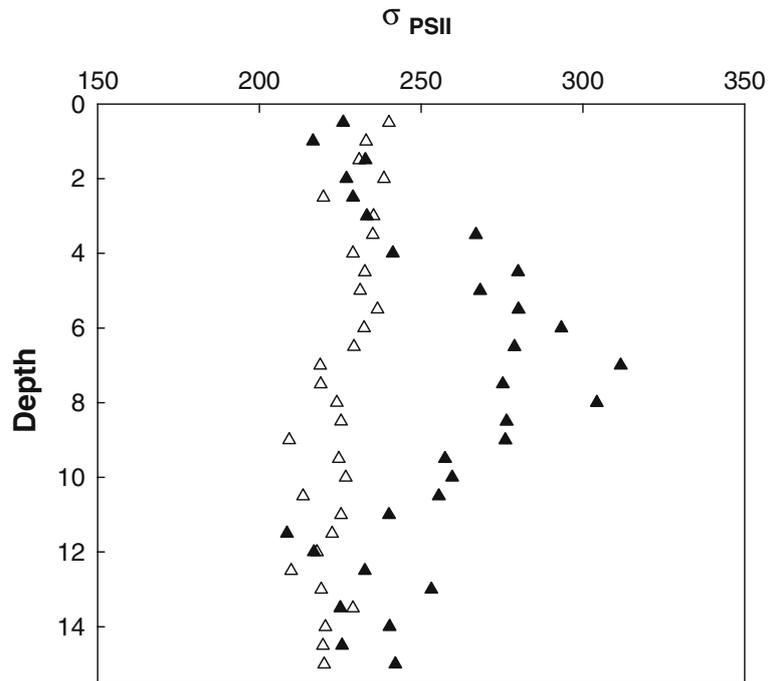


Figure 3. Effect of vertical mixing on the distribution of σ_{PSII} . Example profiles from August to December 2004 reflecting stratified (▲) and non-stratified (Δ) conditions.

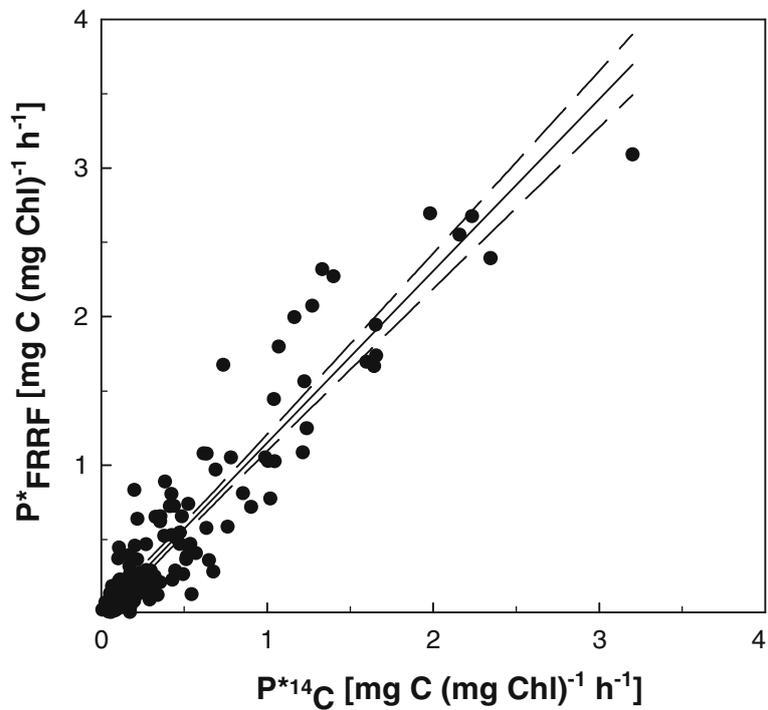


Figure 4. Correlation between fluorescence-based (P^*_{FRRF}) and ^{14}C -based (P^*_{14C}) phytoplankton productivity under sub-saturating conditions ($r^2 = 0.88$, $n = 140$, $P < 0.001$, slope = 1.15). The dashed lines indicate the 95% confidence limits.

sub-saturating conditions ^{14}C -derived productivity explained 88% of the variance of FRRF-based estimates (140 pairs of measurement, slope = 1.15, $r^2 = 0.88$, $P < 0.001$). Under high-light conditions as well as during the appearance of the DCM dominated by *P. rubescens*, fluorescence-based carbon fixation rates did not correlate with estimates from carbon uptake. The mismatch of fluorescence-based data and ^{14}C -uptake during blooms of *P. rubescens* is illustrated in Figure 5, where all productivity-rates of both methods are plotted against irradiance at sub-saturating light conditions.

The maximum light-utilisation coefficient α^*_{FRRF} was calculated from FRRF-based estimates using Equation (2). ^{14}C -based estimates of α^* were calculated using the tangent hyperbolic function. The two derived parameters were not correlated. Except in two cases, FRRF-derived values of α^* were higher than ^{14}C -based values. Splitting the data in a mixed and stratified sub-set, fluorometry-based data ranged in both cases between 0.02 and 0.04, while values based on ^{14}C measurements formed two distinct clusters

(Figure 6a). Phytoplankton was characterised by higher light-utilisation efficiency ($0.01\text{--}0.03 \text{ mgC (mg Chl-}a\text{)}^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol phot. m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$) during the circulation period, while it was at maximum 0.1 during stratification.

Maximum quantum yields for carbon fixation ($\Phi_{\text{C,max}}$) were calculated for 12-month data, as the Chl-*a* specific absorption coefficient a^* was only available since January 2004. There was an exponential relationship between $\Phi_{\text{C,max}}$ and F_v/F_m (Figure 6b), indicating that changes in the photochemical quantum yield F_v/F_m account for 60% of the variation of $\Phi_{\text{C,max}}$ ($R = 0.78$, $P < 0.001$). Highest values of $\Phi_{\text{C,max}}$ ranging from 0.028 to $0.063 \text{ mol C (mol phot.)}^{-1}$ were found in accordance with higher estimates of F_v/F_m during mixed conditions and were associated with higher nutrient availability.

Discussion

Mondsee is a deep oligotrophic alpine lake with a seasonal phytoplankton succession characterised

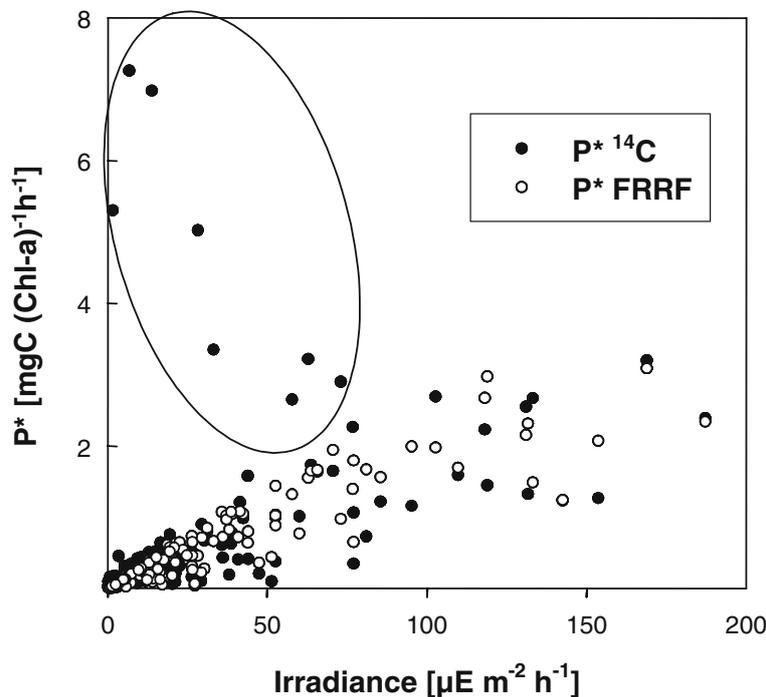


Figure 5. Relationship between all estimates of FRRF- and ^{14}C -productivity in $\text{mgC (Chl-}a\text{)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and total available radiation in $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. ^{14}C -based measurements during *P. rubescens* blooms are marked. As discussed in the text, these values are underestimated by FRRF due to the excitation band-width of the cyanobacterial species, which is not exactly in the spectrum of the Fluorometer.

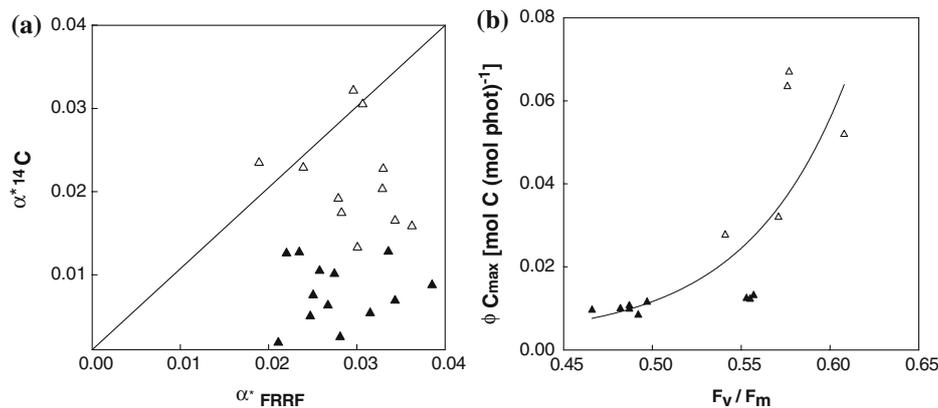


Figure 6. Comparison of physiological parameters derived from ^{14}C -based and FRRF-based estimates. (a) α^*_{14C} as a function of α^*_{FRRF} both in $\text{mgC (Chla)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($\mu\text{mol phot. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) $^{-1}$; (b) $\Phi_{C,max}$ as a function of F_v/F_m . Symbols of the plots correspond to stratified (\blacktriangle) and non-stratified (\triangle) conditions.

by diatoms during winter and spring and a mass occurrence of the filamentous cyanobacterium *P. rubescens* during summer and early autumn (Dokulil and Skolaut 1986; Dokulil 1987; Teubner et al. 2003). During the stratification period, it dominated the phytoplankton assemblage in the thermocline reaching up to 95% of the fresh-weight biomass (Findenegg 1969; Dokulil 1993; Dokulil and Teubner 2003).

Vertical scales in freshwaters differ from those in marine systems by an order of magnitude (10 m versus 100 m), as indicated by the depth of the euphotic zone (Z_{eu}) and the mixing depth (Z_{mix}) (Figure 2b). Restricted by the small-scale water-column, we had to optimise the sampling procedure to obtain sufficient and high quality FRRF-data. Error due to rapid sampling, irradiance and acclimation of the instrument to water-temperature was overcome by lowering the Fluorometer slowly by a hand-operated winch. In the topmost layers, the fluorescence signal was interfered by ambient red light (Raateoja et al. 2004a, b). The light chamber was more affected by high incoming radiation than the dark chamber as also reported by Smyth et al. (2004).

Maximum yields of photochemistry (F_v/F_m) indicate that thermal stratification has a strong impact on the physiological state of phytoplankton assemblages. Lower values of F_v/F_m during stratification, indicating a lower proportion of functional reaction centres f (Falkowski and Kolber 1993; Geider et al. 1993), were explained by nutrient limitation (Babin et al. 1996; Moore et al. 2003)

and a higher proportion of non-photosynthetic pigments (Babin et al. 1996).

In fact, Mondsee is a phosphorus-limited system with maximum SRP of $1.7 \mu\text{g l}^{-1}$ during spring overturn and undetectable amounts during summer. Highest F_v/F_m (0.51) during summer occurred below the mixed zone at depths between 6.5 and 10.5 m, where the density gradient prevented phytoplankton from being advected and exposed to high light intensities. During stratification, PAR was available down to $Z_{eu(max)}$ 11.8 m resulting in a ratio of $Z_{mix}/Z_{eu} < 1$. Summer phytoplankton in Mondsee is dominated by a deep maximum of *P. rubescens*, an extremely shade-adapted cyanobacterium which utilises the green light spectrum at depths between 10 and 12 m. In this metalimnetic *Planktothrix* population, F_v/F_m was 0.39–0.44. These values most probably underestimate the efficiency of PS II. As Kromkamp et al. (2001) point out, thylakoids of cyanobacteria are also used for respiration and phycobilisomes produce fluorescence both leading to underestimations of F_v/F_m .

The functional absorption cross section (σ_{PSII}) was higher during stratification and also showed a distinct vertical pattern. During the mixed period, cells are moved faster through the vertical light gradient, than they can acclimate their photosynthetic apparatus, the distribution of σ_{PSII} will be rather uniform within different depths (Moore et al. 2003). During stratification, phytoplankton cells can acclimate to the light regime, leading to characteristic vertical patterns. As indicated in

Figure 3, the highest values of σ_{PSII} during stratification were observed at a depth around 7.5 m, declining to lower values down to 15 m depth. The mixing depth extended to an average of 7.9 m during stratification, and in combination with high incoming radiation near the surface, σ_{PSII} was expected to be low in the epilimnion. The depth of the euphotic zone was on average 11.8 m in summer, providing an usable amount of light for photosynthesis in the metalimnion. Uniformly low values in the *Planktothrix* layer below 12 m depth may be caused by species composition.

Generally, observations on σ_{PSII} can be interpreted by the light history of the cells (Kolber et al. 1988, 1990). Non-photochemical quenching can cause a reduction of σ_{PSII} up to 50% during a day (Falkowski et al. 1986; Olaizola et al. 1994), whereas photoacclimation over a longer period can cause changes of σ_{PSII} by a factor of 3 (Kolber et al. 1988). Moreover, there is variability in σ_{PSII} due to species composition (Kolber et al. 1988). Lower values of σ_{PSII} during the mixed period, when diatom populations dominated the phytoplankton assemblages, were consistent with observations from Moore et al. (2003) and taxon-specific data from Olson et al. (1996). The nutrient status of the cells also influences σ_{PSII} . In accordance with our findings, studies of Berges et al. (1996) have shown higher σ_{PSII} following nutrient limitation.

Estimates of primary productivity from FRRF-based measurements and ^{14}C -incubations showed a high consistency throughout the sampling period with slightly higher estimates of P_{FRRF} . This is in agreement with the findings of Suggett et al. (2001), while large differences between photosynthetic parameters derived from FRRF – and ^{14}C -estimates were observed by Boyd et al. (1997), who explained the inconsistency of both methods by spectral differences of the light regime. During the occurrence of *P. rubescens* in the metalimnetic layer, FRRF was not able to give similar results as the ^{14}C incubation technique. Findings of Raateoja et al. (2004a, b) indicate that the applicability of FRRF to phycoerythrocyanin-rich cyanobacterial taxa is restricted due to their spectral fluorescence and absorption characteristics. In contrast to phycoerythrocyanin-rich cyanobacteria with an excitation band width between 570 and 595 nm (Bryant 1982), phycoerythrin-rich cyanobacteria (λ 495–575 nm) lie within FRRF excitation (λ

458–514 nm). Although *P. rubescens* is counted to the group of phycoerythrin-rich cyanobacteria, FRRF was not applicable during mass appearance of the taxon. The amount of phycoerythrin or their derivatives phycourobilin (λ 495–500 nm) and phycoerythrobilin (λ 540–575 nm) were not determined (Sidler 1994; Raateoja et al. 2004a, b).

Excluding *P. rubescens*-rich layers, it is none the less astonishing that estimates of primary productivity based on two totally different time-scales show an r^2 of 0.88.

Phytoplankton assemblages dominated by diatoms have a higher light-utilisation efficiency, as indicated by $\alpha^*_{^{14}\text{C}}$. The indifferently high values of α^*_{FRRF} did not correspond to ^{14}C -based α^* , which clearly separated winter- from summer-phytoplankton assemblages. Observations of Moore et al. (2003) described similar results, and Suggett et al. (2001) found α^*_{FRRF} to be 1.5–2.5 times higher than $\alpha^*_{^{14}\text{C}}$. These results might be interpreted by the differences of the two techniques. The ^{14}C technique estimates net photosynthetic rates, while instantaneous FRRF-based estimates represent gross photosynthetic rates (Bender et al. 1987; Marra 2002). Respiration can cause up to 10% of the difference between FRRF-based and ^{14}C -based light-utilisation efficiencies (Grande et al. 1989; Weger et al. 1989; Danieri et al. 1992). Further processes which affect α^*_{FRRF} are discussed by Flamel and Kromkamp (1998): the higher α^*_{FRRF} can be caused by a combination of cyclic electron flow around PS II (Kolber and Falkowski 1986; Prasil et al. 1996), photorespiration and the Mehler reaction, which has also been observed in cyanobacteria (Kana 1992, 1993).

Maximum yields for carbon fixation ($\Phi_{\text{C,max}}$) were associated with higher quantum yields of photochemistry (F_v/F_m) under mixed conditions. Typical for diatom dominated phytoplankton, the optical absorption cross section decreases with the increase of cellular pigmentation and pigment packaging during adaptation to low light conditions, hand in hand with a higher light-utilisation efficiency (Bracher and Wiencke 2000). Under light-limited conditions, the maximum quantum yield of charge separation has been reported to reach values of 0.07–0.09 (Greene et al. 1994; Babin et al. 1995; Arbones et al. 2000) which is in accordance with our findings during winter, when

light availability is generally lower. The decrease of $\Phi_{C,max}$ and F_v/F_m was consistent with a lower proportion of functional reaction centres under phosphorus depletion during stratification, similar to findings by Kolber et al. (1990) in the sea under nitrogen limitation. The nutrient status affects the optical absorption cross section (a^*) of phytoplankton because it is directly related to the synthesis of components of the light harvesting apparatus.

Although FRRF is a convenient tool to estimate phytoplankton productivity under sub-saturating conditions, there are some major deficiencies in the applicability to freshwater conditions. Limited by the depth of the lake, FRRF-data acquisition has to be carried out in a rather small-scale water-column. Highly interesting information from the epilimnion is hard to interpret using a single acquisition protocol for the whole water-column because of the high incoming radiation. This may be overcome by using two different protocols with less sensitive settings for the topmost layers. But this also means acquisition and, most importantly, interpretation of the incoming radiation prior to each FRRF cast. Changing the protocol during the casts will mean another prolongation for the time consuming procedure of data acquisition, always in mind that this is done by a hand-operated winch. Another point is, that specific phytoplankton assemblages like cyanobacteria cannot be characterised sufficiently due to their low *in vivo* fluorescence to Chl-*a* ratio (Cunningham 1996). Generally speaking, we do not recommend FRRF as a stand-alone tool for deriving phytoplankton photosynthetic parameters. Choosing the proper operational scale, it provides additional high quality information on phytoplankton physiology, which is not obtainable with the conventional ^{14}C method.

Conclusions

- During the mixed period, phytoplankton was dominated by diatoms. The acclimation to lower radiation due to the short day-length and higher nutrient availability was expressed by higher quantum yields of photochemistry (F_v/F_m) and light-utilisation efficiency (α^*_{14C}), whereas the functional absorption cross section (σ_{PSII}) decreased.

- Summer phytoplankton is efficiently acclimated to the light environment expressed by highest F_v/F_m and σ_{PSII} right below the mixed zone under sub-saturating conditions. In the metalimnion, *P. rubescens* shows a lower proportion of functional reaction centres which is most probably due to alternative electron sinks.
- Estimates of primary productivity from FRRF showed a general consistency to conventional ^{14}C -incubations under sub-saturating conditions.

Acknowledgements

We thank Katrin Teubner (Intitute for Limnology, Mondsee) for advice and discussion, and Anika Stracke (Intitute for Limnology, Mondsee) for technical support and company on sampling tours and in the laboratory. Also, we want to thank Robert de Paoli and Steve Juggins (both Chelsea Instruments, UK) for uncomplicated, quick technical support handling serious struggles with the Fluorometer. We thank two anonymous reviewers for comments to strenghten the manuscript.

References

- Arbones B, Figueiras FG and Varela R (2000) Action spectrum and maximum quantum yield of carbon fixation in natural phytoplankton populations: implications for primary production estimates in the ocean. *J Mar Syst* 26: 9–114
- Babin M, Morel A, Claustre H, Bricaud A, Kolber Z and Falkowski PG (1996) Nitrogen and irradiance variations in the maximum quantum yield of carbon fixation in eutrophic, mesotrophic and oligotrophic marine systems. *Deep Sea Res Part 1 Oceanogr Res Pap* 43: 1241–1272
- Babin M, Therriault JC, Legendre L, Nieke B, Reuter R and Condal A (1995) Relationship between the maximum quantum yield of carbon fixation and the minimum quantum yield of chlorophyll *a in vivo* fluorescence in the Gulf of St. Lawrence. *Limnol Oceanogr* 40: 956–968
- Behrenfeld MJ and Kolber ZS (1999) Widespread iron limitation of phytoplankton in the South Pacific Ocean. *Science* 283: 840–843
- Behrenfeld MJ, Bale AJ, Kolber ZS, Aiken J and Falkowski PG (1996) Confirmation of iron limitation of phytoplankton photosynthesis in the equatorial pacific ocean. *Nature* 383: 508–511
- Behrenfeld MJ, Prásil O, Kolber ZS, Babin M and Falkowski PG (1998) Compensatory changes in Photosystem II electron turnover rates protect photosynthesis from photoinhibition. *Photosynth Res* 58: 259–268
- Bender M, Grande K, Johnson K, Marra J, Williams PJ LeB, Sieburth J, Pilson M, Langdon M, Hitchcock G, Orchoado J,

- Hunt C, Donaghay P and Heinemann K (1987) A comparison of four methods for determining planktonic community production. *Limnol Oceanogr* 32: 1085–1098
- Berges JA, Charlebois DO, Mauzerall DC and Falkowski PG (1996) Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency in photosystems I and II in microalgae. *Plant Physiol (Rockv)* 110: 689–696
- Boyd PW, Aiken J and Kolber Z (1997) Comparison of radiocarbon and fluorescence based (pump and probe) measurements of phytoplankton photosynthetic characteristics in the North East Atlantic Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 149: 215–226
- Bracher AU and Wiencke C (2000) Simulation of the effects of naturally enhanced UV radiation on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 196: 127–141
- Bryant DA (1982) Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 128: 835–844
- Cunningham A (1996) Variability of *in vivo* chlorophyll fluorescence and its implications for instrument development in biooptical oceanography. *Sci Mar* 60: 309–315
- Danieri G, Iriarte A, Garcia VM, Purdie DA and Crawford DW (1992) Growth irradiance as a factor controlling the dark respiration rates of marine phytoplankton. *J Mar Biol Assoc UK* 72: 723–726
- DIN 38 412. (1984) Testverfahren mit Wasserorganismen. Bestimmung des Chlorophyll *a* Gehaltes von Oberflächenwasser, p 4. Deutsche Einheitsverfahren, Berlin
- Dokulil M (1987) Long C. term occurrence of blue-green algae in Mondsee during eutrophication and after nutrient reduction with special reference to *Oscillatoria rubescens* – Schweiz. *Z Hydrol* 49: 378
- Dokulil MT (1993) Long-term response of phytoplankton population dynamics to oligotrophication in Mondsee, Austria. *Verh Internat Verein Limnol* 25: 657–661
- Dokulil M and Skolaut C (1986) Succession of phytoplankton in a deep stratifying lake: Mondsee, Austria. *Hydrobiologia* 138: 9–24
- Dokulil MT and Teubner K (2003) Steady state phytoplankton assemblages during thermal stratification in deep alpine lakes. Do they occur?. *Hydrobiologia* 502: 65–72
- Eppley RW (1980) Estimating phytoplankton growth rates in the central oligotrophic oceans. In: *Primary Production in the Sea*. Plenum Press. Brookhaven Symp Biol 31: 231–242
- Falkowski PG (1983) Light-shade adaptation and vertical mixing of marine phytoplankton: a comparative field study. *J Mar Res* 41: 215–237
- Falkowski PG (1995) Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans. *Aust J Plant Physiol* 22: 341–355
- Falkowski PG, Wyman K, Ley AC and Mauzerall DC (1986) Relationship of steady state photosynthesis to fluorescence in eucaryotic algae. *Biochim Biophys Acta* 849: 183–192
- Findenegg I (1969) Die Eutrophierung des Mondsees im Salzkammergut. *Wasser- und Abwasser-Forschung* 4: 139–144
- Flameling IA and Kromkamp J (1998) Light dependence of quantum yields for PS II charge separation and oxygen evolution in eucaryotic algae. *Limnol Oceanogr* 43: 284–297
- Geider RJ, Greene RM, Kolber Z, Macintyre HL and Falkowski PG (1993) Fluorescence assessment of the maximum quantum efficiency of photosynthesis in the Western North – Atlantic. *Deep Sea Res* 40: 1205–1224
- Golterman HL, Clymo RS and Ohnstad MAM (1978) *Methods for Physical and Chemical Analysis of Fresh Waters*. IBP Handbook No. 8, p 213. Blackwell Science, Oxford
- Gorbunov MY, Kolber ZS and Falkowski PG (2000) Measurement of photosynthetic parameters in benthic organisms *in situ* using a SCUBA-based fast repetition rate fluorometer. *Limnol Oceanogr* 45: 242–245
- Grande K, Marra DJ, Langdon C, Heinemann K and Bender ML (1989) Rates of respiration in the light measured using an ¹⁸O isotope labelling technique. *J Exp Mar Ecol* 129: 95–120
- Greenberg AE, Clesceri LS and Eaton AD (eds) (1992) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Am Publ Health Assoc, Washington DC
- Greene RM, Kolber ZS, Swift DG, Tindale NW and Falkowski PG (1994) Physiological limitation of phytoplankton photosynthesis in the eastern Equatorial Pacific determined from variability in the quantum yield of fluorescence. *Limnol Oceanogr* 39: 1061–1074
- Jassby AD and Platt T (1976) Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light in phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 21: 540–547
- Kana TM (1992) Relationship between photosynthetic oxygen cycling and carbon assimilation in *Synechococcus* WH7803 (Cyanophyta). *J Phycol* 28: 304–308
- Kana TM (1993) Rapid oxygen cycling in *Trichodesmium thiebautii*. *Limnol Oceanogr* 38: 18–24
- Kishino M, Okami N, Takahashi M and Ichimura S (1986) Light utilisation efficiency and quantum yield of phytoplankton in a thermally stratified sea. *Limnol Oceanogr* 31: 557–566
- Kolber ZS and Falkowski PG (1993) Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ*. *Limnol Oceanogr* 38: 1646–1665
- Kolber ZS, Barber RT, Coale KH, Fitzwater SE, Greene RM, Johnson KS, Lindley S and Falkowski PG (1994) Iron limitation of phytoplankton photosynthesis in the equatorial Pacific Ocean. *Nature* 371: 145–149
- Kolber ZS, Prasil O and Falkowski PG (1998) Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. *Biochem Biophys Acta* 1367: 88–106
- Kolber ZS, Wyman KD and Falkowski PG (1990) Natural variability in photosynthetic energy conversion efficiency; a field study in the Gulf of Maine. *Limnol Oceanogr* 35: 72–79
- Kolber ZS, Zehr J and Falkowski PG (1988) Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant Physiol* 88: 923–929
- Kromkamp JC, Domin A, Dubinski Z, Lehmann C and Schanz F (2001) Changes in photosynthetic properties measured by oxygen evolution and variable chlorophyll fluorescence in a simulated entrainment experiment with the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Aquat Sci* 63: 363–382
- Lesser PL and Gorbunov MJ (2001) Diurnal and bathymetric changes in chlorophyll fluorescence yields of reef corals measured *in situ* with a fast repetition rate fluorometer. *Mar Ecol Prog Ser* 212: 69–77
- Lorenzen CJ (1967) Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol Oceanogr* 12: 343–346
- Marra J (2002) Approaches to the measurement of phytoplankton production. In: Williams PJ LeB, Thomas DN and Reynolds CS (eds) *Phytoplankton Productivity*, pp 78–108. Blackwell Science, Oxford
- McMinn A and Hegseth EN (2004) Quantum yield and photosynthetic parameters of marine microalgae from the

- southern Arctic Ocean, Svalbard. *J Mar Biol Ass UK* 84: 865–871
- Moore CM, Suggett D, Holligan PM, Sharples J, Abraham ER, Lucas MI, Rippeth TP, Fisher NR, Simpson JH and Hydes DJ (2003) Physical controls on phytoplankton physiology and production at a shelf sea front: a fast repetition-rate fluorometer based field study. *Mar Ecol Prog Ser* 259: 29–45
- Olaizola M, LaRoche J, Kolber ZS and Falkowski PG (1994) Non photochemical quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth Res* 41: 357–370
- Olson RJ, Chekalyuk AM and Sosik HM (1996) Phytoplankton photosynthetic characteristics from fluorescence induction essays of individual cells. *Limnol Oceanogr* 41: 1253–1263
- Prasil OZ, Kolber ZS, Berry JA and Falkowski PG (1996) Cyclic electron flow around photosystem II *in vivo*. *Photosynth Res* 48: 395–410
- Raateoja M, Seppälä J and Kuosa H (2004a) Bio-optical modelling of primary production in the SW Finnish coastal zone, Baltic Sea: fast repetition rate fluorometry in Case 2 waters. *Mar Ecol Prog Ser* 267: 9–26
- Raateoja M, Seppälä J and Ylöstalo P (2004b) Fast repetition rate fluorometry is not applicable to studies of filamentous cyanobacteria from the Baltic Sea. *Limnol Oceanogr* 49: 1006–1012
- Schindler DW, Schmidt RV and Reid RA (1972) Acidification and bubbling as an alternative in determining phytoplankton production by the ^{14}C method. *J Fish Res Board Canada* 29: 1627–1631
- Sidler WA (1994) Phycobilisome and phycobiliprotein structure. In: Bryant DA (ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp 139–216. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Smyth TJ, Pemberton KI, Aiken J and Geider RJ (2004) A methodology to determine primary production and phytoplankton photosynthetic parameters from Fast Repetition Rate Fluorometry. *J Plankton Res* 26: 1337–1350
- Steemann-Nielsen E (1952) The use of radioactive carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. *J Cons Int de laMer* 18: 117–140
- Strutton PG, Mitchell JG, Parslow JS and Greene RM (1997) Phytoplankton patchiness: quantifying the biological contribution using fast repetition rate fluorometry. *J Plankton Res* 19: 1265–1274
- Suggett D, Kraay G, Holligan P, Davey M, Aiken J and Geider R (2001) Assessment of a spring cyanobacterial bloom by use of a fast repetition rate fluorometer. *Limnol Oceanogr* 46: 802–810
- Teubner K, Tolotti M, Greisberger S, Morscheid H, Dokulil MT and Morscheid H (2003) Steady state phytoplankton in a deep pre-alpine lake: species and pigments of epilimnetic versus metalimnetic assemblages. *Hydrobiologia* 502: 49–64
- Utermöhl H (1958) Zur Vervollkommnung der Quantitativen Phytoplanktonmethodik. *Verh Internat Verein Limnol* 9: Stuttgart
- Weger HG, Herzig R, Falkowski PG and Turpin DH (1989) Respiratory losses in the light in a marine diatom: measurements by short-term mass spectrometry. *Limnol Oceanogr* 34: 1153–1161

Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp.

5 SIMONE KOSOL, JOHANNA SCHMIDT AND RAINER KURMAYER

Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestraße 9, A-5310 Mondsee, Austria

(Received 29 November 2007; accepted 22 April 2008)

Cyanobacteria frequently form mass developments in surface waters. Populations consist of strains that differ in the production of bioactive peptides, e.g. microcystins (MC) inhibiting protein phosphatases 1 and 2A and anabaenopeptins (APN) inhibiting carboxypeptidases. Forty-nine strains (18 green-pigmented (phycocyanin-rich) *P. agardhii* strains and 31 red-pigmented (phycoerythrin-rich) *P. rubescens* strains) of the filamentous cyanobacterium *Planktothrix* (*Anagnostidis et Komarék*) were analysed for their MC and APN net production rates. These rates were compared with (i) the pigmentation, (ii) the proportion of extra- and intracellular peptide concentrations and (iii) the cellular growth rates under standardized laboratory conditions. Excluding the strains lacking MC and APN, the MC and APN contents varied up to 14-fold and 12-fold, each. The variation in minimum and maximum peptide content (0.32–4.51 µg MC mg⁻¹ dry weight; 0.85–10.32 µg APN mg⁻¹ dry weight) exceeded the variation found for chlorophyll *a* (4.8–16.9 µg mg⁻¹ dry weight). The extracellular proportions of MC (0–62%) and APN (0–58%) varied among strains, however, on average, proportions of extracellular MC and APN were low (MC: 8.8 ± (1 SE) 1.9%, APN: 8.4 ± 1.8%). Among all strains cellular growth rates showed a 5-fold variation (0.07–0.33 doublings of dry weight.day⁻¹) and were found independent of the pigmentation and the peptide net production rate. It is concluded that the MC and APN net production rate is not causally related to the cell-division cycle and the synthesis of highest amounts of MC and APN does not constrain cell division.

Key words: cyanobacteria, cyanotoxins, freshwater phytoplankton, harmful algal bloom, growth rate, high performance liquid chromatography, Microcystis, water reservoir

25 Introduction

Because of their frequent occurrence in fresh water, toxin-producing cyanobacteria are considered to be a general threat to drinking water quality (Codd *et al.*, 1999; WHO, 2004). Many of the studies dealing with toxin production have focused on microcystins (MC), cyclic heptapeptides inhibiting eukaryotic proteinphosphatase 1 and 2A. MCs are synthesized via non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthases (PKS) assembled into large multifunctional proteins encoded by the *mcy* gene cluster (Tillett *et al.*, 2000). The chemical structure of MC is cyclo (D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷), where D-MeAsp is the non-proteinogenic amino acid D-erythro-β-iso-aspartic acid (methyl aspartate), Mdha is N-methyl-dehydroalanine and Adda is a β-amino acid with a C₁₀-chain: (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid. X and Z represent variable L-amino acids in positions 2 and 4, respectively (Carmichael, 1992). Similar to MCs,

anabaenopeptins (APN) have been reported to inhibit protein phosphatase 1 (APN A and B; Gkelis *et al.*, 2006) as well as proteases such as carboxypeptidase A (APN G and H, Itou *et al.*, 1999). APNs contain six amino acids: five of them form a cyclic structure with a sixth amino acid that is attached. The pentapeptide moiety has the common structure cyclo (D-Lys⁵-L-Val⁴-L-Hty³-L-MeAla²-L-Phe¹) with L-Arg⁶ (or L-Tyr) bound to D-Lys⁵ through an ureido linkage. L-Hty is L-homotyrosine and MeAla is N-methyl-alanine (Harada *et al.*, 1995; Fujii *et al.*, 2002). D-Lys⁵ is the only non-variable amino acid in APN. APNs are synthesized by NRPS analogously to the MCs (Fujii *et al.*, 2002).

Regulation of MC net production in single isolates (strains) has been addressed by a number of studies quantifying the effects of various environmental conditions on MC content in the laboratory, e.g. effects of temperature, pH, irradiance, macronutrients (N,P), and trace elements (Sivonen & Jones, 1999). Contrary to expectations the production of MCs was not inducible and different environmental factors were found to induce moderate changes in MC content only.

Correspondence to: Rainer Kurmayer. e-mail: rainer.kurmayer@oeaw.ac.at

These results are in contrast to the regulation of antibiotics and sporulation factors via NRPS, which is induced or increased as growth declines (Marahiel *et al.*, 1993). For example during the transition from the logarithmic to the stationary phase of growth in batch culture, *Bacillus subtilis* shows increased production of the peptide antibiotics tyrocidine and gramicidine S and the lipopeptide surfactin. Orr & Jones (1998) suggested that MC production is coupled primarily to cell division of the organism and concluded that MC – although it is clearly a secondary metabolite – rather displays the attributes of essential intracellular nitrogenous compounds. According to this theory the key influence of all possible environmental factors is indirect – through their effect on cell division and growth, whereas the direct effects on MC biosynthesis are of minor importance. The specific growth rate has been used to predict the intracellular MC content under nitrogen-limiting conditions in culture (Long *et al.*, 2001). The model of Long *et al.* (2001) implies that MC production is constitutive and MC-producing strains will always contain at least a minimal intracellular MC content and a maximum content determined by the nutrient saturated growth rate (for a given temperature and light growth conditions).

In contrast to the regulation of MC synthesis within a strain, very few studies have investigated the phenotypic variation in MC content between strains. In a few cases large differences in MC content related to the dry weight of the strains have been reported (Bolch *et al.*, 1997; Saker *et al.*, 2005). For *Planktothrix* 10-fold and 16-fold differences in MC content related to dry weight have been reported (Kurmayer *et al.*, 2005; Welker *et al.*, 2004). While dry weight is usually considered rather inaccurate to estimate the MC content it is completely unclear how the MC production rate relates to the differences in growth rates among strains as well as to the differences in the production of other peptides.

In this study 49 strains of *Planktothrix* were analysed for their MC and APN contents and their specific peptide net production rates during conditions of maximum specific growth (μ_m , sensu Kohl & Nicklisch, 1988). The genus *Planktothrix* (*Oscillatoria*) (Anagnostidis & Komarek, 1988) occurs frequently in lakes and reservoirs in the temperate zone of the Northern hemisphere. The species *P. rubescens* and *P. agardhii* differ in pigmentation and planktonic life-form: *P. rubescens* is typically found in deep, stratified and oligo- to mesotrophic waters, while *P. agardhii* occurs in shallow and more eutrophic waters. Chromatic adaptation has not been observed within *Planktothrix* (Skulberg & Skulberg, 1985)

and the hydrostatic pressure and the underwater light climate act as factors leading to the ecological divergence between both life forms (Beard *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2003). In some ecosystems both species have been reported to co-occur for years, for example in Lake Blelham Tarn, United Kingdom (Davis *et al.*, 2003) or in Lake Steinsfjorden, Norway (Halstvedt *et al.*, 2007).

Material and methods

Origin and strain cultivation

Forty-nine strains (18 *P. agardhii*, 31 *P. rubescens*) were isolated from different lakes as described previously (Kurmayer *et al.*, 2004, see supplementary material available from the *European Journal of Phycology* website) and assigned to *P. agardhii* (green-pigmented) or *P. rubescens* (red-pigmented) according to Suda *et al.* (2002). All strains were grown in BG₁₁ medium under sterile conditions (Rippka, 1988) at 20°C and 40–60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Philips LTD, 36W/965, Vienna, Austria). A few strains have been purified axenic prior to the growth experiments (No. 70/1a, No. 160/1a, No. 12/1a, PCC 7821, No. 14/1a, No. 90/1i, No. 113/1b). In order to adapt the cells to the experimental conditions pre-cultures for a minimal duration of 3 months were established and their growth was monitored by measuring optical density (OD) at 880 nm (5-cm light path). At the start of each growth experiment pre-cultures were diluted down to $\text{OD}_{880} = 0.01$ ($3 \times 10^4 - 16 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$) in a total volume of 800 ml and aliquots of 100 ml were distributed over eight Erlenmeyer flasks (250 ml) to achieve optimal growth. Cultures were grown semi continuously and growth was monitored by OD readings every other day. Because not all strains could be grown simultaneously one strain (*P. agardhii* strain No. 32) was included as a control strain to standardize for uncontrolled factors. Each strain was tested in duplicate at two consecutive sampling dates.

Cell harvesting

Cells were harvested at $\text{OD} = 0.1-0.15$ at two consecutive sampling dates, usually between days 4 and 19 depending on the strain-specific growth rate. Growth rates (r) (day^{-1}) and peptide net production rates (day^{-1}) were calculated using the formula, $r = (\ln N_2 - \ln N_1) / \Delta t$, where $N_{1,2}$ were the cell concentration/peptide concentrations at consecutive sampling days and Δt was the interval in days (3 days). Cells were fixed in 2% formaldehyde and filtered onto IsoporeTM membrane filters (0.2 μm GTBP Ø 25 mm, Millipore), stained with DAPI and enumerated using epifluorescence microscopy. A minimum of 400 specimens was counted. As individual cells in the filaments of *Planktothrix spp.* could not always be distinguished, the filament length was estimated using the boxes of the counting grid (at 400 \times magnification). For 20 randomly selected filaments the cell number per box of the counting grid was determined and the average cell number per box was used to calculate cell numbers. Analogously biovolume

was determined by measuring the diameter of 20 randomly selected filaments at 1125 \times magnification and calculating biovolume by assuming a cylindrical shape.

190 Samples were harvested by filtering onto pre-weighed glass fibre filters (BMC Ederol, Vienna), dried in a vacuum centrifuge, weighed and stored frozen at -20°C . A minimum of 1.0 mg of dry weight of biomass was collected. Dissolved peptides were collected from the filtrate using solid phase extraction (SPE) via tC_{18} cartridges [Waters, Sep-Pak Vac 1cc (100 mg)] according to standard techniques. Cartridges were stored at -20°C . After acclimation to room temperature the cartridges were washed with 10 ml H_2O and 10 ml 20% (v/v) methanol and peptides were eluted in 1 ml 90% MeOH and dissolved extracts were stored at -20°C until HPLC analysis. During pilot experiments the spiking of BG₁₁ medium (300 ml) with 1 μg MC-LR standard revealed an average recovery rate of $85.6 \pm 12.7\%$ (95% confidence limit, $n=6$) as measured by HPLC. For 1 μg of APN B the recovery rate was $99 \pm 0.4\%$.

Peptide extraction and HPLC analysis

To extract MC and APN filters were cut into pieces and extracted in 50% MeOH (v/v). Extracts were shaken for 30 min, centrifuged at 16,000 g and the clear supernatant was evaporated to dryness in a vacuum centrifuge. This procedure was repeated twice. Pilot experiments showed 99% extraction efficiency after three repetitions and optimal yields with extracting on ice and without sonification compared with extraction at room temperature with sonification (strain No. 40).

210 The extracts were analysed for MCs and APNs by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to diode array detection (HPLC-DAD). For HPLC analysis the samples were re-dissolved in 600 μl MeOH (50/50, v/v), centrifuged at 16,000 g (10 min) and the cleared supernatant was injected. MCs and APNs were quantified at 240 nm and 210 nm, each using a linear gradient from 20% acetonitrile (0.05% TFA) to 50% acetonitrile on a LiChrospher[®] 100, ODS, 5 μm , LiChroCART[®] 250-4 cartridge system (Agilent, Vienna, Austria). Structural variants of MCs and APNs were assigned using the information obtained from UV spectra and retention times and identified by sensitive matrix assisted desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) as described (Kurmayer *et al.*, 2004, 2005). In order to evaluate the reproducibility of the detection of MCs and APNs from aqueous-methanolic extracts via the HPLC-DAD technique the following pilot experiment was performed (Welker & Erhard, 2007): The biomass of ten strains (Nos 40, 67, 77, 82, 83, 95, 101, 110, 173, 208, CCAP 1460/5) was (i) extracted as described above and analysed by HPLC-DAD coupled to MALDI-TOF MS and (ii) directly analysed by single filament MALDI-TOF MS as described (Kurmayer *et al.*, 2004). This comparison revealed that all of the MCs and APNs present in a specific strain were detected using the linear gradient in HPLC-DAD as described above. Further, the retention time and the UV-spectra were useful to identify the elution of APN B (16.3–17 min), APN F (18.9–19.5 min),

APN A (20.7–21.3 min), oscillamide (OSC) Y (23.4–23.7 min) and those of MCs from ([Asp, Mdha]-MC-RR (25.8–26.2 min), [Asp, Dhb]-MC-RR (26.5–26.9 min), [Asp]-MC-HtyR (32.6–33.3 min), [Asp]-MC-LR (33.2–34 min).

In addition standards have been used to identify novel MCs (35–36.1 min), the structure of which has been elucidated as [Asp, Dhb]-MC-HtyY, m/z 1074 and [Asp, Dhb]-MC-HtyHty, m/z 1088 (R. Kurmayer & T. Hemscheidt, unpublished). Standards of the variants APN 908 (m/z 909) and APN 915 (m/z 919) were used to identify the more rare variants APN J (18.4–18.9 min) and APN I (22.8–23.2 min), respectively (H. Okumura, B. Philmus & T. Hemscheidt, unpublished). The concentrations of MCs were determined as concentration equivalents of [MeAsp, Mdha]-MC-LR (Calbiochem, Schwalbach, Germany). The linear regression was $y=1.9525x$ ($R^2=1$), where y was the peak area at 240 nm and x was the injected concentration of microcystin-LR standard (μg). The concentrations of APNs were determined as concentration equivalents of APN B using a purified standard (Judith Blom, University of Zürich, Institute of Plant Biology, Limnological Station) and quantification via the molar extinction coefficient ($\lambda_{\text{max}}=225$ nm, $\epsilon=8833$, Harada *et al.*, 1995). The linear calibration regression was $y=1.3169 \times$ ($R^2=1$), where y was the area recorded at 210 nm and x was the concentration of APN injected (μg). Under the conditions as described above the detection limit was 10 ng both for the MC-LR and the APN B standard.

For chlorophyll *a* analysis, filters containing aliquots of the cells that were harvested for peptide analysis, were extracted in 1 ml of 90% acetone (v/v) and grinded with a mortar under dim light. Four ml of 90% acetone were added and the extraction was performed in the refrigerator over night. Two ml of the suspension were centrifuged (10 min, 16,000 g, 4°C) and 100 μl of the clear supernatant were injected into HPLC-DAD using a linear gradient of three solvents: (A) methanol (80:20 methanol: 0.5 M ammoniumacetate, v/v), (B) acetonitrile (90%) and (C) acetic acid ethyl ester, as developed by Wright *et al.* (1991). A Superspher[®] 100 RP-18, 4 μm , 250-4 cartridge system (Agilent, Vienna, Austria) was used. Concentrations in μg per mg dry weight were estimated for chlorophyll *a* with calibration curves using a standard supplied by DHI Water & Environment (Hørsholm, Denmark). For determination of the acid ratio A/A_a (the ratio of chlorophyll *a* to magnesium-free phaeophytine) samples were acidified with 0.1 M HCl according to standard protocols (Lorenzen, 1967). $A/A_a \sim 1.7$, if only undegraded chlorophyll *a* is present and $A/A_a \sim 1.0$, if only degradation products of chlorophyll *a* are present.

Results

Variation of peptide contents within and among strains

Three methods of biovolume estimation were compared in their ability to predict the concentration of MC and APN in cells of the control

strain No. 32: cellular dry weight (DW), cell counting and biovolume estimated from the microscope. All three methods gave highly significant correlations between peptide concentrations and the estimated biovolume (Fig. 1). The regressions were for dry weight: $y = 2193x + 28$ ($n = 35$, $R^2 = 0.8$, MC) and $y = 2718x + 57$ ($n = 35$, $R^2 = 0.83$, APN), for cell numbers: $y = 5 \times 10^{-5}x + 31.7$ ($n = 35$, $R^2 = 0.87$, MC) and $y = 6 \times 10^{-5}x + 72.7$ ($n = 35$, $R^2 = 0.82$, APN), for biovolume: $y = 2716x + 31$ ($n = 35$, $R^2 = 0.89$, MC) and $y = 3154x + 71$ ($n = 35$, $R^2 = 0.85$, APN), where y was the peptide concentration (ng ml^{-1}) and x was the biovolume concentration.

In total 35 strains produced MCs, while 46 strains contained APNs. The cellular concentration of both MC and APN was variable between strains, i.e. the MC and APN contents varied 14-fold and 12-fold, each (excluding the strains lacking MC or APN). In order to find out whether this variability was due to analytical errors or due to strain-specific differences the variability in peptide contents found within the control strain was compared with the variability found between strains (Fig. 2). The variation found between strains was significantly higher when compared with the variation found within the control strain (Mann–Whitney rank sum test, $p < 0.001$).

Peptide contents and peptide composition

In general all three biovolume estimates (dry weight, microscopical determination of cell numbers and microscopical determination of cyanobacterial biovolume) showed highly consistent results (Table 1). The counting of cells under the microscope did not improve the errors of the estimates, which was attributed to the unequal distribution of aggregate forming filaments on the filters as mentioned earlier (Repka *et al.*, 2004). Only the contents related to dry weight are reported in the following.

The contents of MC and APN were found in the same order of magnitude and were 15-fold (MC) or 19-fold (APN) lower (excluding the strains with zero peptide content) when compared with the chlorophyll *a* content (Table 1). The two species differed significantly in chlorophyll *a* content (*P. argardhii*: mean \pm SE, $13.1 \pm 2.4 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW; *P. rubescens*: $8.0 \pm 1.8 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW; *t*-test, $p < 0.001$). No significant difference (*t*-test, $p = 0.124$) in MC content between species was found: Among *P. argardhii* strains the MC content (mean \pm SE, $1.7 \pm 0.3 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW) varied between zero (4 strains) and $4.5 \pm 0.4 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW (No. 31/1), while in *P. rubescens* the MC content (mean \pm SE, $1.2 \pm 0.2 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW) was found to vary between zero (nine strains) and $4.5 \pm 0.4 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW (No. 82). In contrast the

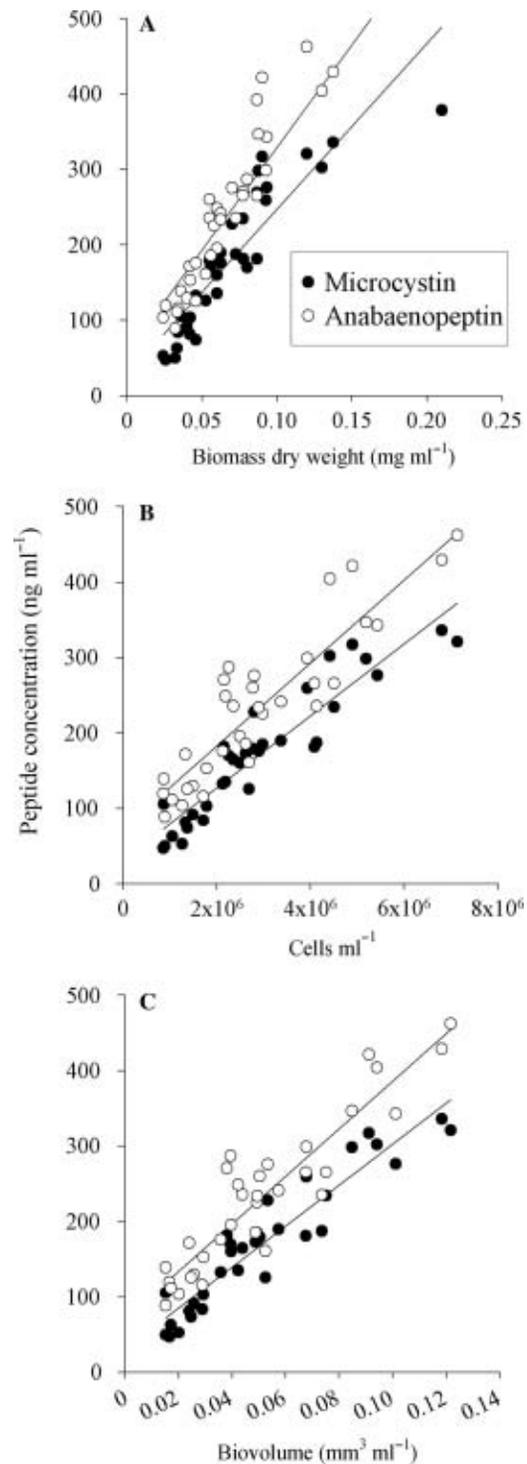


Fig. 1. Relationship between microcystin (MC; black circles) and anabaenopeptin (APN; white circles) concentrations and biovolume of the filamentous cyanobacterium *Planktothrix* strain No. 32. Biovolume was estimated by (A) dry weight (regression coefficients for MC: $R^2 = 0.8$ and APN $R^2 = 0.83$) (B) cell counting (MC: $R^2 = 0.87$ and APN $R^2 = 0.82$) and (C) calculating biovolume from filaments by assuming a cylindrical shape (MC: $R^2 = 0.89$ and APN $R^2 = 0.85$).

APN content differed significantly between species (*P. argardhii*: mean \pm SE, $2.9 \pm 0.4 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW; *P. rubescens*: $5.0 \pm 0.4 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW; *t*-test, $p < 0.001$), while the APN content

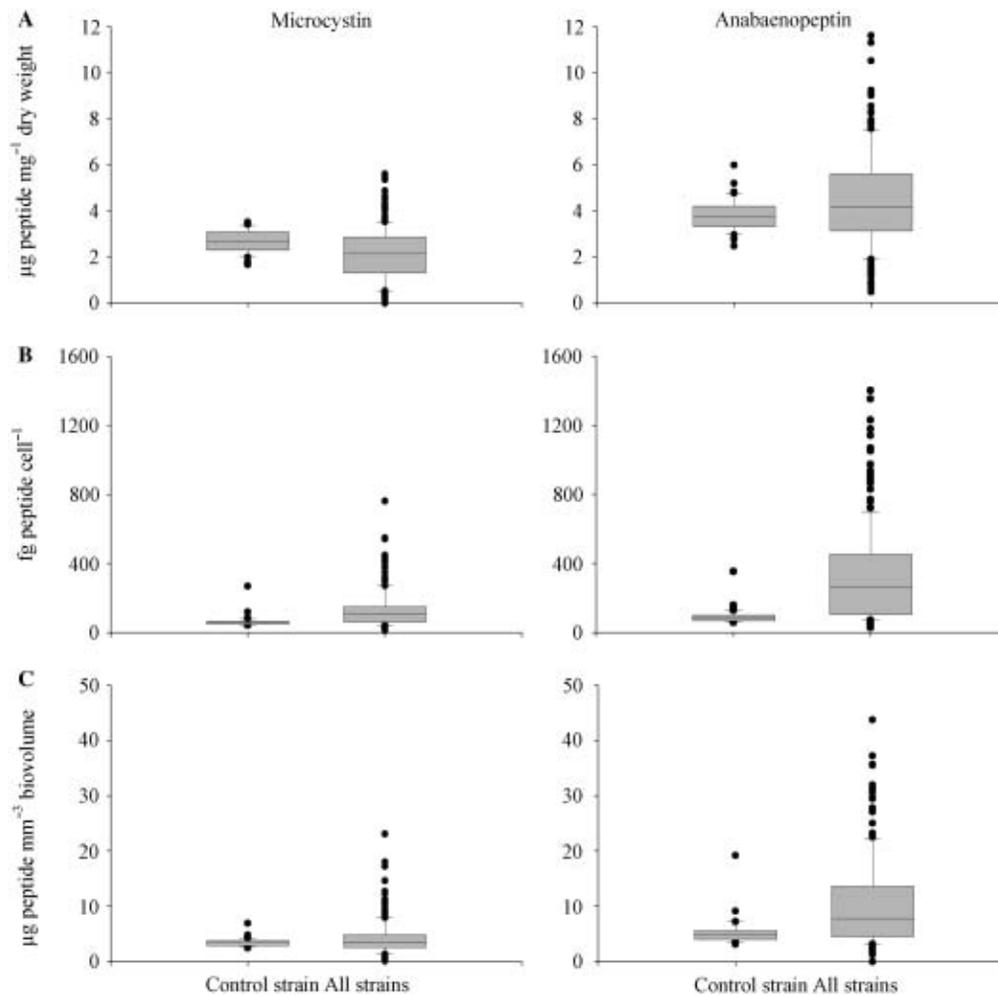


Fig. 2. Variability of microcystin (MC) and anabaenopeptin (APN) contents within the control strain *P. agardhii* No. 32 and between strains of *P. agardhii* and *P. rubescens* ($n = 49$). The control strain was used as a reference during all experiments to standardize for within strain variation. MC/APN content per (A) dry weight (three outliers of APN contents not shown), (B) cells and (C) biovolume (two outliers of APN contents not shown).

ranged from zero (two strains) to $7.2 \pm 0.7 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW (No. 66) in *P. agardhii* and from zero (CCAP 1459/14) to $10.3 \pm 1.3 \mu\text{g mg}^{-1}$ DW (No. 64, Table 1) in *P. rubescens*.

In general, strains contained one or two structural variants of MC, in two strains of *P. agardhii* three variants were found (Table 2). Strains either contained [Asp, Mdha]-MC-RR/[Asp, Dhb]-MC-RR only or [Asp, Mdha]-MC-RR/[Asp, Dhb]-MC-RR paired with lower amounts of [Asp]-MC-LR, and [Asp]-MC-HtyR. A number of strains did not contain any MC-RR but contained [Asp]-MC-HtyR paired with [Asp]-MC-LR. The new MCs [Asp, Dhb]-MC-HtyY and [Asp, Dhb]-MC-HtyHty were never paired with the other MC variants.

Among APNs six different variants were observed (Table 2). The majority of the strains (25 strains) contained APN B, A, F and OSC Y. A few strains contained APN B only (four strains). Ten strains produced two APN variants (APN B and F), while six strains produced three

APN variants [APN B, F, A (8%), APN B, A, OSC Y (4%)]. APN I and J were found in strain CYA 126/8 only.

Extracellular peptide concentrations

All MC-producing *Planktothrix sp.* strains were analysed for extracellular MCs in the culture media ($n = 144$). 77% of the samples were found to contain less than 10% dissolved MCs of total MC content, 91% of the samples contained less than 20% dissolved MCs. On average $8.8 \pm 1.9\%$ of MC were found extracellular. A few strains (No. 70/1a, No. 108, No. 90/1i, CCAP 1459/11A, CCAP 1459/21) showed a higher proportion of dissolved MCs.

As for the MCs, the majority of the APN-producing strains ($n = 168$) contained less than 10% of the dissolved fraction (83%). In 90% of the strains the percentage of the dissolved fraction was <20%. On average $8.4 \pm 1.8\%$ of APN were found extracellular. The amount of extracellular

390

395

400

405

Table 1. Strains of *P. agardhii* and *P. rubescens* analysed for their microcystin (MC), anabaenopeptin (APN) and chlorophyll *a* contents (mean \pm ISE), estimated per dry weight (DW), per cell and per mm³ of biovolume.

Strain	Microcystin						Anabaenopeptin				Chlorophyll <i>a</i>					
	Average filament diameter (μm)	$\mu\text{g mg}^{-1}$ DW	Fg cell ⁻¹	$\mu\text{g mm}^{-3}$ biovolume	Dissolved MC%	$\mu\text{g mg}^{-1}$ DW	Fg cell ⁻¹	$\mu\text{g mm}^{-3}$ biovolume	Dissolved APN%	$\mu\text{g mg}^{-1}$ DW	Pg cell ⁻¹	$\mu\text{g mm}^{-3}$ biovolume	$\mu\text{g mg}^{-1}$ DW	Pg cell ⁻¹	$\mu\text{g mm}^{-3}$ biovolume	<i>n</i> ^c
<i>P. agardhii</i>																
No. 28/2	3.0 \pm 0	0	0	0	0	0.85 \pm 0.1	39 \pm 6	1.65 \pm 0.2	nd	16.7 \pm 1.2	0.77	33.6 \pm 0.1			4	
No. 66	3.2 \pm 0.1	0	0	0	0	7.23 \pm 0.9	248 \pm 42	10.3 \pm 1.4	1.7 \pm 0.3	15.5 \pm 3	0.52 \pm 0.1	21.13 \pm 4.4			3	
CCAP 1459/36 ^b	3.1 \pm 0	0	0	0	0	2.42 \pm 0.3	99 \pm 8	3.91 \pm 0.3	0	10.7 \pm 0.2	0.51 \pm 0	20.64 \pm 0.7			4	
PCC 7811	3.2 \pm 0	0	0	0	0	1.8 \pm 0.8	117 \pm 27	4.41 \pm 0.9	33 \pm 15	nd	nd	nd			4	
PCC 7805	2.7 \pm 0	0	0	0	0		0	0	0	16.9 \pm 2.2	0.62 \pm 0	33.12 \pm 0.3			4	
No. 70/1a	2.8 \pm 0	1.17 \pm 0.1	44 \pm 29	2.42 \pm 1.5	62 \pm 23	2.05 \pm 0.2	67 \pm 34	3.75 \pm 1.7	58 \pm 22	13.0 \pm 0.5	0.64 \pm 0	36.6 \pm 0.2			2	
CCAP 1459/21	5.3 \pm 0.1	1.34 \pm 0.1	124 \pm 16	1.89 \pm 0.2	19 \pm 1.9	4.07 \pm 0.3	371 \pm 43	5.68 \pm 0.6	5.8 \pm 0.6	nd	nd	nd			4	
CCAP 1459/16	5.0 \pm 0.1	1.57 \pm 0.1	148 \pm 17	2.3 \pm 0.2	0	3.65 \pm 0.3	323 \pm 22	5.01 \pm 0.3	0	nd	nd	nd			4	
CCAP 1460/5	4.4 \pm 0.1	1.81 \pm 0.1	123 \pm 28	2.73 \pm 0.7	2.9 \pm 1.4	4.46 \pm 0.4	325 \pm 111	7.29 \pm 2.7	0.6 \pm 0.4	nd	nd	nd			6	
CYA 126/8	2.4 \pm 0	1.93 \pm 0.4	147 \pm 8	9.7 \pm 0.5	3.8 \pm 0.6	2.13 \pm 0.1	209 \pm 67	13.79 \pm 4.4	8.0 \pm 1.2	11.1 \pm 0.8	0.28	19.16			4	
No. 70	2.9 \pm 0.1	1.96 \pm 0.2	312 \pm 127	16.7 \pm 6.4	5.2 \pm 0.1	2.97 \pm 0.1	453 \pm 129	24.32 \pm 6.3	3.7 \pm 0.2	nd	nd	nd			2	
CCAP 1459/11A	5.5 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3	343 \pm 73	4.8 \pm 1.1	20 \pm 3	0	0	0	0	12.0 \pm 1.6	1.62 \pm 0.4	22.4 \pm 5.2			4	
No. 32 ^a	2.9 \pm 0	2.68 \pm 0.1	67 \pm 6	3.78 \pm 0.3	5.7 \pm 1.3	3.83 \pm 0.1	96 \pm 8	5.41 \pm 0.4	0.9 \pm 0.5	12.5 \pm 1.0	0.3 \pm 0	18.22 \pm 2.2			38	
No. 79	3.0 \pm 0	2.75 \pm 0.1	80 \pm 4	3.54 \pm 0.2	9.4 \pm 3.7	4.05 \pm 0.7	116 \pm 15	5.1 \pm 0.6	7.8 \pm 2.4	11.0 \pm 2.4	0.33 \pm 0.1	14.87 \pm 2.4			4	
No. 79/11	2.8 \pm 0	2.77 \pm 0.3	91 \pm 14	5.09 \pm 0.8	14 \pm 6	1.78 \pm 0.4	56 \pm 9	3.13 \pm 0.5	11.4 \pm 4.6	nd	nd	nd			4	
No. 39	3.0 \pm 0	3.19 \pm 0.2	93 \pm 9	4.75 \pm 0.4	8.0 \pm 0.4	4.75 \pm 0.2	141 \pm 17	7.19 \pm 0.7	8.3 \pm 1.7	nd	nd	nd			4	
SAG 6.89	3.3 \pm 0	3.79 \pm 0.9	135 \pm 8	4.96 \pm 0.3	5.3 \pm 3.6	2.73 \pm 0.8	119 \pm 36	4.38 \pm 1.3	0	11.2 \pm 0	0.33 \pm 0	12.34			4	
No. 31/1	2.7 \pm 0	4.46 \pm 0.4	117 \pm 9	7.03 \pm 0.5	10.5 \pm 0.9	4.0 \pm 0.5	106 \pm 17	6.35 \pm 0.9	24 \pm 2.4	nd	nd	nd			4	
<i>P. rubescens</i>																
No. 10	3.1 \pm 0	0	0	0	0	9.75 \pm 1.7	613 \pm 194	27.37 \pm 8.7	2.5 \pm 1.4	10.2 \pm 2.2	0.68 \pm 0.1	29 \pm 7			4	
No. 12/1a	3.6 \pm 0.1	0	0	0	0	4.48 \pm 0.3	333 \pm 63	11.82 \pm 2.2	33 \pm 6.5	6.1 \pm 0.9	0.47 \pm 0.1	16.6 \pm 2.4			4	
No. 40 ^b	4.1 \pm 0.1	0	0	0	0	3.55 \pm 0.3	701 \pm 334	15.48 \pm 7	0	8.4 \pm 0.1	2.67 \pm 1.7	57.6 \pm 37.6			4	

Peptide net production rates and growth in cyanobacteria

No. 65	3.6±0.1	0	0	0	0	4.7±1.2	300±56	10.13±1.8	33±4.3	5.9±0.3	0.61±0.4	20.4±12.5	4
No. 67 ^b	3.0±0	0	0	0	0	7.02±2.2	772±223	31.36±8.7	3.2±3.2	7.2±1.5	1.0±0.2	40.5±13.7	4
No. 91/1 ^b	3.7±0.1	0	0	0	0	5.34±0.6	241±48	14.81±5	3.4±1.7	9.5±0.1	0.4±0.3	18.7±2.7	4
No. 110 ^b	3.3±0.1	0	0	0	0	4.71±0.5	276±45	10.62±1.6	4.0±1.1	nd	nd	nd	4
No. 119	3.6±0.1	0	0	0	0	7.1±0.9	604±153	17.46±4.5	2.5±2.2	10.2±0	1.11±0.3	32.1±9.6	4
No. 160/1a	4.9±0.1	0	0	0	0	2.56±0.2	263±125	4.18±1.8	16±2	nd	nd	nd	2
PCC 7821	2.9±0.1	0.32±0.1	28±3	1.23±0.1	0	3.3±0.6	295±51	12.89±2.2	5.5±0.3	4.8±1.6	0.58	25.22	4
No. 59	5.0±0.1	0.33±0.1	34±12	0.51±0.2	7.0±4.1	3.91±0.4	472±150	7.04±2.1	5.9±1	nd	nd	nd	4
No. 60	4.8±0.1	0.37±0	34±5	0.65±0.1	1.7±1.7	3.96±0.2	390±82	7.41±1.7	2.0±1.3	5.6±1.2	0.45±0.1	8.24±1.3	4
No. 14/1a	3.4±0.1	0.53±0	30±6	1.18±0.3	0	4.89±0.1	262±28	10.36±1.3	2.7±1	nd	nd	nd	4
No. 80	3.3±0.1	0.58±0	27±6	1.11±0.3	11.1±3.2	5.85±0.3	277±83	11.48±3.7	2.2±2.2	6.0±1.3	0.3±0	12.62±1.3	2
No. 108	5.4±0.1	0.71±0	nd	nd	22.7±12	2.01±0.1	nd	nd	28±11	nd	nd	nd	2
No. 21/2	4.2±0.1	0.78±0.2	100±25	2.29±0.5	2.1±1.3	4.07±0.1	498±83	11.29±1.5	2.1±0.7	nd	nd	nd	4
No. 90/1i	3.2±0.1	0.84±0.2	105±26	4.85±1.2	25±1.9	5.66±0.9	728±191	33.47±8.4	27±1	nd	nd	nd	4
No. 64	4.2±0.1	0.89±0.1	101±11	2.15±0.1	4.5±1.7	10.32±1.3	1156±129	24.66±1.7	3.5±0.2	10.1±0.1	1.12±0.0	24.1±0.8	4
CCAP 1459/24	4.7±0.1	1.36±0.4	219±33	3.88±0.6	5.5±1.3	2.33±0.3	390±58	6.9±1	0	8.2±1	1.55±0.3	28.2±5.7	2
No. 72	3.4±0.1	1.41±0.1	87±4	3.45±0.1	2.7±0.2	8.62±0.9	527±38	21.47±2.2	2.3±0.4	nd	nd	nd	4
No. 118	4.3±0.1	1.47±0.2	212±23	4.32±0.5	6.3±1.8	6.48±0.8	950±120	19.45±2.8	4.0±1.2	nd	nd	nd	3
No. 241	4.1±0.1	1.40±0.2	113±9	2.73±0.3	4.2±0.4	6.51±0.4	536±19	12.95±0.9	0	8.9±1	0.8±0.1	18.0±1.7	3
No. 240	4.5±0.1	1.69±0.1	177±31	3.53±0.6	4.2±2.4	4.56±0.5	484±118	9.68±2.2	2.8±2.8	nd	nd	nd	4
No. 111	3.4±0.1	2.21±0.2	225±76	8.38±3	3.1±0.5	7.23±0.5	798±335	29.83±13.2	1.8±1.1	7.5±0.4	1.07±0.6	40.3±23.6	4
No. 3	3.4±0.1	2.25±0.2	136±6	4.75±0.2	4.6±2.0	5.93±0.6	420±79	14.73±2.9	7.0±3.1	nd	nd	nd	4
No. 113/1b	3.8±0	2.36±0.4	105±12	3.1±0.4	2.9±1.4	6.29±1.1	322±122	9.53±3.7	4.9±1.1	nd	nd	nd	3
No. 247	3.6±0.1	2.41±0.3	116±17	3.78±0.5	4.2±0.3	1.97±0.2	95±14	3.09±0.4	6.2±1.1	7.2±1.5	0.36±0	12.2±0.1	4
CCAP 1459/14	4.1±0.1	2.7±0.2	212±78	5.71±2.0	6.1±0.3	0	0	0	0	9.2±0.9	0.44±0.3	12.4±7.9	4
No. 21-	4.2±0	2.92±0.4	334±25	7.18±0.6	2.8±0.6	3.74±0.5	463±109	9.86±2.3	0	10.8±1.8	1.29±0.1	27.6±2.2	2
CCAP 1459/30	3.2±0.1	3.38±0.6	185±49	7.42±2.0	4.0±0.9	6.83±2	426±180	17.3±7.2	6.5±2	nd	nd	nd	4
No. 82	4.0±0.1	4.51±0.4	857±399	20.6±9.2	12.3±5.1	2.82±1	442±170	10.9±4	10.5±9.2	9.0±0.3	1.05	23.56	4

Notes: Within species the strains were ordered according to the amount of MC produced (second column, µg MC per mg DW). nd: not determined.

^aStrain No. 32 was included as a control when performing the growth experiments with all the other strains.

^bStrains containing the microcystin biosynthesis gene cluster which became inactive due to mutations, for example due to the insertion of mobile elements (Christiansen *et al.*, 2006).

^cn, number of parallels for MC/APN measurements.

Table 2. Proportion of intracellular microcystin (MC) and anabaenopeptin (APN) variants (mean \pm 1 SE) in *P. agardhii* and *P. rubescens* strains.

Strain	MC variants (%)						APN variants (%)					
	[Asp, Mdh]- MC-RR ^a	[Asp, Dhb]-MC-RR ^b	[Asp]-MC-HtyR ^c	[Asp]-MC-LR ^d	[Asp, Dhb]- MC-HtyY/Hty ^{e,f}		APN B ^g	APN J ^h	APN F ⁱ	APN A ^j	APN I ^k	OSC Y ^l
<i>P. agardhii</i>												
No. 28/2	0	0	0	0	0	100 \pm 0	0	0	0	0	0	0
No. 66	0	0	0	0	0	63.7 \pm 5.5	0	36.3 \pm 5.5	0	0	0	0
CCAP 1459/36	0	0	0	0	0	22.0 \pm 2.1	0	32.5 \pm 0.6	17.0 \pm 0.9	0	0	28.6 \pm 2.2
PCC 7811	0	0	0	0	0	13.1 \pm 0.7	0	35.2 \pm 1.6	12.9 \pm 1.3	0	0	38.7 \pm 1.6
PCC 7805	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 70/1a	0	91.0 \pm 9.0	0	9.0 \pm 9.0	0	34.3 \pm 0.7	0	32.6 \pm 6.9	33.1 \pm 6.2	0	0	0
CCAP 1459/21	0	100 \pm 0	0	0	0	90.3 \pm 0.3	0	0	7.9 \pm 0.3	0	0	1.8 \pm 0.2
CCAP 1459/16	0	0	71.7 \pm 1.7	28.3 \pm 1.7	0	89.1 \pm 1.4	0	0	9.7 \pm 0.7	0	0	1.1 \pm 0.7
CCAP 1460/5	0	0	76.0 \pm 1.8	24.0 \pm 1.8	0	86.1 \pm 0.5	0	0.3 \pm 0.2	11.5 \pm 0.6	0	0	2.2 \pm 0.5
CYA 126/8	71.0 \pm 1.7	0	0	29.0 \pm 1.7	0	0	37.9 \pm 1.6	0	0	62.1 \pm 1.6	0	0
No. 70	0	84.2 \pm 0.6	0	15.8 \pm 0.6	0	33.3 \pm 5.0	0	35.3 \pm 8.9	31.3 \pm 3.9	0	0	0
CCAP 1459/11A	0	100 \pm 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 32	73.7 \pm 0.3	0	0	26.3 \pm 0.3	0	24.9 \pm 1.1	0	44.2 \pm 2.0	27.9 \pm 0.9	0	0	3.0 \pm 0.3
No. 79	84.8 \pm 0.6	0	0	15.2 \pm 0.6	0	16.1 \pm 1.9	0	4.3 \pm 0.4	28.3 \pm 5.3	0	0	51.3 \pm 5.6
No. 79/11	82.2 \pm 0.7	0	0	17.8 \pm 0.7	0	28.8 \pm 0.9	0	2.1 \pm 2.1	69.1 \pm 1.5	0	0	0
No. 39	72.8 \pm 0.2	0	0	27.4 \pm 0.2	0	28.9 \pm 1.0	0	71.1 \pm 1.0	0	0	0	0
SAG 6.89	73.4 \pm 0.2	0	1.5 \pm 0.8	25.2 \pm 0.9	0	16.8 \pm 4.4	0	29.6 \pm 1.9	14.7 \pm 0.3	0	0	39.0 \pm 6.5
No. 31/1	65.5 \pm 1.1	0	3.0 \pm 0.4	31.4 \pm 1.2	0	8.3 \pm 0.7	0	30.9 \pm 1.0	16.8 \pm 1.1	0	0	44.0 \pm 1.9
<i>P. rubescens</i>												
No. 10	0	0	0	0	0	40.0 \pm 1.8	0	16.1 \pm 0.9	26.7 \pm 2.1	0	0	17.2 \pm 0.6
No. 12/1a	0	0	0	0	0	35.5 \pm 0.7	0	23.1 \pm 2.0	20.8 \pm 1.1	0	0	20.6 \pm 1.2
No. 40	0	0	0	0	0	32.2 \pm 1.4	0	67.8 \pm 1.4	0	0	0	0
No. 65	0	0	0	0	0	35.2 \pm 1.1	0	26.2 \pm 1.3	17.3 \pm 1.7	0	0	21.3 \pm 1.0
No. 67	0	0	0	0	0	74.2 \pm 0.3	0	0.8 \pm 0.1	25.0 \pm 0.3	0	0	0

Peptide net production rates and growth in cyanobacteria

No. 91/1	0	0	0	0	29.8±0.4	0	21.6±0.6	26.1±0.8	0	22.5±0.4
No. 110	0	0	0	0	53.6±3.1	0	20.8±1.2	8.7±0.5	0	16.9±1.6
No. 119	0	0	0	0	36.0±0.6	0	19.2±1.3	24.0±1.1	0	20.8±0.8
No. 160/1a	0	0	0	0	14.5±0.5	0	85.4±0.5	0	0	0
PCC 7821	0	100±0	0	0	5.6±0.4	0	12.2±1.1	20.9±1.9	0	61.2±1.7
No. 59	0	0	0	100±0	100±0	0	0	0	0	0
No. 60	0	0	0	100±0	99.6±0.4	0	0.4±0.4	0	0	0
No. 14/1a	0	0	0	100±0	100±0	0	0	0	0	0
No. 80	0	0	0	100±0	100±0	0	0	0	0	0
No. 108	0	100±0	0	0	47.8±2.9	0	52.2±2.9	0	0	0
No. 21/2	0	0	0	0	37.1±3.2	0	62.9±3.2	0	0	0
No. 90/1i	100±0	0	0	0	21.5±0.6	0	26.9±0.8	18.0±2.0	0	33.6±1.8
No. 64	100±0	0	0	0	28.6±1.1	0	36.9±1.7	29.1±2.4	0	5.5±0.3
CCAP 1459/24	0	78.4±2.1	0	0	9.6±1.0	0	52.0±1.0	2.8±0.9	0	35.6±0.7
No. 72	100±0	0	0	0	28.9±0.6	0	71.1±0.6	0	0	0
No. 118	0	80.5±1.7	0	0	6.2±0.4	0	20.3±0.8	19.8±2.8	0	53.7±2.7
No. 241	100±0	0	0	0	27.5±2.8	0	62.4±2.8	3.5±0.4	0	6.6±0.6
No. 240	100±0	0	0	0	34.2±0.6	0	38.0±1.0	10.5±1.1	0	17.2±0.8
No. 111	100±0	0	0	0	37.6±0.9	0	21.5±0.9	21.3±0.2	0	19.6±0.3
No. 3	100±0	0	0	0	37.8±1.9	0	22.2±1.1	19.5±1.4	0	20.5±0.8
No. 113/1b	100±0	0	0	0	36.5±0.9	0	26.0±3.6	24.8±1.0	0	12.7±5.0
No. 247	0	79.9±0.5	0	0	12.7±2.2	0	87.3±2.2	0	0	0
CCAP 1459/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 21-	0	0	0	0	27.0±3.4	0	73.0±3.4	0	0	0
CCAP 1459/30	0	39.4±0.9	0	0	3.0±1.0	0	36.0±6.4	8.7±0.8	0	52.3±6.6
No. 82	0	90.0±1.1	0	0	11.1±0.5	0	22.3±3.8	16.6±3.1	0	50.0±1.5

^a[D-Asp, Mdha]-MC-RR, *m/z* 1024, ^b[D-Asp, Dhh]-MC-RR, *m/z* 1024; ^cMC-LR, *m/z* 995; ^d[Asp, Dhh]-MC-Hty, *m/z* 1074; ^e[Asp, Dhh]-MC-Hty, *m/z* 1088; ^fAPN B, *m/z* 836; ^gAPN J, *m/z* 909; ^hAPN F, *m/z* 850; ⁱAPN A, *m/z* 843; ^kAPN I, *m/z* 916; ^lOSC Y, *m/z* 858.

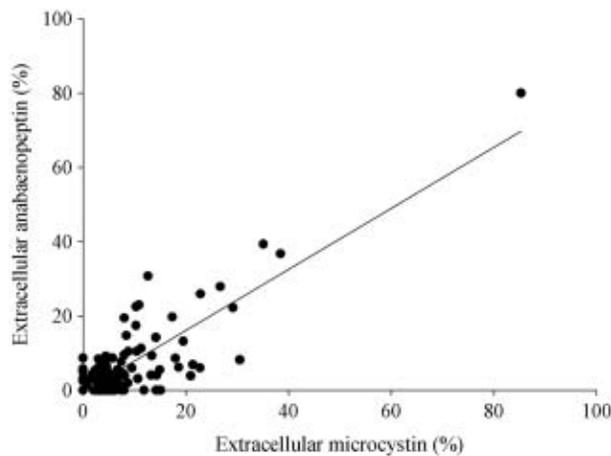


Fig. 3. Correlation of the percentages of extracellular microcystin and anabaenopeptin concentrations in *Planktothrix* strains ($R^2=0.77$).

MC and APN showed a significant positive correlation $y = 0.82x - 0.36$ ($R^2 = 0.77$, Fig. 3). The acid ratio as determined for the chlorophyll *a* content was used to infer the physiological status and a possible peptide leakage of deteriorating cells in the cultures. Some strains (No. 70/1a, No. 82) showed high extracellular peptide concentrations paired with a high $A/A_a > 1.7$ and no correlation was found between the amount of extracellular peptide concentration and the acid ratio. Therefore a passive leakage of MC and APN in consequence to cell death was considered to be of minor importance.

Microcystin content in dependence on the anabaenopeptin content

The majority of the strains (41/49) contained significantly higher amounts of APN when compared with MC (Mann-Whitney rank sum test, $p < 0.001$). One strain produced neither MC nor APN, five strains contained equal amounts of MC and APN (no statistically significant difference), while two strains contained MC only. Except of strain PCC 7805 all strains without detectable MC contained APN.

MC-producing strains were divided into five groups according to their MC content (Fig. 4). Those groups were found to differ significantly in MC content (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $p < 0.001$). The APN content (intracellular and extracellular) varied independently from the MC content (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $p = 0.62$).

Cellular growth rate and peptide net production rate

The growth rates among all the strains varied 5-fold as calculated from dry weight (min-mean \pm SE-max: $0.07 - 0.2 \pm 0.01 - 0.33$),

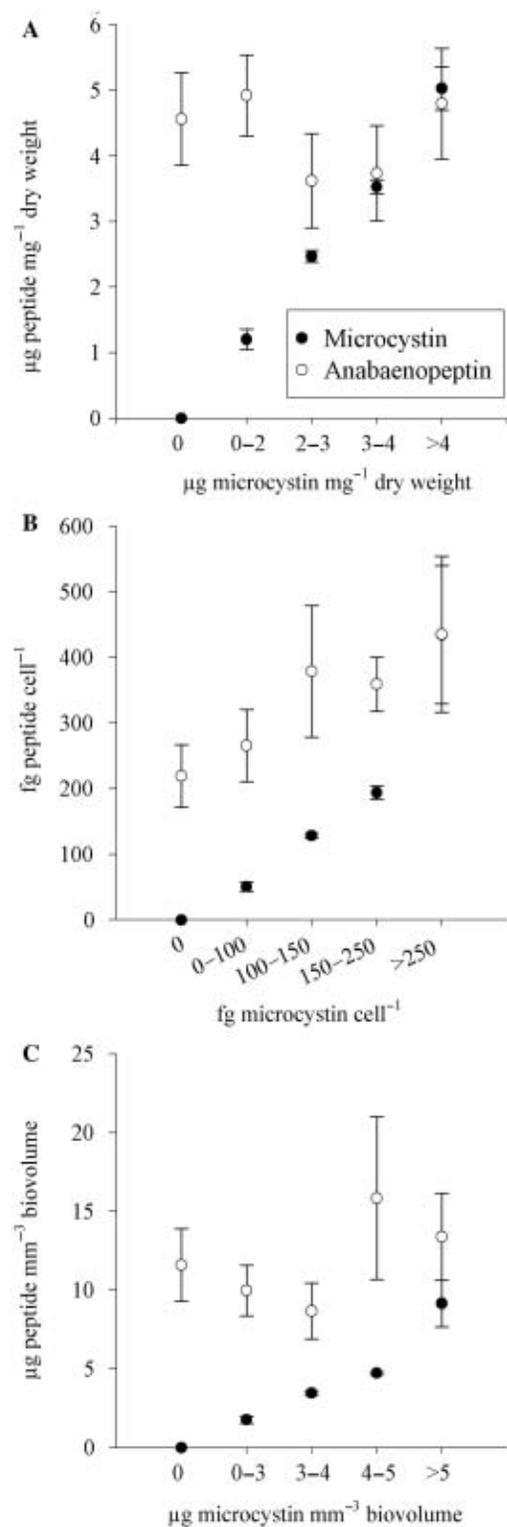


Fig. 4. Total microcystin and anabaenopeptin contents (mean \pm SE) in (A) $\mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight, (B) fg peptide cell^{-1} and (C) $\mu\text{g mm}^{-3}$ biovolume of *Planktothrix* strains, divided into five groups according to their microcystin contents.

however, 21-fold as calculated from cell numbers ($0.03 - 0.29 \pm 0.02 - 0.64$) and 24-fold as calculated from biovolume ($0.03 - 0.29 \pm 0.02 - 0.64$). The growth rates of the 18 *P. agardhii* strains (DW: $0.07 - 0.18 \pm 0.01 - 0.28$; cell numbers:

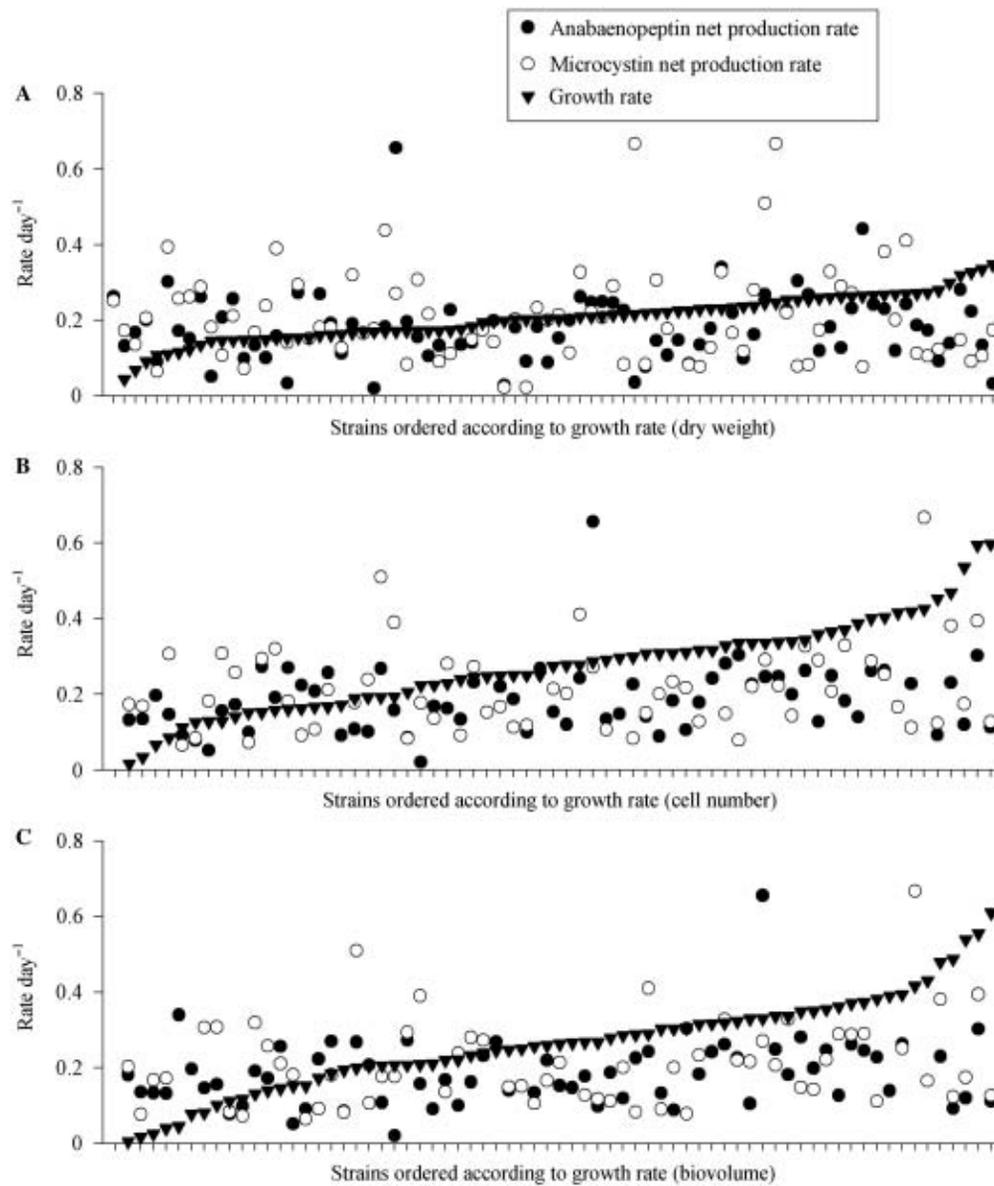


Fig. 5. Growth rates (black triangles) and corresponding peptide production rates (microcystin, white circles and anabaenopeptin, black circles) for 49 *Planktothrix* strains measured under maximum growth rate conditions. Cell growth rates were estimated from (A) dry weight, (B) cell numbers and (C) biovolume.

0.11–0.27 ± 0.03–0.64; biovolume: 0.12–0.27 ± 0.03–0.64) did not differ significantly from the growth rates as measured for the 31 *P. rubescens* strains (DW: 0.13–0.20 ± 0.01–0.33; cell numbers: 0.03–0.30 ± 0.02–0.6; biovolume: 0.03–0.30 ± 0.02–0.61).

The MC and APN net production rates varied up to 19-fold (min-mean ± SE-max, MC: 0.02–0.25 ± 0.01–0.42, APN: 0.03–0.18 ± 0.01–0.66). There was no difference found between the peptide net production rates of *P. agardhii* and *P. rubescens*. Among all strains the peptide net production rates varied independently from the variation in cellular growth rates (Fig. 5), i.e. fast growing strains did not show higher peptide production rates when compared with slow growing strains or *vice versa*. There was also no difference found

between the growth rates of MC/APN-producing strains and those containing no MC/APN.

Discussion

In this study an attempt was made to find a relationship between peptide net production and cell division rates between strains. The growth conditions at the temperature and light conditions used in this study (20°C, 40–60 μmol m⁻² s⁻¹) were not optimal for all the strains and a significant intraspecific variation in maximal-specific growth rates has been observed. While such an intraspecific variation has been found earlier (Van Liere & Mur, 1980; Davis & Walsby, 2002) the general understanding of factors causing this intraspecific variation in growth under

470

475

480

identical experimental conditions in the laboratory is not complete. Mikkola & Kurland (1992) explained a threefold intraspecific variation in growth rates (0.48–1.43 doublings h^{-1}) among natural isolates of *Escherichia coli* by strain-specific differences in translational efficiency. The same authors were able to select for highest growth rates (1.33 doublings h^{-1}) under continuous culture conditions over 280 generations implying that selection for faster growth rates under nutrient poor conditions in nature is of minor importance when compared with the nutrient rich conditions in the laboratory.

However, to accept or to reject the hypothesis that the growth rate is related to peptide net production not only within a strain but between strains it is not necessary to find out the maximum intrinsic growth rate for each strain. According to the conclusions proposed by Orr & Jones (1998) a slow growing strain can be expected to show an increase in peptide net production if the real maximum intrinsic growth rate would have been found. In contrast to the results observed by Orr & Jones (1998), in this study a linear relationship between the peptide net production rate and the cellular growth rate obtained from all strains could not be found. Indeed strains growing fast had both low and high MC and APN contents and MC and APN production rates (Fig. 5). It is known that NRPS are large multi-enzyme complexes synthesizing peptides by the thio-template-directed mechanism, independent of the ribosomal peptide synthesis pathway (Marahiel *et al.*, 1997). Typically, secondary metabolites such as antibiotics synthesized via NRPS are then actively exported out of the cell and thought to enhance the competitiveness or confer resistance to the producer itself (see Pearson *et al.*, 2004 for a review). In contrast for MCs export has not been observed (Wiedner *et al.*, 2003; Tonk *et al.*, 2005; Rohrlack & Hyenstrand, 2007) and higher extracellular concentrations have only been reported from dense cultures making it impossible to differentiate between passive leakage and active export of MC. Accordingly in this study the average dissolved peptide concentrations were found to make up less than 10% of the total peptide contents. Instead cyanobacteria seem to accumulate MC and other peptides in certain cell regions, i.e. immunogold labelling revealed preferential localization of MCs in thylakoids and in the periphery of polyphosphate bodies (Shi *et al.*, 1995; Young *et al.*, 2005). Recently a binding of MCs and cyanopeptolins to phycobiliproteins situated onto the thylakoid membranes has been reported (Jüttner & Lüthi, in press). It is concluded that the frequently observed relationship between cell division and MC net production rate is rather the result of an

accumulation of MCs in specific cell compartments rather than due to a direct dependence of MC synthesis on the processes involved in the cell-division cycle.

From the results of this study it follows that the variation in the cellular growth rate is independent from the increase/decrease of the MC/APN production. Indeed the insertional inactivation of the MC synthesis by a gene knock-out experiment in *Microcystis* did not lead to a measurable difference in growth rate under various light conditions (4–110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) as compared with the wild type (Hesse *et al.*, 2001). Correspondingly, the knock-out mutant lacking anabaenopeptilide in *Anabaena* strain 90 did not show increased growth rates of the mutant when compared with the wild type (Repka *et al.*, 2004). In this study, several strains containing the total *mcy* gene cluster (CCAP 1459/36, No. 40, No. 67, No. 91/1, No. 110) but inactive in MC synthesis due to the insertion of a transposable element (Christiansen *et al.*, 2006), did not show higher growth rates when compared with the other MC-producing strains. Consequently, costs related to MC production and of other NRS peptides at the post-translational level should not be considered to be a factor influencing cellular growth rates and potential competitive replacement between MC-producing and non-MC-producing strains. Rather the deletion of NRPS gene clusters or larger parts of it may provide sufficient physiological advantage by reducing the genome size, as the selection coefficient on small deletions is considered negligible (Mira *et al.*, 2001). In fact subcultures of strains of *Microcystis* that lost a larger part of the MC synthesis gene cluster (>34 kbp) have been observed to succeed the MC-producing original strain (Schatz *et al.*, 2005).

In summary, peptide contents and growth rates between strains are highly variable and independent of each other. No relationship of MC net production with regard to the life-form of both species *P. agardhii* and *P. rubescens* could be found, implying that MC is not directly related with the ecological divergence observed (Reynolds *et al.*, 2002). Most studies so far were based on the genus *Microcystis*, however, as argued by one referee, there is no reason to assume principal differences between the two genera with regard to the results obtained in this study. For the purpose of comparing estimates of MC cell contents between partners of the EU-project PEPCY (www.pepcy.de, Nov 2002–June 2006), *Microcystis* strain PCC 7806 has been analysed when grown in O_2 medium (Van Liere & Mur 1978) but under otherwise identical conditions as for *Planktothrix*. For three parallels the results were $3.6 \pm 0.3 \mu\text{g MC}$

mg⁻¹ DW, 71 ± 12 fg MC cell⁻¹, 1.9 ± 0.3 µg MC mm⁻³ biovolume with 10 ± 1.4% of dissolved MC. This result compares with other studies on *Microcystis* cellular MC contents (Wiedner *et al.*, 2003, Saker *et al.*, 2005).

It is emphasized that the intraspecific differences in cellular growth rate have been observed in nutrient-rich media in the laboratory and the relevance of those differences in strain-specific growth rates under natural conditions has not been documented. To date, the influence of strain-specific growth rates on the varying abundance of MC-producing and non-MC-producing genotypes in the environment remains speculative (Sivonen & Jones, 1999) and aside from genotype-specific growth rates as a consequence of ecological divergence other factors such as genotype-specific losses due to bacteriophages or algae-lysing bacteria need to be considered. First results, however, rather point to a coexistence of genotypes differing in peptide production that can last for years (Christiansen *et al.*, 2006) or even decades (Guljamow *et al.*, 2007).

Acknowledgements

We thank Judith Blom (University of Zürich, Institute of Plant Biology) and Benjamin Philmus, Thomas Hemscheidt (University of Hawaii at Manoa, Department of Chemistry) for kindly providing standards. We are grateful to Guntram Christiansen for helpful discussions. We also thank Martin Welker (TU Berlin) for MALDI-TOF analysis of fractionated HPLC peaks. Inge Flieger (Federal Environmental Agency, Berlin) gave advice for the recovery experiments of dissolved MC. The text has been improved by the comments of two anonymous referees. This study was financed by grants of the Austrian Science Funds to R. K.

References

- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMAREK, J. (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes, 3-Oscillatoriales. *Algol. Stud.*, **50–53**: 327–472.
- BEARD, S.J., DAVIS, P.A., IGLESIAS-RODRIGUEZ, D., SKULBERG, O.M. & WALSBY, A.E. (2000). Gas vesicle genes in *Planktothrix* spp. from Nordic lakes: strains with weak gas vesicles possess a longer variant of *gvpC*. *Microbiology*, **146**: 2009–2018.
- BOLCH, C.J.S., BLACKBURN, S.I., JONES, G.J., ORR, P.T. & GREWE, P.M. (1997). Plasmid content and distribution in the toxic cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing *ex* Lemmermann (Cyanobacteria: Chroococcales). *Phycologia*, **36**: 6–11.
- CARMICHAEL, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**: 445–459.
- CHRISTIANSEN, G., FASTNER, J., ERHARD, M., BÖRNER, T. & DITTMANN, E. (2003). Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J. Bacteriol.*, **185**: 564–572.
- CHRISTIANSEN, G., KURMAYER, R., LIU, Q. & BÖRNER, T. (2006). Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 117–123.

- CODD, G.A., BELL, S.G., KAYA, K., WARD, C.J., BEATTIE, K.A. & METCALF, J.S. (1999). Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur. J. Phycol.*, **34**: 405–415.
- DAVIS, P.A. & WALSBY, A.E. (2002). Comparison of measured growth rates with those calculated from rates of photosynthesis in *Planktothrix* spp. isolated from Blelham Tarn, English Lake District. *New Phytol.*, **156**: 225–239.
- DAVIS, P.A., DENT, M., PARKER, J., REYNOLDS, C.S. & WALSBY, A.E. (2003). The annual cycle of growth rate and biomass change in *Planktothrix* spp. in Blelham Tarn, English Lake District. *Freshwat. Biol.*, **48**: 852–867.
- FUJII, K., SIVONEN, K., NAKANO, T. & HARADA, K. (2002). Structural elucidation of cyanobacterial peptides encoded by peptide synthetase gene in *Anabaena* species. *Tetrahedron*, **58**: 6863–6871.
- GKELIS, S., LANARAS, T. & SIVONEN, K. (2006). The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from greek freshwaters. *Aquat. Toxicol.*, **78**: 32–41.
- GULJAMOW, A., JENKE-KODAMA, H., SAUMWEBER, H., OUILLET, P., FRANGEUL, L., CASTETS, A.M., BOUCHIER, C., TANDEAU DE MARSAC, N. & DITTMANN, E. (2007). Horizontal gene transfer of two cytoskeletal elements from a eukaryote to a cyanobacterium. *Curr. Biol.*, **17**: R757–R759.
- HALSTVEDT, C.B., ROHRLACK, T., ANDERSEN, T., SKULBERG, O. & EDVARDSEN, B. (2007). Seasonal dynamics and depth distribution of *Planktothrix* spp. in Lake Steinsfjorden (Norway) related to environmental factors. *J. Plankton Res.*, **29**: 471–482.
- HARADA, K., FUJII, K., SHIMADA, T. & SUZUKI, M. (1995). Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525–17. *Tetrahedron Lett.*, **36**: 1511–1514.
- HESSE, K., DITTMANN, E. & BÖRNER, T. (2001). Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **37**: 39–43.
- ITOU, Y., SUZUKI, S., ISHIDA, K. & MURAKAMI, M. (1999). Anabaenopeptins G and H, potent carboxypeptidase A inhibitors from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-595). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**: 1243–1246.
- JÜTTNER, F. & LÜTHI, H. Topology and enhanced toxicity of bound microcystins in *Microcystis* PCC 7806 *Toxicon*, in press.
- KOHL, J. & NICKLISCH, A. (1988). *Ökophysiologie der Algen. Wachstum und Ressourcennutzung*. Urban & Fischer, Stuttgart, Germany.
- KURMAYER, R., CHRISTIANSEN, G., FASTNER, J. & BÖRNER, T. (2004). Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ. Microbiol.*, **6**: 831–841.
- KURMAYER, R., CHRISTIANSEN, G., GUMPENBERGER, M. & FASTNER, J. (2005). Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology*, **151**: 1525–1533.
- LONG, B.M., JONES, G.J. & ORR, P.T. (2001). Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 278–283.
- LORENZEN, C.J. (1967). Determination of chlorophyll and pheopigments – spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 343–346.
- MARAHIEL, M.A., NAKANO, M.M. & ZUBER, P. (1993). Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.*, **7**: 631–636.
- MARAHIEL, M.A., STACHELHAUS, T. & MOOTZ, H.D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.*, **97**: 2651–2673.
- MIKKOLA, R. & KURLAND, C.G. (1992). Selection of laboratory wild-type phenotype from natural isolates of *Escherichia coli* in chemostats. *Mol. Biol. Evol.*, **9**: 394–402.
- MIRA, A., OCHMAN, H. & MORAN, N.A. (2001). Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet.*, **17**: 589–596.

- ORR, P.T. & JONES, G.J. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 1604–1614.
- 730 PEARSON, L.A., HISBERGUES, M., BÖRNER, T., DITTMANN, E. & NEILAN, B.A. (2004). Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 6370–6378.
- 735 REPKA, S., KOIVULA, M., HARJUNPÄ, V., ROUHIAINEN, L. & SIVONEN, K. (2004). Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the cyanobacterium *Anabaena* strain 90 and its anabaenopeptilide mutant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 4551–4560.
- 740 REYNOLDS, C., HUSZAR, V., KRUK, C., NASELLI-FLORES, L. & MELO, S. (2002). Towards a functional classification of the fresh-water phytoplankton. *J. Plankton Res.*, **24**: 417–428.
- RIPPKA, R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria. *Meth. Enzymol.*, **167**: 3–27.
- 745 ROHRLACK, T. & HYENSTRAND, P. (2007). Fate of intracellular microcystins in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia.*, **46**: 277–283.
- SAKER, M., FASTNER, J., DITTMANN, E., CHRISTIANSEN, G. & VASCONSELOS, V. (2005). Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river. *J. Appl. Microbiol.*, **99**: 749–757.
- 750 SCHATZ, D., KEREN, Y., HADAS, O., CARMELI, S., SUKENIK, A. & KAPLAN, A. (2005). Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains. *Environ. Microbiol.*, **7**: 798–805.
- 755 SHI, L., CARMICHAEL, W.W. & MILLER, I. (1995). Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Arch. Microbiol.*, **163**: 7–15.
- SIVONEN, K. & JONES, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (CHORUS, I. and BARTRAM, J., editors), 41–112. E & FN Spon, London, UK.
- 760 SKULBERG, O.M. & SKULBERG, R. (1985). Planktic species of *Oscillatoria* (Cyanophyceae) from Norway. Characterisation and classification. *Algol. Stud.*, **38/39**: 157–174.
- 765 SUDA, S., WATANABE, M.M., OTSUKA, S., MAHAKAHANT, A., YONGMANITCHAI, W., NOPARTNARAPORN, N., LIU, Y. & DAY, J.G. (2002). Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**: 1577–1595.
- 770 TILLET, D., DITTMANN, E., ERHARD, M., VON DÖHREN, H., BÖRNER, T. & NEILAN, B.A. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.*, **7**: 753–764.
- 775 TONK, L., VISSER, P., CHRISTIANSEN, G., DITTMANN, E., SNELDFER, E., WIEDNER, C., MUR, L. & HUISMAN, J. (2005). The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 5177–5181.
- 780 VAN LIERE, L. & MUR, L.R. (1978). Light-limited cultures of the blue-green alga *Oscillatoria agardhii*. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.*, **21**: 158–167.
- VAN LIERE, L. & MUR, L.R. (1980). Occurrence of *Oscillatoria agardhii* and some related species, a survey. *Develop. Hydrobiol.*, **2**: 67–77.
- 785 WELKER, M. & ERHARD, M. (2007). Consistency between chemotyping of single filaments of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) by MALDI-TOF and the peptide patterns of strains determined by HPLC-MS. *J. Mass Spec.*, **42**: 1062–1068.
- 790 WELKER, M., CHRISTIANSEN, G. & VON DÖHREN, H. (2004). Diversity of coexisting *Planktothrix* (cyanobacteria) chemotypes deduced by mass spectral analysis of microcystins and other oligopeptides. *Arch. Microbiol.*, **182**: 288–298.
- 795 WHO (2004). *Guidelines for Drinking-Water Quality*, Vol. 1, *Recommendations* (3rd edition). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WIEDNER, C., VISSER, P., FASTNER, J., METCALF, J.S., CODD, G.A. & MUR, L.R. (2003). Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 1475–1481.
- 800 WRIGHT, S.W., JEFFREY, S.W., MANTOURA, R.F.C., LLEWELLYN, C.A., BJORNLAND, T., REPETA, D. & WELSCHEMEYER, N. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **77**: 183–196.
- 805 YOUNG, F., THOMPSON, C., METCALF, J., LUCOCO, J. & CODD, G. (2005). Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *J. Struct. Biol.*, **151**: 208–214.

Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp.

SIMONE KOSOL, JOHANNA SCHMIDT AND RAINER KURMAYER

Table 3. *Planktothrix* strains used in this study and ordered as in Table 1.

Strain	Origin	Growth rate per day in phase 1	Growth rate per day in phase 2	Growth rate per day in phase 3
<i>P. agardhii</i>				
No. 28/2	Wannsee, DE	0.32 ± 0	0.2 ± 0	0.09 ± 0
No. 66	Jägerteich, AT	0.28 ± 0.1	0.27 ± 0	0.10 ± 0
CCAP 1459/36 ^{a,d}	Gjersjoen, NO	0.3 ± 0	0.32 ± 0	0.05 ± 0
PCC 7811 ^b	Tassigny, FR	0.25 ± 0	0.16 ± 0	0.10 ± 0
PCC 7805	Veluwemeer, NL	0.32 ± 0	0.20 ± 0	0.09 ± 0
No. 70/1a	Lake Arsö, DK	0.25 ± 0.1	0.18 ± 0.1	0.08 ± 0.1
CCAP 1459/21	Esthwaite Water, UK	0.24 ± 0.1	0.20 ± 0.1	0.06 ± 0
CCAP 1459/16	Blelham Tarn, UK	0.35 ± 0	0.07 ± 0.1	0.09 ± 0
CCAP 1460/5	Kasumigaura, JP	0.27 ± 0	0.13 ± 0	0.09 ± 0
CYA 126/8	Langsjön, FI	0.41 ± 0	0.28 ± 0.1	0.11 ± 0.1
No. 70	Lake Arsö, DK	0.34	0.25	0.09
CCAP 1459/11A	Windermere, UK	0.24 ± 0.1	0.16 ± 0	0.06 ± 0
No. 32	Wannsee, DE	0.40 ± 0	0.24 ± 0	0.08 ± 0
No. 79	Lake Arsö, DK	0.45 ± 0	0.25 ± 0	0.10 ± 0
No. 79/11	Lake Arsö, DK	0.55 ± 0.1	0.14 ± 0	0.07 ± 0
No. 39	Wannsee, DE	0.28 ± 0	0.26 ± 0	0.05 ± 0
SAG 6.89 ^c	Plußsee, DE	0.2 ± 0	0.23 ± 0	0.09 ± 0.1
No. 31/1	Wannsee, DE	0.23 ± 0	0.19 ± 0	0.18 ± 0
<i>P. rubescens</i>				
No. 10	Mondsee, AT	0.34 ± 0	0.24 ± 0	0.07 ± 0
No. 12/1a	Irrsee, AT	0.17 ± 0	0.17 ± 0	0.17 ± 0
No. 40 ^d	Mondsee, AT	0.27 ± 0	0.18 ± 0	0.13 ± 0
No. 65 ^d	Irrsee, AT	0.28 ± 0	0.17 ± 0	0.14 ± 0
No. 67 ^d	Wörthersee, AT	0.26 ± 0	0.26 ± 0	0.03 ± 0.1
No. 91/1 ^d	Mondsee, AT	0.23 ± 0	0.18 ± 0	0.18 ± 0
No. 110 ^d	Mondsee, AT	0.27 ± 0	0.28 ± 0.1	0.25 ± 0
No. 119	Mondsee, AT	0.30 ± 0.1	0.25 ± 0.1	0.11 ± 0.1
No. 160/1a	Wolfgangsee, AT	0.17	0.13	0.15
PCC 7821	Gjersjoen, NO	0.28 ± 0.1	0.24 ± 0	0.19 ± 0
No. 59	Schwarzensee, AT	0.25 ± 0	0.10 ± 0.1	0.11 ± 0.1
No. 60	Schwarzensee, AT	0.23 ± 0	0.29 ± 0	0.17 ± 0.1
No. 14/1a	Schwarzensee, AT	0.23 ± 0	0.24 ± 0.1	0.10 ± 0
No. 80	Schwarzensee, AT	0.28	0.20	0.13
No. 108	Irrsee, AT	0.24	0.07	0.14
No. 21/2	Figur, AT	0.25 ± 0	0.25 ± 0	0.13 ± 0
No. 90/1i	Mondsee, AT	0.31 ± 0	0.12 ± 0.1	0.17 ± 0.1
No. 64	Wörthersee, AT	0.29 ± 0.1	0.21 ± 0	0.13 ± 0
CCAP 1459/24	Ören, SE	0.20 ± 0.3	0.24 ± 0.2	0.3 ± 0
No. 72	Zürichsee, CH	0.27 ± 0	0.24 ± 0.1	0.13 ± 0.1
No. 118	Mondsee, AT	0.23 ± 0	0.22 ± 0	0.15 ± 0
No. 241	Längsee, AT	0.28 ± 0	0.29 ± 0	0.15 ± 0.1
No. 240	Längsee, AT	0.31 ± 0	0.25 ± 0	0.15 ± 0
No. 111	Mondsee, AT	0.34 ± 0	0.23 ± 0	0.16 ± 0
No. 3	Mondsee, AT	0.31 ± 0.1	0.28 ± 0	0.17 ± 0
No. 113/1b	Mondsee, AT	0.28 ± 0	0.23 ± 0.1	0.15 ± 0.1
No. 247	Afritzersee, AT	0.29 ± 0.1	0.25 ± 0	0.11 ± 0
CCAP 1459/14	Loughrigg Tarn, UK	0.27 ± 0	0.20 ± 0	0.08 ± 0
No. 21-	Figur, AT	0.38 ± 0.1	0.20 ± 0.1	0.15 ± 0.1
CCAP 1459/30	Plönersee, DE	0.33 ± 0	0.31 ± 0	0.12 ± 0.1
No. 82	Ammersee, AT	0.47 ± 0.1	0.18 ± 0	0.06 ± 0

Notes: Country codes are given in ISO format. The specific growth rates were calculated from OD_{880nm} during three phases of batch culturing: phase 1 (from inoculation, OD_{880nm} = 0.01 to first harvest, OD_{880nm} = 0.1), phase 2 (between first and second harvest) and phase 3 (from the second harvest to the end of the plateau phase). Phase 2 of cell harvest was part of the late logarithmic growth phase.

^aCCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa (Windermere, UK).

^bPCC: Pasteur Culture Collection (Paris, France).

^cSAG: Culture Collection of Algae (Göttingen, Germany).

^dStrains containing the microcystin biosynthesis gene cluster which became inactive due to mutations, e.g. because of the insertion of mobile elements (Christiansen *et al.*, 2006).

Abbreviations: AT: Austria; CH: Switzerland; DE: Germany; DK: Denmark; FI: Finland; FR: France; JP: Japan; NL: The Netherlands; NO: Norway; SE: Sweden; UK: United Kingdom.

Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*

Rainer Kurmayer,¹ Guntram Christiansen,² Marlies Gumpenberger¹ and Jutta Fastner³

Correspondence

Rainer Kurmayer
rainer.kurmayer@oeaw.ac.at

¹Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestraße 9, A-5310 Mondsee, Austria

²University of Hawaii at Manoa, Department of Chemistry, 2545 McCarthy Hall, Honolulu, HI 96822, USA

³Federal Environmental Agency, Corrensplatz 1, D-14195 Berlin, Germany

Microcystins (MCs) are toxic heptapeptides which are synthesized by the filamentous cyanobacterium *Planktothrix* and other genera via non-ribosomal peptide synthesis. MCs share the common structure cyclo(-D-Ala¹-L-X²-D-erythro-β-iso-aspartic acid³-L-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-N-methyl-dehydroalanine⁷) [Adda; (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid], in which numerous MC variants have been reported. In general, the variation in structure is due to different amino acid residues in positions 7, 2 and 4 within the MC molecule, which are thought to be activated by the adenylation domains *mcvAAAd1*, *mcvBAd1* and *mcvCAD*, respectively. It was the aim of the study (i) to identify MC ecotypes that differed in the production of specific MC variants and (ii) to correlate the genetic variation within adenylation domains with the observed MC variants among 17 *Planktothrix* strains. Comparison of the sequences of *mcvAAAd1* revealed two distinctive Ad-genotypes differing in base pair composition and the insertion of an N-methyl transferase (NMT) domain. The *mcvAAAd1* genotype with NMT (2854 bp) correlated with N-methyl-dehydroalanine and the *mcvAAAd1* genotype without NMT (1692 bp) correlated with dehydrobutyrine in position 7. Within *mcvBAd1*, a lower genetic variation (0–4 %) and an exclusive correlation between one Ad-genotype and homotyrosine as well as another Ad-genotype and arginine in position 2 was found. The sequences of *mcvCAD* were found to be highly similar (0–1 % dissimilarity) and all strains contained arginine in position 4. The results on adenylation domain polymorphism do provide insights into the evolutionary origin of adenylation domains in *Planktothrix* and may be combined with ecological research in order to provide clues about the abundance of genetically defined MC ecotypes in nature.

Received 23 November 2004

Revised 14 February 2005

Accepted 14 February 2005

INTRODUCTION

Planktothrix is considered to be an important genus of harmful cyanobacteria as its members are regularly found to produce the hepatotoxin microcystin (MC). During a field survey, all samples dominated by either the red-pigmented *Planktothrix rubescens* or the green-pigmented *Planktothrix agardhii* were shown to contain MCs (Fastner *et al.*, 1999). Both species are known to have a specific ecological niche

in lakes of the temperate zone of the Northern hemisphere and are highly efficient in monopolizing resources and frequently dominate the phytoplankton community (Mur *et al.*, 1999; Scheffer *et al.*, 1997). Generally, red-pigmented, phycoerythrin-rich genotypes assigned to *P. rubescens* occur in deep, stratified and oligo- to mesotrophic waters, where they can build up metalimnetic layers. Green-pigmented, phycocyanin-rich genotypes frequently assigned to *P. agardhii* have a broader distribution and inhabit shallower, polymictic and mesotrophic to hypertrophic water bodies (Oliver & Ganf, 2000).

MCs are cyclic heptapeptides and share the common structure cyclo(-D-Ala¹-L-X²-D-MeAsp³-L-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷), where X and Z are variable L-amino acids (e.g. LR refers to leucine and arginine in the variable positions), D-MeAsp is D-erythro-β-iso-aspartic acid, Adda is (2S, 3S,

Abbreviations: Adda, (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid; Dhb, dehydrobutyrine (2-amino-2-butenic acid); MC, microcystin; Mdha, N-methyl-dehydroalanine; NMT, N-methyl transferase.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences reported in this paper are AJ749248–AJ749302 and AJ863131–AJ863134, as indicated in Table 1.

8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid and Mdha is *N*-methyl-dehydroalanine (Carmichael *et al.*, 1988). MCs are synthesized, like other non-ribosomal peptides produced by bacteria and fungi, by the thiotemplate mechanism (Marahiel *et al.*, 1997). The large enzyme complex encoded by the *mcy* gene cluster is composed of peptide synthetases, polyketide synthases and tailoring enzymes (Christiansen *et al.*, 2003; Rouhiainen *et al.*, 2004; Tillett *et al.*, 2000). It has a modular structure, each module containing specific functional domains for activation, aminoacyl adenylation (Ad; adenylation domains) and thioesterification (thiolation domains) of the amino acid substrate and for the elongation (condensation domains) of the growing peptide (Tillett *et al.*, 2000).

The structural organization of MC biosynthesis has been elucidated and it has been postulated that McyA, McyB and McyC are responsible for the collinear activation and incorporation of Mdha⁷, D-Ala¹, L-X², D-MeAsp³ and L-Z⁴ during biosynthesis (Tillett *et al.*, 2000). The first adenylation domain of McyA (*mcyAAd1*) is expected to activate amino acids occurring in the variable position 7, where three different residues [dehydroalanine, dehydrobutyryne (Dhb) and serine] have been reported from *Planktothrix* strains (Luukkainen *et al.*, 1993; Sano & Kaya, 1995). *mcyBAd1* is responsible for the activation of residues in position 2, where three different amino acids [leucine, arginine and homotyrosine (Hty)]; Sivonen & Jones, 1999] have been described in *Planktothrix* strains. The adenylation domain of McyC (*mcyCAd*) is correlated with the activation of amino acids in position 4, where only one amino acid (arginine) has been reported in *Planktothrix* strains (Sivonen & Jones, 1999). These reports are in agreement with field observations documenting that the most abundant variants are [Asp³]-variants of MC-LR, MC-RR and MC-HtyR (Henriksen & Moestrup, 1997; Fastner *et al.*, 1999).

The extent to which the diversity of MC variants is genetically determined is not yet fully understood. Based on the gramicidin synthetase GrsA crystal structure from *Brevibacillus brevis*, the region forming the amino-acid-binding pocket of adenylation domains has been defined within the core motifs A3 to A6 and the role of critical side chains during substrate recognition in the adenylation domains has been demonstrated (Conti *et al.*, 1997). Using *in silico* analyses, eight specific critical amino acids (signature sequences) have been correlated with amino acid substrates and the so-called specificity-conferring code of adenylation domains could be defined (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis *et al.*, 2000). Point mutational investigations of a few critical amino acids of the adenylation domain of the peptide synthetase (GrsA) demonstrated a change of substrate specificity accompanied by losses in activity (Stachelhaus *et al.*, 1999). Another approach included the investigation of variations found in the *mcy* gene cluster and correlating this to the structural MC variants produced by natural strains (Kurmayer *et al.*, 2002; Mikalsen *et al.*, 2003). Those studies revealed considerable genetic variation

within the *mcyBAd1* gene of the cyanobacterium *Microcystis* sp. that have been linked to recombination events (Mikalsen *et al.*, 2003), which have recently also been documented for *mcyA* (Tanabe *et al.*, 2004). Some genetic variants were suggested to correlate with the production of MC variants, i.e. the *mcyB* (C) genetic variant correlated with the production of MC-RR and its derivatives (Mikalsen *et al.*, 2003). However, analyses of more strains are needed in order to assess the contribution of genetic recombination events to the production of specific MC variants. It was the aim of this study to investigate whether specific MC variants are correlated with different adenylation domain (Ad) genotypes in cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. This was done by aligning the translated amino acid sequences of *mcyAAd1*, *mcyBAd1* and *mcyCAd* isolated from 17 *Planktothrix* sp. strains from different lakes and correlating these data with the MC variants synthesized by the strains. If a relationship between Ad-genotypes within the *mcyABC* cluster and the occurrence of MC variants can be found, this knowledge could be used to identify specific MC ecotypes in nature. According to the EMBL nucleotide sequence database, an ecotype is defined as a distinct population of organisms of a widespread species that has adapted genetically to its own local habitat (Stoesser *et al.*, 2003). This knowledge is important to understand the wax and wane of specific *mcy* genotypes and the evolution of MC synthesis in our water bodies.

METHODS

Source and cultivation of cyanobacteria. Strains were isolated during a study by Kurmayer *et al.* (2004); in this study, 17 strains were selected to represent the two major groups of MC variants as described by Kurmayer *et al.* (2004): group 1, strains with demethylated variants of MC-RR; and group 2, strains with [Asp³]-MC-HtyR as the major variant. In addition, four strains (21/1, CCAP1459/14, CCAP1459/17, CCAP1459/31) assigned to group 2 by Kurmayer *et al.* (2004) were included for the sequencing of *mcyBAd1* only (Table 1). Strains with novel MC variants (group 3) isolated selectively from Lake Schwarzensee (Upper Austria) will be described elsewhere (R. Kurmayer, K. Ishida, J. Fastner and T. Hemscheidt, unpublished results). According to PCR analysis and sequencing of the internal transcribed spacer region of the phycocyanin operon (Kurmayer *et al.*, 2004) and sequence information on the 16S rRNA gene provided by Suda *et al.* (2002), all of the strains of this study were assigned either to *P. agardhii* (green-pigmented) or *P. rubescens* (red-pigmented). All strains were cultivated in BG₁₁ (Rippka, 1988) containing 2 mM NaNO₃ plus 10 mM NaHCO₃ at 15 °C and continuous light (5–10 μmol m⁻² s⁻¹; Osram type L30W/77 Fluora).

MC analysis. Strains were grown simultaneously and analysed independently on three separate occasions (3 October 2002, 29 January 2004, 13 April 2004). All strains showed comparable growth and 3 weeks after inoculation cells were filtered on pre-weighed glass fibre filters (GF/C; Comesa), dried at 95 °C overnight and then reweighed to quantify the biovolume for extraction. On the day of harvest, the biovolume was between 0.1 and 0.3 mg dry weight l⁻¹. MCs were extracted using 75% (w/v) aqueous methanol and the extracts were analysed for MC by HPLC with diode array detection (HPLC-DAD) as described by Kurmayer *et al.* (2003). MC variants were quantified at 240 nm by their characteristic absorption spectra (original spectrum and first-order derivative) and retention times

Table 1. *Planktothrix* strains used in this study

Species are abbreviated as Rub (*P. rubescens*; red-pigmented) and Aga (*P. agardhii*; green-pigmented). Country codes are given in ISO format (AT, Austria; DE, Germany; DK, Denmark; FI, Finland; JP, Japan; NO, Norway; UK, United Kingdom). 16S rRNA gene sequence accession numbers were taken from Suda *et al.* (2002) and phycocyanin internal transcribed spacer (PC-ITS) sequence accession numbers from Kurmayer *et al.* (2004). Groups with different MC variants as identified by Kurmayer *et al.* (2004) are identified as MC group 1, strains with [Asp³]-MC-RR as the major variant, and group 2, strains with [Asp³]-MC-HtyR as the major variant. ND, No data available.

Species	Strain	MC group	Isolation		Accession numbers				
			Year	Origin	<i>mcyA</i>	<i>mcyB</i>	<i>mcyC</i>	PC-ITS	16S rRNA
Rub	3	1	2001	Mondsee, AT	AJ749248	AJ749276	AJ749285		
Rub	64	1	2001	Wörthersee, AT	AJ749252	AJ749277	AJ749286		
Rub	111	1	2001	Mondsee, AT	AJ749258	AJ749282	AJ749291		
Aga	31/1	1	2001	Wannsee, DE	AJ749249	AJ749267	AJ749294		
Aga	32	1	2001	Wannsee, DE	AJ749250	AJ749268	AJ749295		
Aga	39	1	2001	Wannsee, DE	AJ749251	AJ749269	AJ749296		
Aga	79	1	2001	L. Arresø, DK	AJ749253	AJ749270	AJ749297		
Aga	SAG 6.89	1	1969	Plußsee, Plön, DE	AJ749259	AJ749271	AJ749298	AJ558137	
Aga	CYA126/8	1	1984	L. Langsjön, FI	AJ441056	AJ441056	AJ441056	AJ558135	AB045914
Rub	82	1	2001	Ammmersee, DE	AJ749255	AJ749279	AJ749288		
Rub	108	1	2001	Irrsee, AT	AJ749260	AJ749281	AJ749290		
Rub	PCC7821	1	1971	L. Gjersjoen, NO	AJ749261	AJ749283	AJ749292	AJ558154	AB045901
Rub	CCAP1459/30	1	ND	Plöner See, DE	AJ749265	AJ749284	AJ749293	AJ558147	
Aga	CCAP1459/11A	1	1975	L. Windermere, UK	AJ749262	AJ749272	AJ749299	AJ558160	AB045896
Aga	CCAP1459/21	1	1985	Esthwaite Water, UK	AJ749264	AJ749274	AJ749301	AJ558159	AB045900
Aga	CCAP1460/5	2	1983	L. Kasumigaura, JP	AJ749266	AJ749275	AJ749302		AB045954
Aga	CCAP1459/16	2	1979	Blelham Tarn, UK	AJ749263	AJ749273	AJ749300	AJ558158	AB045899
Rub	21-	2	1999	Figur, AT		AJ863131			
Rub	CCAP1459/14	2	1975	Loughrigg Tarn, UK		AJ863132			
Aga	CCAP1459/17	2	1981	Blelham Tarn, UK		AJ863133			
Aga	CCAP1459/31	2	1971	White Lough, UK		AJ863134			

(Fastner *et al.*, 1999). Fastner *et al.* (1999) reported that, using the gradient according to Lawton *et al.* (1994), [Asp³, Mdh⁷]-MC-RR eluted 0.8 min before [Asp³, Dh⁷]-MC-RR (Fastner *et al.*, 1999). In order to test for the sensitivity of detection of [Asp³, Mdh⁷]-MC-RR in the presence of [Asp³, Dh⁷]-MC-RR and vice versa, the proportion of one variant was gradually increased relative to the other during pilot experiments. Results showed that both [Asp³]-MC-RR variants could be linearly detected down to a minimum proportion of <5%. [MeAsp³, Mdh⁷]-MC-RR, MC-YR and MC-LR were used as external standards (Calbiochem). The concentrations of MC variants were determined as concentration equivalents of [MeAsp³, Mdh⁷]-MC-LR. In addition, dried HPLC fractions of putative MCs were dissolved in 20 µl 50% aqueous methanol, sonicated for 10 min and left for 20 min. From 1 µl of this sample preparation, positive-ion mass spectra from 500 to 2000 Da were recorded using a MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager DE-PRO; PerSeptive BioSystems) as described by Erhard *et al.* (1997). MC variants were identified by post-source decay (PSD) fragment structure analysis (Fastner *et al.*, 1999).

DNA amplification and sequencing. For DNA extraction, 2 ml culture was incubated for 1 h on ice and centrifuged at 13 000 r.p.m. for 10 min and the pellet was lyophilized in a vacuum centrifuge at 30 °C. DNA was extracted using a protocol described by Kurmayer *et al.* (2003). For PCR, DNA extracts were diluted 100-fold and 1.0 µl of the sample was pipetted into reaction tubes and incubated as described below. PCR amplifications were performed in a volume of 20 µl, containing 1 × Qiagen PCR buffer,

3 mM MgCl₂ (Qiagen), 300 µM each dNTP (MBI Fermentas), 0.5 µM each primer, 0.5 units *Taq* DNA polymerase (Qiagen), 13.1 µl sterile Millipore water and 1.0 µl DNA extract. Primers used for PCR and sequencing are listed in Table 2. For *mcyAAd1* (product size 3022 bp), the PCR thermal cycling protocol included an initial denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 3 min. For *mcyBAd1* (product size 1692 bp) the cycling protocol was identical, but annealing was at 52 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 2 min. For *mcyCAd* (product size 1416 bp) the cycling protocol was identical to that for *mcyAAd1*, but the elongation time was 2 min at 72 °C. PCR products (4 µl of the reaction mixture) were visualized by electrophoresis in 1.0% agarose in 0.5 × TBE with ethidium bromide staining. The amplification products of *mcyABC* were sequenced directly by standard automated fluorescence techniques (Applied Biosystems). These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession numbers AJ749248–AJ749302 and AJ863131–AJ863134 (see Table 1).

Sequence alignment and analysis. Sequences were aligned using multiple sequence alignment (CLUSTAL W 1.8). Similarity values between amino acid sequences and the corresponding adenylation domain of strain CYA126/8 (GenBank accession no. AJ441056) were calculated using the program PROTDIST of the PHYLIP software package [version 3.6(alpha3); Felsenstein, 1993]. These values are the fractions of amino acid positions that are identical between the sequences (without weighting of protein positions).

Table 2. Oligonucleotide primers used for PCR (P) and sequencing (S)

All primers were designed during this study.

Primer	Purpose	Sequence (5'–3')	Direction	T _m (°C)
<i>mcyAAd1</i>				
<i>mcyAA1Gufwd</i>	P, S	GCAACCAATTAGCCCATAATCTC	F	58.9
<i>mcyAA1Gurev</i>	P, S	GGCAGTTAGGGGGTAAGCATC	R	61.8
<i>mcyAAd1 (with NMT)</i>				
<i>mcyAnA43kbfd</i>	P, S	CCGAAGGTCATAAGGACAGTGTT	F	60.6
<i>mcyAvA93kbrev</i>	P, S	GAGGTTGGAGCGGATGGTT	R	58.8
<i>NachA6fwd</i>	P, S	GGTATCTCCCCGATGGCAATA	F	55.2
<i>VorM2rev</i>	P	GCCATTGATCGACGGAGATATC	R	55.0
<i>InternA6fwdseq</i>	S	AATCGTCCTGAATTGACGGC	F	53.9
<i>InternnA8fwdseq</i>	S	CCTATTTCAAGTGGCTCCCCA	F	55.5
<i>InternnA3fwdseq</i>	S	TGCCATCGAGGCGTTGT	F	52.8
<i>InternvA10fwd</i>	S	GCGATTTTTGTGAAGGAGCAA	F	54.5
<i>mcyAAd1 (without NMT)</i>				
<i>Nr80fwd</i>	P, S	TAATCATTCCCATGTTGTTTCGTCT	F	57.6
<i>Nr80rev</i>	P, S	TCTGTATTTTGGGTGGTAAAGGAT	R	58.1
<i>Nr80intern2fwd</i>	P, S	TAATCAAACCTCCCACCGCCT	F	53.6
<i>Nr80intern2R</i>	P, S	TTGCGGTACCACATAACCCAC	R	54.7
<i>mcyBAAd1</i>				
<i>mcyBA1totfwd</i>	P, S	CACCTAGTTGAAGAACAAGTTCT	F	51.1
<i>mcyBA1totrev</i>	P, S	AGACTTGTTTAATAGCAAAGGC	R	51.5
<i>Sample1,3,4fwd</i>	P, S	TTCTTCTCTAGCTTTGACG	F	49.4
<i>Sample1-4rev</i>	P, S	TCTGTTTGTATAATTACCACACTT	R	49.0
<i>mcyBintern1</i>	S	ACCCAGCAATCTTTAGTTACC	F	51.6
<i>mcyBintern2</i>	S	CACAGAAACCTCCGTTGAT	F	52.0
<i>mcyBintern3</i>	S	GACAATTCTAGACAGCCATCC	F	52.6
<i>mcyCAD</i>				
<i>mcyCAfwd1</i>	P, S	GCAGGCGAACCAATTAGCC	F	54.7
<i>mcyCArev1</i>	P	GACTTCGGTTTGATTACCTGGG	R	54.2
<i>RK_mcyCAintfw</i>	S	CTTATGGGCCAACAGAAACAG	F	53.2
<i>RK_mcyCAintrev</i>	S	AGTTCTCCAGCAACGCCAATAG	R	55.1

Phylogenetic trees were constructed by (i) average linkage clustering (UPGMA) from the amino acid distance matrix using the approximation of Kimura (1983) to the Dayhoff PAM matrix using the programs PROTDIST and NEIGHBOR, (ii) the maximum-likelihood method (ML) using the program PROML using the Jones–Taylor–Thornton model of change between amino acids (Jones *et al.*, 1992) and (iii) the maximum-parsimony (MP) method using PROTPARS from the PHYLIP software package. In general, sites were not weighted. The statistical significance of the branches was estimated by bootstrap analysis generating 1000 replicates of the original dataset. Finally, consensus trees following the 50% majority rule were computed. For all of the genes, phylogenetic trees were congruent and the parsimonious trees and significant bootstrap values for all of the methods are presented.

RESULTS

MC variants

Analysis of the residue variation in position 7 revealed that either *Mdha* (nine strains) or *Dhb* (six strains) was part of the MCs (Table 3, Fig. 1). Residue variations in position 2 could be split into two groups: the first group exclusively produced one MC variant containing arginine (five strains).

The second, larger group contained 10 strains, producing a mixture of MCs carrying arginine as the major variant ($\geq 67\%$) and leucine ($< 33\%$) and homotyrosine ($< 2\%$). Two strains (CCAP1460/5, CCAP1459/16) showed no arginine, but homotyrosine ($\geq 69\%$) and leucine ($< 30\%$) were major variants. There were no residue variations seen in position 4 (arginine).

Genetic variation within the *mcyABC* cluster

Using the same primers for *mcyAAd1*, a PCR product of either 3 kb (corresponding to the *mcyAAd1* sequence of strain CYA126/8; GenBank accession no. AJ441056) or 1.5 kb was obtained. Most of the reduction in PCR product size was due to the lack of a DNA sequence encoding an *N*-methyl transferase (NMT, 416 aa). In all strains showing a PCR product of 3 kb (950 aa), the NMT was inserted between the core motifs A8 (KIRGXRIELGEIE) and A9 (LPXYM) defined by Marahiel *et al.* (1997). Within the remaining *mcyAAd1* sequence (534 aa), the two distinctive Ad-genotypes of *mcyA* also differed significantly in

Table 3. Similarity in the amino acid composition of adenylation domains of *mcyAAd1*, *mcyBAd1* and *mcyCAAd* and the production of MC variants measured for 17 strains of *P. agardhii* and *P. rubescens*

The presence (+) or absence (-) of the NMT within *mcyAAd1* is indicated. Similarity is given in comparison with strain CYA126/8, sequenced for the *mcy* gene cluster by Christiansen *et al.* (2003). For a complete list of strains and strain origins, see Table 1 in Kurmayer *et al.* (2004). MC variants were identified from their retention times in HPLC: [Asp³, Mdh⁷]-MC-RR, 13.4–13.9 min; [Asp³, Dh⁷]-MC-RR, 14.3–14.8 min; [Asp³]-MC-HtyR, 18.3–18.5 min; [Asp³]-MC-LR, 19.3–19.6 min. The MC content is given in equivalents of [MeAsp³, Mdh⁷]-MC-LR (mean ± SEM).

Species	Strain	NMT	Amino acid sequence similarity (%)			MC variants (mean proportion ± SEM; n=3)					MC content [µg (mg dry weight) ⁻¹]	
			<i>mcyA</i> (534 aa)	<i>mcyB</i> (513 aa)	<i>mcyC</i> (448 aa)	[Asp ³ , Mdh ⁷]-MC-RR	[Asp ³ , Dh ⁷]-MC-RR	[Asp ³]-MC-HtyR	[Asp ³]-MC-LR	Undetermined		
Rub	3	+	99	99 ^{d*}	100 ^a	99.2 ± 0.8					0.8 ± 0.8	1.4 ± 0.5
Rub	64	+	96	99 ^d	100	100					0	0.3 ± 0.1
Rub	111	+	98	99 ^d	99	98.4 ± 0.9					1.6 ± 0.9	1.8 ± 0.5
Aga	31/1	+	99	98	99	85 ± 1		1.9 ± 0.4	10.4 ± 0.6		2.6 ± 0.1	3.0 ± 0.6
Aga	32	+	100 ^c	97	100 ^a	88.5 ± 0.7			10.7 ± 0.2		0.8 ± 0.8	2.4 ± 0.1
Aga	39	+	100	98	100	91 ± 0.3			9.1 ± 0.3		0	2.6 ± 0.3
Aga	79	+	100	100 ^e	99	96.2 ± 0.6			3.4 ± 0.3		0.4 ± 0.4	1.6 ± 0.1
Aga	SAG6.89	+	98	98	100 ^a	79.8 ± 3			18.9 ± 2.3		1.3 ± 0.7	2.5 ± 0.5
Aga	CYA126/8	+	(100) ^c	(100) ^e	(100) ^a	92.2 ± 1.2			7.1 ± 1.3		0.7 ± 0.9	2.1 ± 0.4
Rub	82	-	56 ^a	99 ^b	100		93.8 ± 0.7	0.6 ± 0.3	4.8 ± 1		0.8 ± 0.8	4.9 ± 0.6
Rub	108	-	56	99 ^b	100		96.7 ± 1.1		1.1 ± 0.04		2.2 ± 1.1	2.3 ± 0.4
Rub	PCC7821	-	56 ^b	98	100		94.9 ± 0.5		5.1 ± 0.5		0	1.0 ± 0.1
Rub	CCAP1459/30	-	56 ^b	98	100		67.4 ± 0.8		32.6 ± 0.8		0	2.0 ± 0.3
Aga	CCAP459/11A	-	56	96 ^c	100 ^a		100				0	2.7 ± 0.2
Aga	CCAP1459/21	-	56	96 ^c	100 ^a		100				0	1.9 ± 0.2
Aga	CCAP1460/5	-	56	97 ^a	100			74.9 ± 2.7	24.7 ± 2.3		0	2.1 ± 0.4
Aga	CCAP1459/16	-	56 ^a	97 ^a	100 ^a			68.8 ± 3.4	29.8 ± 3.2		1.5 ± 0.7	2.0 ± 0.2

*Superscripts indicate identical genotypes.

amino acid sequence (44 % dissimilarity when compared to CYA126/8; Table 3). Phylogenetic analyses of *mcyAAd1* sequences revealed a separation of *Planktothrix* strains that was found to be independent of the taxonomic distinction between *P. agardhii* and *P. rubescens*. Two main clades were observed: the *mcyA* (I) clade (lacking NMT) showed the lowest genetic dissimilarity (0–0.2 %), and the *mcyA* (II) clade (with NMT) showed higher genetic variation (0–3.2 %; Fig. 2). The *mcyAAd1* genotype with

NMT showed 63 % sequence identity with *mcyAAd1* of *Microcystis aeruginosa* (BAA83992) and 65 % identity with *mcyAAd1* of *Anabaena* sp. 90 (AAO62586). In contrast, the *mcyAAd1* genotype without NMT (563 aa) revealed sequence identities (47–66 %) with putative non-ribosomal peptide synthetases from organisms of the cyanobacteria [*Nostoc punctiforme* PCC73102, *Anabaena* ATCC 2941, *Anabaena* sp. 90 (Rouhiainen *et al.*, 2000) and *Nodularia spumigena* (Moffitt & Neilan, 2004)], the bacillales (*Bacillus cereus*), the proteobacteria (*Pseudomonas* spp., *Chromobacterium violaceum* and *Ralstonia solanacearum*) and the actinobacteria (*Streptomyces avermitilis*) (data not shown).

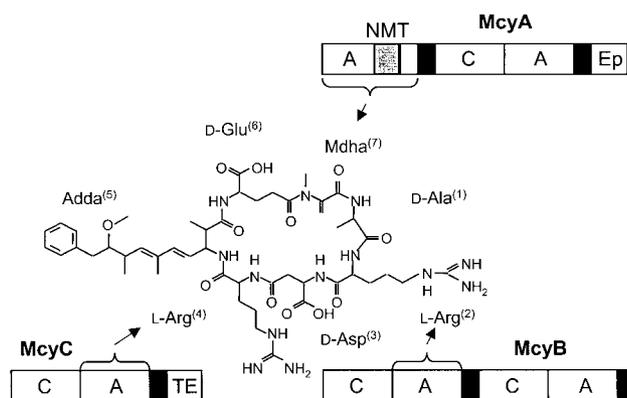


Fig. 1. Structure of [Asp³, Mdh⁷]-MC-RR and the multi-enzymes McyA, McyB and McyC believed to be responsible for the collinear activation and incorporation of Mdh⁷, D-Ala¹, L-X², D-MeAsp³ and L-Z⁴ during biosynthesis (Tillett *et al.*, 2000). Each rectangle represents a non-ribosomal peptide synthetase enzymic domain: A, aminoacyl adenylation; C, condensation; NMT, N-methyl transferase; Ep, epimerase; TE, thioesterase. Thiolation domains are shown in black. Braces indicate the adenylation domains sequenced from *Planktothrix* strains (see Table 1) and arrows denote the corresponding amino acids activated during biosynthesis.

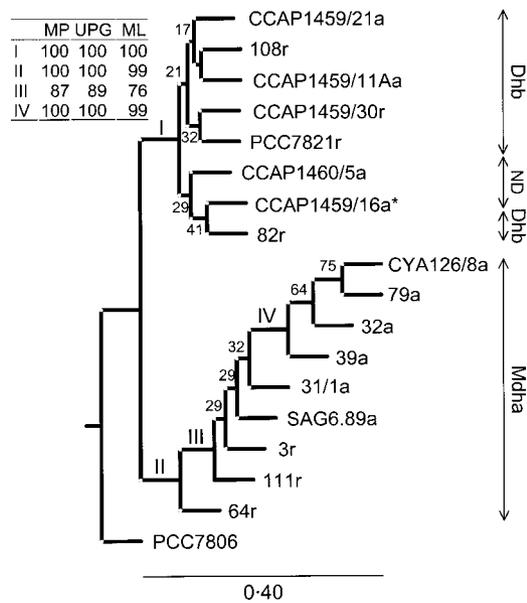


Fig. 2. Phylogenetic tree based on MP analysis calculated from *mcvAAD1* sequences (950 aa) from 17 *Planktothrix* strains. Significant bootstrap percentages obtained from 1000 replicates are indicated for *mcvA* clades I, II, III and IV at the top left for MP, UPGMA clustering (UPG) and ML. Bootstrap values for clades with lower support are given for MP only. *mcvAAD1* from *Microcystis* PCC7806 (AAF00960) was used as an outgroup. The suffixes r and a after the strain name indicate the species *P. rubescens* (r) and *P. agardhii* (a). The corresponding amino acids in position 7 determined in the MC molecule are given (ND, not determined). Bar, 4 substitutions per 10 amino acids. [Asp³, Dhb⁷]-MC-HtyR has been isolated from strain CCAP1459/16 (indicated by an asterisk) by Sano & Kaya (1998).

Within *mcvBAD1*, the genetic variation was lower and no polymorphism in sequence length was observed (0–4%; Table 3, Fig. 3). Phylogenetic analysis of *mcvBAD1* sequences revealed the occurrence of three clades (I, II, III), with the *mcvB* (I) clade consisting of both *P. rubescens* and *P. agardhii*, the *mcvB* (II) clade consisting of *P. agardhii* and the *mcvB* (III) clade consisting of *P. rubescens* only. The *mcvB* (II) clade (strains CCAP1459/11A and CCAP1459/21) showed the most significant deviation in amino acid sequence (4%). Genetic variation was lowest within *mcvCAD* (0–1%; Table 3), and no consistent branching using any of the three phylogenetic methods was detected (data not shown).

In summary, no correlation was found between *mcv* genotype and taxonomic distinction between *P. agardhii* and *P. rubescens*. In addition, no correlation between the *mcv* genotype distribution and the origin of isolation was found. For example, identical *mcvBAD1* genotypes were isolated from habitats with the largest geographical distance observed in this study, i.e. Blelham Tarn, UK (strain

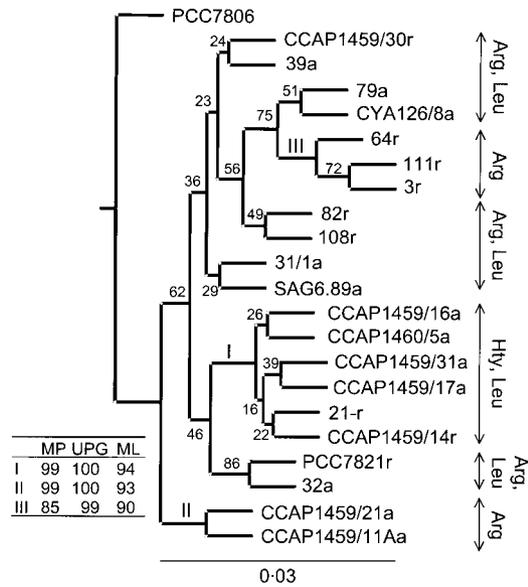


Fig. 3. Phylogenetic tree based on MP analysis calculated from *mcvBAD1* sequences (513 aa) from 21 *Planktothrix* strains. Bootstrap percentages obtained from 1000 replicates are indicated for *mcvB* clades I, II, III at the bottom left for MP, UPGMA clustering (UPG) and ML. Bootstrap values for clades with lower support are given for MP only. *mcvBAD1* from *Microcystis* PCC7806 (AAF00961) was used as an outgroup. The suffixes r and a after the strain name indicate the species *P. rubescens* (r) and *P. agardhii* (a). The corresponding amino acids in position 2 determined in the MC molecule are given. Bar, 0.3 substitutions per 10 amino acids.

CCAP1459/16) and Lake Kasumigaura, Japan (strain CCAP1460/5).

Genetic variation, signature sequences and MC variants

The *mcvAAD1* genotype with NMT had a signature sequence DVWHISLI that matched exactly (identity 8/8) with the reference sequence of nostopeptolide synthetase (gb|AAF15891.2|) and the prediction of serine as the amino acid substrate. This prediction correlated perfectly with the presence of MdhA in [D-Asp³, MdhA⁷]-MC-RR in nine of the nine strains (Table 3, Fig. 2). The *mcvAAD1* genotype without NMT had a signature sequence DFWNIGMV that matched exactly (identity 8/8) with the reference sequence of exochelin synthetase (gb|AAC82550.1|), pyoverdine synthetase D (gb|AAB60198.1|), fengycin synthetase (emb|CAA09819.1|, emb|CAA84361.1|) and coelichelin synthetase (gil5763943), all predicting threonine as the amino acid substrate. This prediction correlated with Dhb occurring in [D-Asp³, Dhb⁷]-MC-RR (six strains).

Within *mcvBAD1*, the signature sequences had no clear precedent in the database. The *mcvB* (I) clade (six strains) was derived from one genotype only and showed the

signature sequence DALLFGFV. An exclusive correlation with homotyrosine and leucine, but with no arginine, as major residues in position 2 was recognized (Fig. 3). Notably, all other strains reported to contain homotyrosine and leucine in position 2 as major residues by Kurmayer *et al.* (2004) (21/1, CCAP1459/14, CCAP1459/17, CCAP1459/31) were found exclusively to have one *mcvBAD1* genotype. The *mcvB* (II) clade (two strains) showed the signature sequence DAWAFGLV and the *mcvB* (III) clade (three strains) showed the signature sequence DALFFGVV, and both clades correlated exclusively with arginine. The remaining 10 strains were found to be without clear genetic differentiation, showed the signature sequence DALFFGLV and produced a mixture of MCs carrying arginine and leucine as major variants.

Genetic differentiation was lowest within *mcvCAD*; one signature sequence, DPWGFGLV, without a precedent in the database was found and no variation in position 4 was found (Table 3). In summary, both Ad genotypes of *mcvAAd1* were found to be specific for the amino acid composition in position 7. The Ad genotypes of *mcvBAD1* were found to be both specific and unspecific, the latter correlating with the activation of two (or three) amino acids during MC biosynthesis.

DISCUSSION

Genetic variation within adenylation domains and correlation with the synthesis of MC variants

In this study, a significant correlation between *mcvAAd1* genotypes with NMT and *mcvAAd1* genotypes without NMT and the occurrence of either Mdha or Dhb in position 7 of the MC molecule was found. According to Tillett *et al.* (2000), *mcvAAd1* is responsible for the incorporation of L-serine into the growing molecule. L-Serine is *N*-methylated by the corresponding NMT domain and transformed by dehydration into Mdha prior to or following the condensation reaction. Analogous to L-serine, L-threonine is transformed by dehydration into Dhb (Rinehart *et al.*, 1994). Whether strains CCAP1460/5 and CCAP1459/16, containing *mcvAAd1* without NMT, indeed produced [Asp³, Dhb⁷]-MC-HtyR was not tested explicitly in this study, but [Asp³, Dhb⁷]-MC-HtyR has been isolated from strain CCAP1459/16 by Sano & Kaya (1998).

Within *mcvBAD1*, a significant correlation between *mcvB* (I) clade and homotyrosine in position 2 was found. Even the strains from Lake Schwarzensee (Kurmayer *et al.*, 2004) were of the same *mcvBAD1* genotype and contained homotyrosine as the major residue in position 2 (R. Kurmayer, K. Ishida, J. Fastner and T. Hemscheidt, unpublished results). In addition, two *mcvB* clades (II, III) correlated with arginine exclusively in position 2. *mcvB* (III) clade was found in 12 strains (<1.5% dissimilarity) and all strains contained arginine in position 2 (Gumpenberger, 2004). In

summary, the genetic differences in the *mcvBAD1* genotypes correlated only partly with the observed differences in the structure of the MC variants. Corresponding to this study, the majority of *mcvBAD1* sequences from a number of single colonies from *Microcystis* sp. did not correlate with differences in MC amino acid composition (Kurmayer *et al.*, 2002). This result corresponds to the observation that *Microcystis* strain HUB524, with the same *mcvBAD1* sequence, produces three different MCs simultaneously containing either leucine, arginine or tyrosine in position 2 (Fastner *et al.*, 1999). Those results indicate the potential of *mcvBAD1* to activate a variety of amino acids during MC biosynthesis. The results correspond to the general view that adenylation domains activating hydrophobic amino acids (e.g. *mcvBAD1*) possess a lower selectivity when compared to adenylation domains activating polar amino acids (e.g. *mcvAAd1*; Challis *et al.*, 2000).

It has been suggested that the synthesis of specific MC variants in a particular strain depends on the physiological conditions; for instance, Rapala *et al.* (1997) found an increasing proportion of MC-RR at the expense of MC-LR with increasing temperature. According to the present authors' unpublished measurements, at a higher temperature along with high light conditions (20 °C, 40 μmol m⁻² s⁻¹) as opposed to the culture conditions used in this study (15 °C, 5–10 μmol m⁻² s⁻¹), unaltered synthesis of either [D-Asp³, Mdha⁷] or [D-Asp³, Dhb⁷] variants of MC-RR was observed. In addition, the occurrence of MC-RR only in some of the strains (CCAP1459/11A, CCAP1459/21, 3, 64, 111) was found to be unaltered at higher temperature and high light conditions (20 °C, 40 μmol m⁻² s⁻¹; R. Kurmayer, unpublished).

Genetic recombination of the *mcvABC* cluster

In this study, the *mcvAAd1* genotype without NMT (563 aa) revealed extensive sequence identity (47–66%) with non-ribosomal peptide synthetase genes from other cyanobacterial and bacterial genera. The genetic variation was lowest among strains of this genotype (0–0.2%), suggesting a relatively recent recombination event. Recombinations involving adenylation domains of the *mcv* gene cluster in *Microcystis* have been suggested for *mcvB* (Mikalsen *et al.*, 2003) and the NMT region of *mcvA* (Tanabe *et al.*, 2004). Recombinations and deletions involving the condensation domain in *ndaA* have been reported by Moffitt & Neilan (2004). Recombination therefore seems to be a general feature in *mcv* genes, and these findings may be important in understanding how new structural variants of MCs are created.

The same *mcvAAd1* primers were used to amplify *mcvAAd1* genotypes both with and without NMT in *Planktothrix* spp. Notably, *ndaA* (AAO64403), which shows 61% identity to the *mcvAAd1* genotype without NMT, consists of not only a threonine adenylation domain but also an NMT domain (Moffitt & Neilan, 2004). So far, an *mcvAAd1* threonine adenylation domain with NMT has not been

found in *Planktothrix* strains. It is possible that the NMT has been lost after the transfer of the *mcvAAAd1* threonine adenylation domain into *mcvA* of *Planktothrix*.

Ecological implications

In this study, it could be shown that DNA polymorphisms within specific regions of adenylation domains are associated with the synthesis of specific MC variants. The process by which secondary metabolic pathways evolve is probably a result of modifications and combinations of reactions from existing pathways. Through the process of natural selection, the producer of new structures will only increase in number relative to the producers of the older structures if the production of the new structure is advantageous. Assuming that the observed recombination within *mcvAAAd1* and the resulting [D-Asp³, Dhb⁷]-MC-RR ecotype originated from a single DNA recombination event, it must be assumed that natural selection favoured the increase of [D-Asp³, Dhb⁷]-MC producers relative to [D-Asp³, Mdh^{a7}]-MC producers. Notably, the first quantitative results showed that (i) in a few lakes, the *mcvAAAd1* genotype without NMT dominated, while, in other populations, *mcvAAAd1* genotypes both with and without NMT were found to co-occur over several years and (ii) the *mcvBAD1* genotype producing [Asp³]-MC-HtyR occurred much less frequently in Lake Irrsee (Upper Austria) when compared with Lake Mondsee (Upper Austria; R. Kurmayer, unpublished). In the field, [D-Asp³, Dhb⁷]-MC-RR has been reported as the dominant variant in *P. rubescens* (Blom *et al.*, 2001; Fastner *et al.*, 1999), while [D-Asp³, Mdh^{a7}]-MC-RR was found to be most abundant in phytoplankton samples dominated by *P. agardhii* (Fastner *et al.*, 1999). It is speculated that specific environmental conditions may not only influence the absolute abundance of MC-producing genotypes via the dominance of *P. rubescens* over *P. agardhii* (e.g. Kurmayer *et al.*, 2004) but may also influence the proportion of specific MC ecotypes. The quantification of MC ecotypes as well as transplantation in their natural context will deliver important clues on the function of MCs in ecosystems.

ACKNOWLEDGEMENTS

Johanna Schmidt provided valuable assistance in the culturing of strains and microcystin analysis in the laboratory. We would also like to thank Martin Meixner for sequencing. We appreciate the comments of two anonymous reviewers. This study was supported by the Austrian Science Fund (P15709) CYTOGENE (Linking CYanTOxin production to GENetic diversity) and by the EU project PEPCY (QLK4-CT-2002-02634). The European Community is not responsible for any use that might be made of data appearing herein.

REFERENCES

Blom, J. F., Robinson, J. A. & Jüttner, F. (2001). High grazer toxicity of [D-Asp³, (E)-Dhb⁷]microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon* **39**, 1923–1932.

Carmichael, W. W., Beasley, V., Bunner, D. L. & 11 other authors (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* **26**, 971–973.

Challis, G. L., Ravel, J. & Townsend, C. A. (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* **7**, 211–224.

Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T. & Dittmann, E. (2003). Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J Bacteriol* **185**, 564–572.

Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. & Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J* **16**, 4174–4183.

Erhard, M., von Döhren, H. & Jungblut, P. (1997). Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **15**, 906–909.

Fastner, J., Erhard, M., Carmichael, W. W., Sun, F., Rinehart, K. L., Röncke, H. & Chorus, I. (1999). Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Arch Hydrobiol* **145**, 147–163.

Felsenstein, J. (1993). PHYLIP – phylogeny inference package, version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.

Gumpenberger, M. (2004). *Phänotypische und genetische Charakterisierung toxischer Cyanobakterien aus der Gattung Planktothrix spp.* MSc thesis, University of Salzburg, Austria (in German).

Henriksen, P. & Moestrup, O. (1997). Seasonal variations in microcystin contents of Danish cyanobacteria. *Nat Toxins* **5**, 99–106.

Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**, 275–282.

Kimura, M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.

Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J. & Chorus, I. (2002). Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb Ecol* **43**, 107–118.

Kurmayer, R., Christiansen, G. & Chorus, I. (2003). The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Appl Environ Microbiol* **69**, 787–795.

Kurmayer, R., Christiansen, G., Fastner, J. & Börner, T. (2004). Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol* **6**, 831–841.

Lawton, L. A., Edwards, C. & Codd, G. A. (1994). Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* **119**, 1525–1530.

Luukkainen, R., Sivonen, K., Namikoshi, M., Färdig, M., Rinehart, K. L. & Niemelä, S. I. (1993). Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2204–2209.

Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* **97**, 2651–2674.

Mikalsen, B., Boison, G., Skulberg, O. M., Fastner, J., Davies, W., Gabrielsen, T. M., Rudi, K. & Jakobsen, K. S. (2003). Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcvABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J Bacteriol* **185**, 2774–2785.

- Moffitt, M. C. & Neilan, B. A. (2004).** Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6353–6362.
- Mur, L. R., Skulberg, O. M. & Utkilen, H. (1999).** Cyanobacteria in the environment. In *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, pp. 15–40. Edited by I. Chorus & J. Bartram. London & New York: E. & F. N. Spon.
- Oliver, R. L. & Ganf, G. G. (2000).** Freshwater blooms. In *The Ecology of Cyanobacteria: their Diversity in Time and Space*, pp. 149–194. Edited by B. A. Whitton & M. Potts. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C. & Niemelä, S. I. (1997).** Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2206–2212.
- Rinehart, K. L., Namikoshi, M. & Choi, B. W. (1994).** Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J Appl Phycol* **6**, 159–176.
- Rippka, R. (1988).** Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**, 3–27.
- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Biukema, W., Haselkorn, R. & Sivonen, K. (2000).** Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol* **37**, 156–167.
- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B. L., Buikema, W., Haselkorn, R. & Sivonen, K. (2004).** Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl Environ Microbiol* **70**, 686–692.
- Sano, T. & Kaya, K. (1995).** A 2-amino-2-butenic acid (Dhb)-containing microcystin isolated from *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron Lett* **36**, 8603–8606.
- Sano, T. & Kaya, K. (1998).** Two new (*E*)-2-amino-2-butenic acid (Dhb)-containing microcystins isolated from *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron* **54**, 463–470.
- Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L. R. & van Nes, E. H. (1997).** On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology* **78**, 272–282.
- Sivonen, K. & Jones, G. (1999).** Cyanobacterial toxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, pp. 41–112. Edited by I. Chorus & J. Bartram. London & New York: E. & F. N. Spon.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999).** The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**, 493–505.
- Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A. & 13 other authors (2003).** The EMBL Nucleotide Sequence Database: major new developments. *Nucleic Acids Res* **31**, 17–22.
- Suda, S., Watanabe, M. M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnaraporn, N., Liu, Y. & Day, J. G. (2002).** Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1577–1595.
- Tanabe, Y., Kaya, K. & Watanabe, M. M. (2004).** Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. *J Mol Evol* **58**, 633–641.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T. & Neilan, B. A. (2000).** Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol* **7**, 753–764.

Diversity of microcystin genotypes among populations of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* and *Planktothrix agardhii*

RAINER KURMAYER and MARLIES GUMPENBERGER†

Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestraße 9, 5310 Mondsee, Austria

Abstract

Microcystins (MCs) are toxic heptapeptides that are produced by filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* and *Planktothrix agardhii* via nonribosomal peptide synthesis. MCs share a common structure cyclo (-D-Alanine¹-L-X²- D-erythro-β-iso-aspartic acid³-L-Z⁴-Adda⁵-D-Glutamate⁶- N-methyl-dehydroalanine⁷) where X² and Z² are variable L-amino acids in positions 2, 4 of the molecule. Part of the *mcyB* gene (1,451 bp) that is involved in the activation of the X² amino acid during MC synthesis was sequenced in 49 strains containing different proportions of arginine, homotyrosine, and leucine in position 2 of the MC molecule. Twenty-five genotypes were found that consisted of eight genotype groups (A–H, comprising 2–11 strains) and 17 unique genotypes. *P. rubescens* and *P. agardhii* partly consisted of the same *mcyB* genotypes. The occurrence of numerous putative recombination events that affected all of the genotypes can explain the conflict between taxonomy and *mcyB* genotype distribution. Genotypes B (homotyrosine and leucine in X²) and C (arginine in X²) showed higher nonsynonymous/synonymous (d_N/d_S) substitution ratios implying a relaxation of selective constraints. In contrast, other genotypes (arginine, leucine, homotyrosine) showed lowest d_N/d_S ratios implying purifying selection. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) revealed the unambiguous identification of *mcyB* genotypes, which are indicative of variable X² amino acids in eight populations of *P. rubescens* in the Alps (Austria, Germany, and Switzerland). The populations were found to differ significantly in the proportion of specific genotypes and the number of genotypes that occurred over several years. It is concluded that spatial isolation might favour the genetic divergence of microcystin synthesis in *Planktothrix* spp.

Keywords: geographical isolation, microcystin synthesis, microevolution, plankton ecology, population genetics, toxicity

Received 24 February 2006; revision received 12 May 2006; accepted 2 June 2006

Introduction

Toxic heptapeptides microcystins are produced by various genera of the phylum of cyanobacteria, i.e. the genera *Microcystis*, *Anabaena*, and *Planktothrix*. The filamentous cyanobacteria *Planktothrix* spp. are one of the most important microcystin producers and can be found in freshwater habitats in the temperate region of the Northern Hemisphere

(Fastner *et al.* 1999). *Planktothrix agardhii* co-occurs with *Limnothrix redekei* and other filamentous cyanobacteria, e.g. *Pseudoanabaena limnetica* in high abundance in shallow and eutrophic lakes (Rücker *et al.* 1997). In contrast *Planktothrix rubescens* forms metalimnetic layers in deep stratified and less eutrophic lakes, and often monopolizes resources and dominates phytoplankton completely (Anneville *et al.* 2004).

Microcystins (MCs) are cyclic heptapeptides that are produced by cyanobacteria and share a common structure cyclo (-D-Ala¹ -L-X² -D-MeAsp³ -L-Z⁴ -Adda⁵ -D-Glu⁶ -Mdha⁷), where X and Z are variable L-amino acids (e.g. LR refers to leucine and arginine in the variable positions), D-MeAsp is D-erythro-β-iso-aspartic acid, Adda is (2 S, 3 S, 8

Correspondence: Rainer Kurmayer, Fax: 0043-6232-3578; E-mail: rainer.kurmayer@oeaw.ac.at.

†Present address: Potsdam Institute for Climate Impact Research, Telegrafenberg, PO Box 60 12 03, D-14412 Potsdam, Germany.

S, 9 S -3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid), and Mdha is N-methyl-dehydroalanine (Carmichael *et al.* 1988). MCs are synthesized by thiotemplate mechanism such as other nonribosomal peptides produced by bacteria and fungi (Marahiel *et al.* 1997). The large enzyme complex encoded by the *mcy* gene cluster is composed of peptide synthetases, polyketide synthases, and tailoring enzymes (Tillett *et al.* 2000; Christiansen *et al.* 2003). It has a modular structure, each module of which contains specific functional domains for activation = aminoacyl adenylation (A) domains, and thioesterification (thiolation domains) of the amino acid substrate and for the elongation (condensation domains) of the growing peptide (Tillett *et al.* 2000). Adenylation domains show a high degree of conservation (core motifs) enabling the definition of general rules for the structural basis of substrate recognition of nonribosomal peptide synthetases (Marahiel *et al.* 1997). The determination of substrate specificity is based on the crystallization of the adenylation domain of gramicidin synthetase (*GrsA*) (Conti *et al.* 1997). This enabled the identification of core motifs constituting a putative binding pocket for the activation of the amino acid substrate during peptide synthesis and the *in silico* identification of critical binding pocket residues that are located between core motifs A3-A6 (Stachelhaus *et al.* 1999; Challis *et al.* 2000).

McyBA1 is responsible for the activation of amino acids as aminoacyl adenylate followed by peptide bond formation to the growing microcystin molecule by the condensation domain located upstream of *mcyBA1* (Tillett *et al.* 2000). In *Planktothrix* spp., three different amino acids have been described in position 2 of the microcystin molecule: leucine, arginine, homotyrosine (Luukkainen *et al.* 1993; Henriksen & Moestrup 1997; Fastner *et al.* 1999; Kurmayer *et al.* 2005). In an earlier study, we described the occurrence of novel microcystin variants, which appeared to be unique and dominant for *Planktothrix* and that exclusively occurred in a specific lake, Schwarzensee in the Austrian Alps (Kurmayer *et al.* 2004). It has been speculated that the populations of *P. rubescens* may be geographically isolated; for example Schwarzensee, the lake of origin of the isolates containing those novel microcystin variants is at an altitude of 716 m above sea level (a.s.l.), while many other lakes have a lower altitude, such as Mondsee, which is located only 11.4 km away.

Typically, the distribution of microorganisms is not restricted by geographical barriers (Finlay 2002). Studies have shown that recombination and migration rates in natural populations of soil bacteria (*Bacillus* spp.) and aquatic cyanobacteria (*Microcoleus* sp., *Nodularia* sp.) were high, and were not influenced by geographical factors (Roberts & Cohan 1995; Barker *et al.* 2000; Lidders *et al.* 2005). On the other hand, the occurrence of physical isolation, which is defined as the spatial separation of two or more populations among geographically isolated habitats (Papke &

Ward 2004) cannot a priori be excluded. Geographical isolation has been observed among isolated populations of extreme habitats, for example, *Synechococcus* inhabiting hot springs (Papke *et al.* 2003) and hyperthermophilic Archaea (Whitaker *et al.* 2003), but also for free living *Pseudomonas* spp. in pristine soil samples (Cho & Tiedje 2000). The question of isolation is of fundamental importance to understand the evolution of microcystin synthesis, i.e. populations may diverge through neutral processes (i.e. random drift, Kimura 1983), local adaptation processes, or both.

The ability to detect and interpret genotypic variation depends on the type of the gene under investigation and the resolving power of the genetic markers. Genes showing high variability with potential functional consequences are considered highly suitable to interpret genotypic variation in potentially isolated populations (Palys *et al.* 1997). The species *P. rubescens* (*sensu* Suda *et al.* 2002) only consists of microcystin genotypes while – similar to *Microcystis* sp. – populations assigned to *P. agardhii* consisted of microcystin genotypes and genotypes without the *mcy* genes (Kurmayer *et al.* 2004). It has been shown that *Microcystis* sp. colonies that were isolated from field samples of a eutrophic lake show a high genetic variability within *mcyBA1* (Kurmayer *et al.* 2002), for example, due to domain duplication and recombination within the *mcyB* gene (Mikalsen *et al.* 2003).

It was the aim of the present study to: (i) analyse the genetic variation within strains, (ii) identify genotypes that are indicative of the production of specific MC variants, (iii) and directly detect and quantify those genotypes in various lakes in the Alps. This knowledge is necessary to understand MC net production in phytoplankton as well as the microevolution of microcystin synthesis in cyanobacteria. For this purpose, 49 *Planktothrix* strains isolated in Europe were sequenced for the first adenylation domain (A1) of the *mcyB* gene. In order to characterize populations directly (and to overcome a possible isolation bias), restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles were assigned to each *mcyBA1* genotype and subsequently used to distinguish the gene pools of spatially separated populations.

Materials and methods

Cultivation and sampling of cyanobacteria

The 49 strains that were used in this study were either isolated from several European freshwater habitats, as described in Kurmayer *et al.* (2004), or acquired from international culture collections (Table 1). The isolates were assigned to the genus *Planktothrix* (*P. agardhii* and *P. rubescens*, Suda *et al.* 2002; minimum 99.2% similarity in 16S rDNA) according to the morphological criteria provided by Komarek (2003). In addition, all of the strains were genetically

Table 1 Variation of amino acids in position 2 of microcystin molecules (Arg, arginine; Hty, homotyrosine; Leu, leucine) produced among 49 strains of *Planktothrix rubescens* (rub) and *Planktothrix agardhii* (aga). Strains are ordered according to the proportion of each of the structural variants produced (mean \pm 1 SE). The number of MC measurements using HPLC analysis is indicated for each strain. Strains marked by asterisks have been shown to be inactive in MC production (Christiansen *et al.* 2006). The corresponding *AluI* (I–X) and *TseI* (I–IV) restriction types, and the sequence accession numbers of *mcyBA1* are indicated. Superscripts A–H identify identical genotypes. Strains have been isolated during the study by Kurmayer *et al.* (2004). Country codes (ISO format). SAG Culture Collection of Algae (Göttingen, Germany), PCC Pasteur Culture Collection (Institute of Pasteur, Paris, France), CCAP Culture Collection of Algae and Protozoa (Windermere, UK)

Amino acid in pos. 2	Microcystin data				No. of MC measurements	Restr. type		Genotype		Strain data		
	Arginine	Homotyrosine	Leucine	Undetermined		<i>AluI</i>	<i>TseI</i>	PC-IGS Acc. no.	<i>mcyBA1</i> Acc. no.‡	Species	Strain no.	Origin
Arg	99 \pm 1			1 \pm 1	5	I	I		AJ749276 ^A	rub	3	Mondsee (AT)
	100				2	I	I		AJ890255 ^A	rub	10	Mondsee (AT)
	–				2	I	I		AJ890263 ^H	rub	40*	Mondsee (AT)
	–				4	I	I		AJ890264	rub	91/1*	Mondsee (AT)
	99 \pm 1			1 \pm 1	2	I	I		AJ890256 ^A	rub	99	Mondsee (AT)
	97			3	2	I	I		AJ890257 ^A	rub	109	Mondsee (AT)
	97 \pm 1			3 \pm 2	4	I	I		AJ749282 ^A	rub	111	Mondsee (AT)
	95 \pm 2			5 \pm 2	2	I	I		AJ890258 ^A	rub	113	Mondsee (AT)
	–				2	I	I		AJ890259 ^A	rub	119*	Mondsee (AT)
	97 \pm 1			3 \pm 1	4	I	I	AJ558156	AJ890260	rub	34	Ammersee (DE)
	99 \pm 1			1 \pm 1	2	I	I		AJ890261 ^A	rub	81	Ammersee (DE)
	97 \pm 1			3 \pm 1	2	I	I		AJ890262 ^H	rub	86	Ammersee (DE)
	–				2	II	I	AJ558153	AJ890265 ^D	rub	62*	Irrsee (AT)
	–				3	II	I		AJ890266 ^D	rub	65*	Irrsee (AT)
	100 \pm 1			1 \pm 1	4	III	I		AJ749277	rub	64	Wörthersee (AT)
	100				3	V	IV	AJ558160	AJ749272 ^C	aga	CCAP1459/11A	L. Windermere (UK)
	100				3	V	IV	AJ558159	AJ749274 ^C	aga	CCAP1459/21	Esth. Water (UK)
100				2	IV	I		AJ890267	rub	72	Zürichsee (CH)	
Hty/ Leu		42 \pm 5	56 \pm 6	2	2	VI	II		AJ863131 ^B	rub	21-	Figur (AT)
		54 \pm 3	44 \pm 1	1 \pm 1	2	VI	II		AJ890275 ^B	rub	21/2	Figur (AT)
		93 \pm 7+		3 \pm 3	2	VI	II		AJ890276 ^B	rub	13	Schwarzensee (AT)
		95 \pm 5+		3 \pm 4	2	VI	II		AJ890277 ^B	rub	18	Schwarzensee (AT)
		94 \pm 6+		3 \pm 2	2	VI	II		AJ890278 ^B	rub	59	Schwarzensee (AT)
		88+		13	2	VI	II		AJ890279 ^B	rub	60	Schwarzensee (AT)
		86 \pm 2+		14 \pm 2	5	VI	II	AJ558152	AJ749278 ^B	rub	80	Schwarzensee (AT)
		69 \pm 3	32 \pm 4		3	VI	II	AJ558158	AJ749273 ^B	aga	CCAP1459/16	Blelham Tarn (UK)
		75 \pm 9	23 \pm 7	2 \pm 2	2	VI	II		AJ863133 ^B	aga	CCAP1459/17	Blelham Tarn (UK)
		90	10		2	VI	II		AJ863134 ^B	aga	CCAP1459/31	White Lough (UK)
		75 \pm 3	27 \pm 2		3	VI	II		AJ749275 ^B	aga	CCAP1460/5	L. Kasumigaura (JP)

Table 1 Continued

Amino acid in pos. 2	Microcystin data					Restr. type		Genotype		Strain data		
	Arginine	Homotyrosine	Leucine	Undetermined	No. of MC measurements	<i>AluI</i>	<i>TseI</i>	PC-IGS Acc. no.	<i>mcyBA1</i> Acc. no.‡	Species	Strain no.	Origin
Arg/ Leu	90		9	1 ± 1	5	IV	I		AJ749269	rub	39	Wannsee (DE)
	89		8 ± 3		2	IV	I		AJ890268	rub	42	Wörthersee (AT)
	91 ± 3		9 ± 3		2	IV	I		AJ890269	rub	101	Mondsee (AT)
	88 ± 4		12 ± 4		2	IV	I		AJ890270	rub	118	Mondsee (AT)
	70 ± 2		30 ± 2		5	VI	I	AJ558147	AJ749284	rub	CCAP1459/30	Plöner See (DE)
	87 ± 4		13 ± 4		2	VI	I	AJ558150	AJ890271	rub	CCAP1459/24	L. Ören (SE)
	80 ± 3		19 ± 2	1	3	VII	III	AJ558137	AJ749271	rub	SAG6.89	Plußsee, Plön (DE)
	95 ± 1		5 ± 1		4	VII	III	AJ558154	AJ749283	rub	PCC7821	L. Gjernsøen (NO)
	89 ± 1		11	1 ± 1	4	VIII	III		AJ749268	aga	32	Wannsee (DE)
	94		2	4	2	IX	I		AJ890280 ^F	rub	77	Wörthersee (AT)
	93 ± 2		3 ± 1	5 ± 1	2	IX	I		AJ890281 ^F	rub	89	Wörthersee (AT)
	—				2	IX	I		AJ890282 ^F	rub	120*	Mondsee (AT)
	95 ± 1		4 ± 1		5	X	I		AJ749270 ^E	aga	79	L. Arresø (DK)
	99		1		4	X	I		AJ749281	rub	108	Irrsee (AT)
90 ± 2		9 ± 2	1 ± 1	7	X	I	AJ558135	AJ441056 ^E	aga	CYA126/8	L. Langsjön (FI)	
94 ± 2	1 ± 1	5 ± 1		2	VI	I	AJ558151	AJ890272 ^G	rub	46	Zürichsee (CH)	
—				2	VI	I		AJ890273 ^G	rub	67*	Wörthersee (AT)	
91 ± 3	2	7 ± 3		2	VI	I		AJ890274	rub	75	Zürichsee (CH)	
83 ± 2	1 ± 1	14 ± 3	2 ± 1	4	VII	III		AJ749267	aga	31/1	Wannsee (DE)	
95 ± 1	1 ± 0	5 ± 1		6	X	I		AJ749279	rub	82	Ammersee (DE)	

†New microcystins with Hty/Tyr in position 2 of the microcystin molecule (R. Kurmayer, W. Yoshida, K. Ishida, T. Hemscheidt, unpublished).

‡Accession nos AJ749267–AJ749284, AJ863131–AJ863134 have been published by Kurmayer *et al.* (2005).

Table 2 Morphometric and limnological characteristics of lakes sampled for *Planktothrix rubescens*. Trophic data (M, mesotrophic; O, oligotrophic) are yearly minimum–mean–maximum value (sample size) of the year 2001 from the Kärntner Institut für Seenforschung, Carinthia (Afritzersee, Wörthersee), Bayrisches Landesamt, Wielenbach, Germany (Ammersee), Department for Environment, Kanton Aargau (Hallwilersee), Federal Agency for Water Management, Scharfling, Upper Austria (Irrsee, Schwarzensee) and Zurich Water Supply (Zürichsee). Chlorophyll *a* values were integrated over the water column. As inferred from microscopical inspection of net samples (30 µm mesh size) the abundance of *Planktothrix rubescens* is given: D, dominant; A, abundant; and R, rare; m a.s.l. is metres above sea level

Lake	N(°)	E(°)	m a.s.l.	Area (km ²)	Trophic status	Secchi depth (m)	Chlorophyll <i>a</i> (µg/L)	Abundance <i>Planktothrix</i>
Afritzer See, AT	46°44	13°46	750	0.5	M	3.3–4.0–5.2 (4)	2.4–4.4–6.8 (4)	A
Ammersee, DE	47°16	11°4	533	47	M	1.6–4.4–6.5 (11)	1.5–5.1–9 (11)	A
Hallwilersee, CH	47°20	8°10	449	10	M	1–2.7–5 (12)	8.8–18.9–30 (12)	D
Irrsee, AT	47°56	13°19	553	3.6	M	2.2–5.1–8.2 (12)	1.4–2.8–4.3 (7)	R
Mondsee, AT	47°48	13°22	481	14.2	M	2.4–3.8–5 (24)	1.8–4.3–9.6 (24)	A
Schwarzensee, AT	47°45	13°30	716	0.5	O	5.5–6.5–7.5 (3)	0.5–0.9–1.5 (3)	R
Wörthersee, AT	46°36	14°3	440	19.4	M	3.5–4.9–7.5 (7)	5.4–9–13.3 (7)	D
Zürichsee, CH	47°22	8°32	406	65	M	2.3–3.9–5.9 (18)	5–9.5–15.7 (12)	D

tested using *Planktothrix* specific primers binding to the intergenic spacer region within the phycocyanin operon (PC-IGS) as described in Kurmayer *et al.* (2004). Clonal strains were grown in BG-11 medium (Rippka 1988) modified to contain 2 mM NaNO₃ + 10 mM NaHCO₃ and kept in batch culture at 15 °C under continuous light conditions (5–10 µmol m⁻² s⁻¹, Osram Type L30W/77 Fluora).

Planktothrix rubescens was sampled by pulling a plankton net (30 µm in mesh size) from a depth of 20 m to the surface at the deepest part of eight lakes in the Alps (Table 2). Aliquots (a few mL from net samples) were filtered onto glass fibre filters (GF/C, Whatman) under vacuum pressure and stored frozen (–20 °C) until DNA extraction. In this study, each lake was sampled a total of three times from 2001 to 2005.

Microcystin analysis

All strains were analysed for their composition of microcystin variants, i.e. amino acid composition in position 2 of the MC molecule by HPLC-DAD (high performance liquid chromatography with diode array detection) as described (Kurmayer *et al.* 2004, 2005). Briefly, the cells were filtered on glass fibre filters (GF/C, Comesa) and MCs were extracted using 75% (w/v) aqueous methanol. MC variants were quantified at 240 nm by their characteristic absorption spectra (original spectrum and first order derivative) and retention times (Fastner *et al.* 1999) using a linear gradient of acetonitrile (0.05% TFA, Trifluoroacetic acid) against water (0.05% TFA) according to Lawton *et al.* (1994).

Demethylated variants containing arginine in position 2 of the molecule, i.e. [D-Asp³, Mdha⁷]-RR and [D-Asp³, Dhb⁷]-RR eluted from 13.4 to 13.9 min and 14.3 to 14.8 min, each, those containing homotyrosine (Hty) in position 2, [Asp³]-MC-HtyR eluted from 18.3 to 18.5 min, and those

containing leucine in position 2, [Asp³]-MC-LR eluted 19.3–19.6 min (Kurmayer *et al.* 2005). All strains from Lake Schwarzensee were found to produce new microcystin variants eluting from 23.5 to 24.0 min (Kurmayer *et al.* 2004). Amino acid analysis, one-dimensional, and two-dimensional NMR revealed that the two novel variants contained homotyrosine/tyrosine in position 2 of the molecule: [D-Asp³ (E)-Dhb⁷]-MC-HtyY and [D-Asp³ (E)-Dhb⁷]-MC-HtyHty (R. Kurmayer, W. Yoshida, K. Ishida, T. Hemscheidt, unpublished).

Genetic analysis

Two millilitres of each strain culture were incubated 1 h on ice and centrifuged at 16 000 g for 10 min. The pellet was lyophilized in a vacuum centrifuge at 30 °C. DNA extraction from the strains or field samples was performed as described in Kurmayer *et al.* (2003).

Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed in a vol. of 20 µL, containing 2 µL of QIAGEN PCR buffer (QIAGEN), 1.2 µL MgCl₂ (25 mM, QIAGEN), 0.6 µL deoxynucleotide triphosphates (10 µM each, MBI Fermentas), 1 µL of each primer (10 pmol/µL), 0.1 µL *Taq* DNA polymerase (5 U/µL⁻¹, QIAGEN), 13.1 µL sterile Millipore water and 1.0 µL of the diluted DNA extract (1:100). The PCR thermal cycling protocol included an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, with an annealing temperature of 52 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 2 min, followed by 72 °C for 5 min.

Oligonucleotide primers for *mcyBA1* amplification and sequencing are published in Kurmayer *et al.* (2005). *McyBA1totfwd* and *McyBA1totrev* were used to amplify the total fragment of the first adenylation domain (A1) of *mcyB* in strains and field samples (1693 bp, including the core motifs A1-A10; Marahiel *et al.* 1997). The primers were

Table 3 Schematic representation of *AluI* and *TseI* restriction profiles within *mcvBA1* (1693 bp) of *Planktothrix* spp. The size of the restriction fragments in bp was calculated from the sequences

Fragments (bp)	<i>AluI</i>										<i>TseI</i>			
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	I	II	III	IV
1693														
865											—		—	
828												—	—	
798												—		
735											—			
328	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
289	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
272	—	—	—	—	—	—								
263	—	—	—							—	—			
243				—	—	—	—	—						
225										—	—			
208		—			—		—							
201	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
179							—	—						
132	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
114			—			—		—		—				
106	—			—						—				
102	—			—						—				
94			—			—		—			—			
93											—			
67												—		
47							—	—	—	—				
46							—	—						
20				—	—	—	—	—						

specific for *Planktothrix*. Amplification products for *mcvB* were purified using the QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN,) and sequenced directly by standard automated fluorescence techniques (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under Accession nos AJ890255–AJ890282 (Table 1).

In addition, *mcvBA1* PCR products were digested using *AluI* and *TseI*. The restriction profiles were compared with the *mcvBA1* sequences. Restriction analysis was performed directly from the PCR amplification product using *AluI* (MBI Fermentas) and *TseI* (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. Digestions were performed in a vol. of 20 μ L, containing 0.2 μ L of the restriction enzyme (5 U/ μ L⁻¹) and 7 μ L of the PCR products and incubated at 37 °C (*AluI*) and 65 °C (*TseI*) for 3 h. The PCR products for *mcvB* were visualized in 1% agarose in 0.5 \times TBE (Tris-borate-EDTA buffer) and ethidium-bromide staining performed *via* agarose gel electrophoresis according to standard procedures (Sambrook *et al.* 1989). For the electrophoresis of restriction fragments, 2% agarose was used.

PCR products for *mcvBA1* obtained from field samples were cloned using the pDrive Cloning Vector system

(QIAGEN,) according to the manufacturer's instructions. The transformation efficiency was 2.1×10^4 – 7.0×10^4 colonies per μ g of DNA. After the transformed colonies were grown on an agar plate overnight, white colonies were randomly picked using the tip of a pipette, and redissolved in 10 μ L of Millipore water each. Re-PCR amplification from the white clones was always successful and the subsequent restriction analysis of colony specific PCR products revealed the unambiguous identification of a specific restriction type. The sequencing of *mcvBA1* primer binding sites performed for all of the different *AluI* restriction types observed among strains (Table 3) revealed high similarity, i.e. identical nucleotides for the binding site of the *mcvBA1*totrev primer (5'-AGA CTT GTT TAA TAG CAA AGG C-3'). One substitution of adenine by cytosine in position 6 of the *mcvBA1*totfwd primer for restriction types I, IV (5'-CAC CTA GTT GAA GAA CAA GTT CT-3') was found. Consequently, the PCR amplification of the restriction types from the field samples was considered unbiased.

Phylogeny and statistical analysis

Sequences (1451 bp) were aligned using multiple sequence alignment (CLUSTAL W 1.8) and similarities between

nucleotide sequences were calculated using DNADIST in the PHYLIP package (version 3.6 alpha; Felsenstein 1989). Maximum likelihood analysis was used to estimate nucleotide substitution parameters under a general time-reversible nucleotide substitution model by estimating the gamma distribution for variable rates among the sites. Ambiguous sites at which at least one sequence showed an undetermined nucleotide were removed (two sites) and the discrete gamma algorithm was used to approximate a continuous gamma distribution using five categories of rates (ncatG = 5) in the programme BASEML of the PAML package (version 3.14, Yang 1997). The best fit of the model showed (log-) likelihood $\ln L = -2871.96$ with parameter estimates for the transition/transversion ratio $\kappa = 2.07$ and the shape parameter $\alpha = 0.006$. Statistical significance of the branches was estimated by bootstrap analysis generating 100 replicates of the original data set using the PHYLIP package. Finally consensus trees following the 50% majority rule were computed.

The ratio of nonsynonymous (d_N) and synonymous (d_S) substitution rates per site was determined using the likelihood approach, which was implemented in the program CODEML of the PAML package (Yang 1998). The 'one ratio' model, assuming the same ratio for all of the branches in the phylogeny and the 'free ratio' model, assuming as many ratios as the number of branches in the phylogenetic tree were used. Branch-site models (Zhang *et al.* 2005) were employed to test for positive selection acting on specific branches in the phylogenetic tree showing increased d_N/d_S ratios. Branches of the tree were divided a priori into foreground and background lineages, and a likelihood ratio test was constructed by comparing a model that allows positive selection on the foreground lineages (the alternative model) with a model that does not allow such positive selection (the null model). The improved branch-site likelihood method for detecting positive selection implemented in the PAML package was used (version 3.15, Anisimova *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2005).

Following Tanabe *et al.* (2004) the runs test implemented in the program GENECONV (version 1.81, Sawyer 1999) was used to investigate whether substitutions were significantly clustered, and whether gene conversion (recombination) events occurred within *mcvBA1*. The settings used were the default (/g0 = mismatches within fragments were not allowed). The global *P*-value calculated from 10 000 random permutations of the alignment was used to assess the significance of any unusually long fragments that were sufficiently similar to be suggestive of past gene conversion. Recombination events were independently quantified using a recombination detection program (RDP) developed by Martin & Rybicki (2000) using the default settings (window size 10, highest acceptable *P*-value 0.05).

The frequency of the occurrence of genotypes and restriction types between the *Planktothrix* species was compared using the Yates-corrected chi-square statistic in

the analyses of 2×2 contingency tables (Zöfel 1992). The occurrence of restriction types between lakes was statistically compared using chi-square statistics for 8×2 contingency tables. Because the test can produce false results when the expected frequencies are small, proportions with an expected frequency < 1 were not tested (Jongman *et al.* 1995). The differences in the total number of restriction types found in a population were tested using one-way ANOVA followed by the Tukey test for pairwise comparison (overall significance $P = 0.01$).

Results

Genetic variation within the microcystin mcvB gene

Among the *mcvBA1* sequences obtained from the 49 *Planktothrix* strains, 25 different genotypes were detected, which differed in at least one base pair. We found eight *mcvBA1* genotypes (A-H) consisting of 2–11 strains each and 17 unique genotypes (Table 1). The genetic variability was between zero and 3.6%. Genotype B (11 strains) consisted of both species *Planktothrix agardhii* and *Planktothrix rubescens* while A (8), H (2), G (2), D (2), F (3) consisted of *P. rubescens* only. In contrast, C (2) and E (2) occurred significantly in *P. agardhii* only (chi-square test, χ^2 (d.f. = 1), $P < 0.05$).

The ratio of nonsynonymous (d_N) and synonymous (d_S) substitution rates for the entire phylogenetic tree was $d_N/d_S = 0.19$. Genotypes B, C, and the clade consisting of genotypes A (D, E, H, strains No34, 64, 91/1) showed a relatively high frequency of nonsynonymous substitutions resulting in $d_N/d_S = 0.73, 0.87, 0.23$, respectively. The branch-site model was used to detect a possible positive selection acting on genotypes B, C and the clade consisting of genotypes A, D, E, H, No34, 64, 91/1. Although the log-likelihood value of the alternative model was found improved when compared with the log-likelihood value of the null model, the difference between the two models was not found to be significant ($2\Delta l < 3.84$, d.f. = 1, $P > 0.05$).

The runs test implemented in GENECONV revealed 146 possible recombination events, i.e. gene fragments that were sufficiently similar to be suggestive of past gene conversion within *mcvBA1* (123–1379 bp, 12–68 polymorphic sites). All of the genotypes showed at least one putative recombination event with another genotype, in total 8, 85, and 53 events occurred within *P. agardhii*, *P. rubescens*, and between both species, respectively. The most frequent breaking points were from Pos. 526–883 (27), 707–890 (28) and 707–883 (10) of strain No10 (AJ890255). A high number of recombinations (250) was also detected using RDP.

Microcystin genotypes and microcystin variants

Genotypes A, C, D, H, No34, 64, 72 were found to contain exclusively arginine in position 2 of the molecule (Table 1,

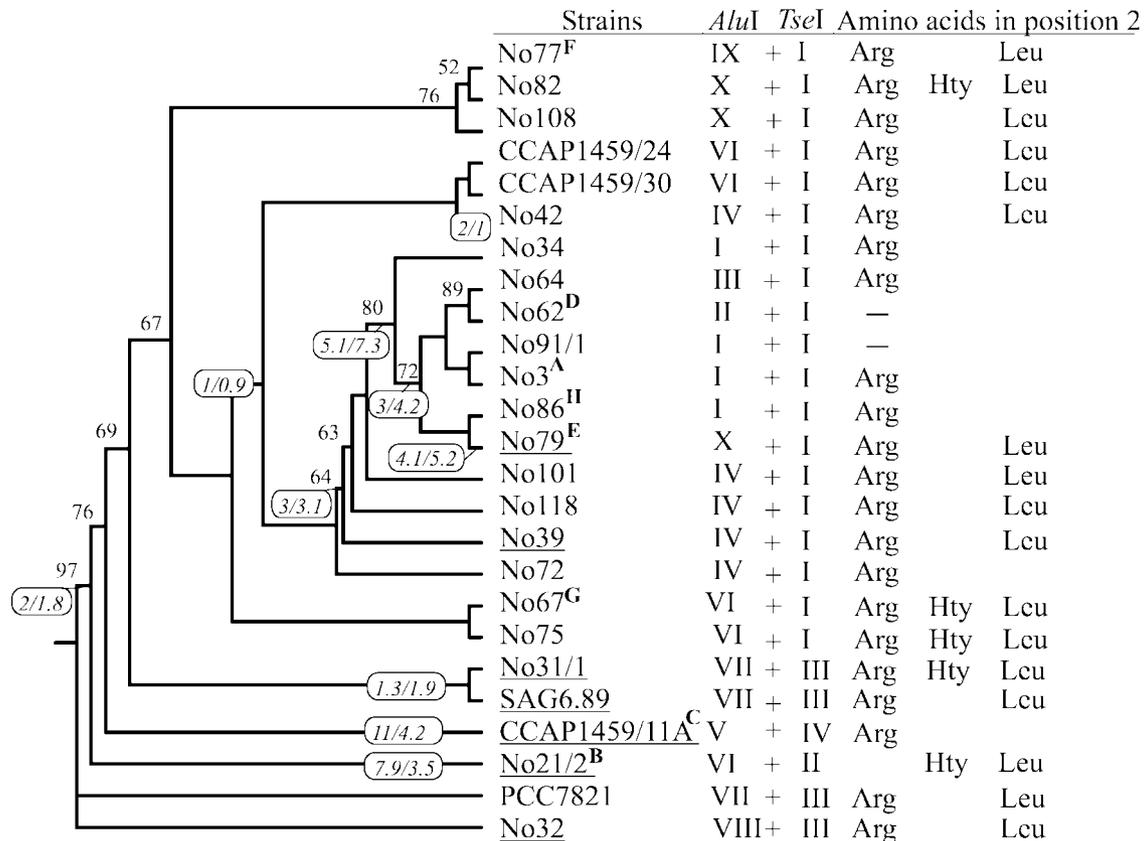


Fig. 1 Phylogenetic tree based on ML analysis from *mcyBA1* sequences (1.451 bp) from 49 *Planktothrix* spp. strains. Strains assigned to *Planktothrix agardhii* are underlined. Capitals A–H in the superscripts indicate the genotype groups (consisting of 2–11 strains) as indicated in Table 1. Genotype B consisted of both *Planktothrix rubescens* and *P. agardhii*. For each strain the corresponding restriction profile (*AluI*, *TseI*) and the occurrence of amino acids in position 2 of the microcystin molecule is indicated. The significant bootstrap percentages were obtained from 100 pseudo replicates. The two numbers shown in boxes are the maximum-likelihood estimates of the numbers of nonsynonymous/synonymous substitutions for the entire *mcyBA1* along that branch (only ratios higher than the background ratio of the 'one-ratio' model ($d_N/d_S = 0.19$) are shown, see text).

Fig. 1). Notably, the gene region coding for the putative binding pocket, which is responsible for substrate activation during microcystin synthesis (A4–A5, Stachelhaus *et al.* 1999, position 424–735 of strain No10, AJ890255, 312 bp), showed two binding pockets only: the first arginine binding pocket genotype comprised genotype C, while all other strains (A, D, H, No34, 64, 72) containing arginine only formed another binding pocket genotype differing by 4.1% from C, $d_N/d_S = 0.704$, estimated through pairwise comparison by the method of Yang & Nielsen (2000). Strains of genotype B contained microcystin with homotyrosine (tyrosine) and leucine, but never arginine in position 2. Its putative binding pocket differed from the arginine binding pocket of genotype C by 3.2% ($d_N/d_S = 3.34$) and from the other arginine binding pocket of genotype A (D, H, strains No34, 64, 72) by 2.9% ($d_N/d_S = 0.61$). All other genotypes contained arginine and leucine, and in some cases additional low levels of homotyrosine (G, No31/1, 75, 82). Strains

No40, 62, 65, 67, 91/1, 119, 120 were found inactive in MC production, which was partly caused by transposases or gene deletions (Christiansen *et al.* 2006); however, those strains did not differ in sequence compared with active *mcy* genotypes (Table 1).

Distribution of microcystin gene restriction types among strains

Out of the 25 genotypes, 10 restriction types were obtained with *AluI* and four restriction types were obtained with *TseI* (Table 3, Fig. 1). In total, 11 *AluI*+*TseI* combinations were observed. While some restriction types were found in both strains of *P. rubescens* and *P. agardhii* (VI+II) others were found only in *P. agardhii* (V+IV, VIII+III) or in *P. rubescens* (I+I, II+I, III+I, IX+I). The occurrence of I+I in *P. rubescens* and V + IV in *P. agardhii* was statistically significant (chi-square test, χ^2 (d.f. = 1), $P < 0.05$). The

restriction types I+I, II+I, III+I comprised a group of most closely related genotypes of *P. rubescens*, which differed in 0.5% of the base pairs only (15 strains, A, D, H, No34, 64, 91/1).

Restriction types I+I, II+I, III+I, V+IV identified those genotypes with arginine only in position 2 of the molecule. Genotype B lacking arginine was identified by restriction type VI + II. Those genotypes containing arginine/leucine (and homotyrosine) were identified by VI+I, VII+III, VIII+III, IX+I, X+I.

Distribution of microcystin gene restriction types among populations

In order to test the reproducibility of the results on the restriction type proportions from cloning libraries, *mcvBA1* genes from field samples (Mondsee, 9 December 2003, Wörthersee, 28 August 2003) were independently amplified by PCR threefold, cloned, and subsequently digested using *AluI* after the re-amplification of 40 clones. The results were reproducible for the dominant restriction types (I, II, IV, VI) as well as the absent restriction types (VII, VIII). The results for the subdominant genotypes were more variable (Table 4).

In total, 24 *AluI*+*TseI* combinations were observed. Out of a total of 985 clones, the five most frequently detected restriction types were IV+I (23.8%), I+I (20%), VI+II (13%), X+I (10%), and VI+I (5.1%). All of the other restriction types occurred < 5% (Fig. 2). Nine restriction types occurred only once (I+III, I+IV, II+III, III+II, III+III, IX+III, IV+III) or twice (VII+III, X+III). Other restriction types showed new *AluI* or *TseI* profiles that were derived from unknown organisms and that occurred at all of the sampling sites (11.9%). Two restriction types that were observed among the strains of *P. agardhii* (V+IV, VIII+III) were not detected in the field samples.

The distribution of restriction types differed significantly between sites; for example, I+I and IV+I occurred fre-

quently in many lakes and were not found in Schwarzensee. In contrast, Schwarzensee was dominated by VI+II or X+I. Restriction type VI+II occurred in all of the lakes except for Irrsee and X+I was not found in Afritzersee but showed high frequency in Irrsee and Schwarzensee. In addition, Schwarzensee had a significantly lower total number of restriction types when compared to the other lakes (one-way ANOVA, d.f. = 23, $P = 0.01$).

In summary, many populations were found to be genetically heterogeneous. Closely located and spatially separated populations were found to differ significantly in *mcvBA1* restriction type composition. Most populations contained *mcvBA1* genotypes indicative of the production of arginine, homotyrosine, and leucine. In contrast, genotypes indicative of arginine were absent in Schwarzensee, and that of homotyrosine were absent in Irrsee during the study period.

Discussion

Taxonomic distribution of microcystin genes in Planktothrix spp.

In this study, certain genotypes (C, E) and restriction types (V+IV, I+I) were found to occur exclusively either in one or the other species. On the other hand, genotype B occurred in both species and genotypes E, No32, and No39 of *Planktothrix agardhii* were found to be the most closely related to the genotypes of *Planktothrix rubescens*. This conflict between taxonomy and the phylogenetic assignment of *mcvBA1* genotypes can be best explained by relatively recent recombination events within *mcvBA1*. Homologous recombination has been increasingly recognized as an important force in prokaryotic evolution (Feil 2004). For example, in pathogenic bacteria, recombination has been estimated to change alleles fivefold to 15-fold more frequently than mutation (e.g. Feil *et al.* 2003). For cyanobacteria, Rudi *et al.* (1998) demonstrated the occurrence of recombination

Table 4 Proportion of restriction types (I–X; New, new restriction types) of *mcvBA1* obtained through *AluI* digestion after three independent PCR amplifications from field samples, cloning of the PCR product, and PCR-re-amplification of 40 randomly selected white clones from the respective clone library (1–3)

Clone library	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	New
Mondsee, 9 December 2003											
1	35	8	8	10	3	18	0	0	10	3	8
2	16	22	8	22	3	5	0	0	3	3	19
3	5	33	0	23	5	10	0	0	8	3	13
Mean ± 1 SE	19 ± 9	21 ± 7	5 ± 3	18 ± 4	3 ± 1	11 ± 4	0	0	7 ± 2	3 ± 0	13 ± 3
Wörthersee, 28 August 2003											
1	30	5	3	20	5	13	0	0	3	8	15
2	26	31	10	7	0	17	0	0	0	0	10
3	26	5	5	14	0	19	0	0	12	2	19
Mean ± 1 SE	27 ± 1	14 ± 9	6 ± 2	14 ± 4	2 ± 2	16 ± 2	0	0	5 ± 4	3 ± 2	14 ± 3

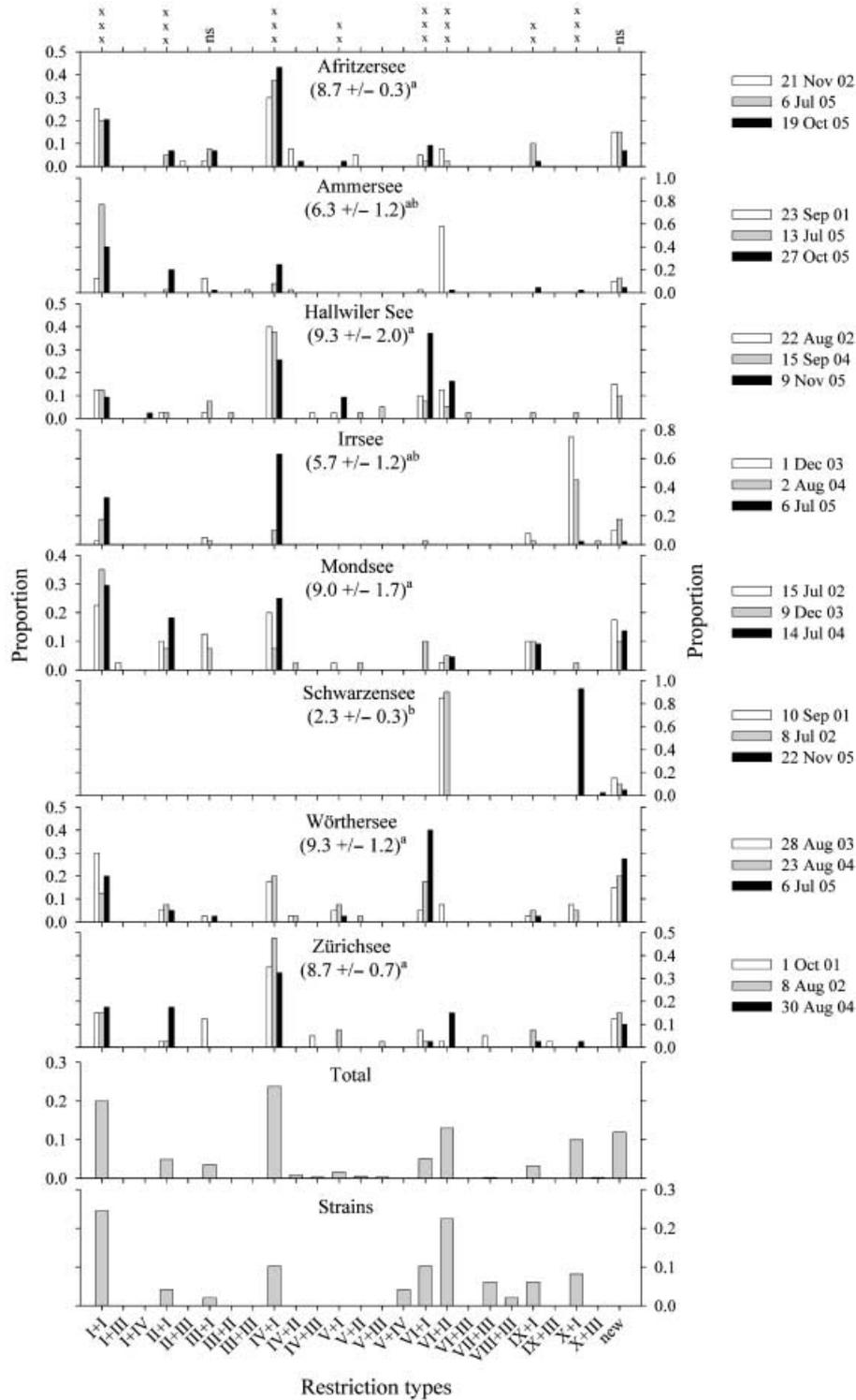


Fig. 2 Proportion of *AluI*+*TseI* restriction types obtained from amplified and cloned *mcvBA1* PCR products from eight different *Planktothrix* spp. populations for three sampling dates. For each sample, 40 clones of *mcvBA1* PCR products were analysed and the percentage of a specific restriction type was calculated. The proportion for the total population and for the 49 sequenced strains is provided in the lower two graphs. Note that the scales of the y-axes are different. Significant differences of the proportions of restriction profiles between the eight lakes are marked by crosses at the top (xxx, $P < 0.001$, xx, $P < 0.01$, ns, not significant). The mean \pm 1 SE number of the total number of restriction types found in a population is given in parentheses. Superscripts a, ab, b indicate homogeneous subsets whose highest and lowest means in the number of different restriction types are not significantly different ($P > 0.05$).

for *rbcL* (D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase) and the less conserved *rbcX* gene with a possible chaperonin-like function. Based on DNA-DNA hybridization studies, Suda *et al.* (2002) concluded that *P. rubescens* and *P. agardhii* differentiated relatively recently and the relatively high genetic similarity may favour the occurrence of recombination (Roberts & Cohan 1993). Typically, both species do not occur in the same freshwater system; however, in some lakes both species have been found to co-occur over the course of years (e.g. Blelham Tarn, Davis *et al.* 2003). It would be interesting to know whether this co-occurrence favours the occurrence of interspecific recombination events.

Microevolution of microcystin genes

In recent years, a number of recombination events within microcystin genes were reported (Mikalsen *et al.* 2003; Tanabe *et al.* 2004; Kurmayer *et al.* 2005), suggesting that microcystin genes are under continuous modification and re-organization. While Tanabe *et al.* (2004) observed the recombination of shorter DNA fragments (< 1000 bp) within *mcyA* (but not within *mcyD*, *mcyG*, *mcyJ*), Kurmayer *et al.* (2005) reported the replacement of whole domains, i.e. the typical N-methyl-dehydroalanine adenylation domain (2854 bp) of *mcyAA1* was replaced by an adenylation domain without the N-methyl transferase (1692 bp) resulting in dehydrobutyrine in position 7 instead of the common N-methyl-dehydroalanine. The flanking regions as well as the site of recombination in *mcyAA1* were found to be identical within 12 strains containing the replaced domain implying that this recombination event happened only once (R. Kurmayer, C. Molitor, unpublished). In this study, a larger number of short fragments that are indicative of recombination were observed implying that parts of the *mcyB* gene were frequently transferred between lineages of *Planktothrix* spp. It is concluded that the *mcyA* and *mcyB* genes generally show a mosaic structure rather than a bifurcating phylogenetic tree.

The 'one ratio' maximum likelihood model estimated $d_N/d_S = 0.19$, which is similar to the ratios calculated by Tanabe *et al.* (2004), i.e. $d_N/d_S = 0.2$ (*mcyA*), 0.14 (*mcyD*), 0.17 (*mcyG*), 0.11 (*mcyJ*). Rantala *et al.* (2004) reported $d_N/d_S < 1$ for *mcyA*, *mcyD*, *mcyE*. An excess of synonymous substitutions over nonsynonymous ones indicates that *mcy* genes are subject to purifying selection and mutations affecting the protein sequence are in general deleterious. Notably, the genotypes B (indicative of homotyrosine, leucine but no arginine) and C (indicative of arginine only) showed higher d_N/d_S ratios implying either relaxation of purifying selection or positive selection. Averaging d_N/d_S rates over all of the sites of the protein typically underestimates positive selection because the ratio is overwhelmed by the ubiquitous purifying selection. To increase the power of detection branch-site models have been invented

to test for positive selection acting on specific sites of specific genotypes (Yang & Nielsen 2002; Zhang *et al.* 2005) or on a subset of sites in the whole phylogenetic tree (Yang *et al.* 2000). Indeed employing site models (Yang *et al.* 2000) 3% of the sites within the whole *mcyBA1* phylogeny were found positively selected ($d_N/d_S \sim 5.0$, unpublished data). However, no statistically significant support for positive selection in specific branches was found, implying that some sites in genotypes B, C rather experienced a relaxation of selective constraints. In the future, quantifying the fitness of specific microcystin ecotypes (i.e. Kurmayer *et al.* 2005) under various environmental conditions will help to elucidate whether the observed differences in d_N/d_S ratios resulted from possible adaptive speciation events or from a relaxation of selective constraints.

Divergence of microcystin genotype composition between populations

In this study, genotype C (two strains isolated from the English Lake District, UK) was never detected in field samples in the Alpine lakes. In addition, populations were found to differ with regard to the occurrence of specific genotypes as well as to the number of genotypes occurring in total in a specific population. This study is the first that documents homogeneous and more heterogeneous populations of aquatic cyanobacteria existing in closely located yet spatially isolated habitats over the course of several years. According to Horner-Devine (2004) three fundamental processes, the rates of dispersal, speciation, and extinction all contribute to the geographical patterns. There is no reason to assume that *P. rubescens* has fewer dispersal capabilities than other aquatic prokaryotes. Typically *P. rubescens* occurs in depths of 9–12 m (in Mondsee) with low light intensity (i.e. neutral buoyancy in Lake Zürich occurred between 4 and 8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Walsby *et al.* 2004). Notably, the populations in Schwarzensee and Irrsee showing the lowest genetic diversity observed in this study, also had the lowest numbers of individuals when compared with the populations of high genetic diversity (Mondsee, Wörthersee) as reported previously (Christiansen *et al.* 2006; Table 4). Recolonization of those habitats by single genotypes after the extinction of the population during winter or other catastrophic events may contribute to the low homogeneity and the high degree of clonality observed in sparse populations. Consequently isolation combined with low numbers of individuals may lead to divergence in microcystin synthesis through genetic drift.

Acknowledgements

We are grateful to Guntram Christiansen and anonymous referees for their helpful comments on earlier versions of the manuscript.

We would like to thank Martin Meixner for DNA sequencing. Michi Wernld and Johanna Schmidt provided excellent assistance in the laboratory. We are grateful to the access to samples from Hallwilersee by Arno Stöckli (Abteilung für Umwelt, Kanton Aargau) and from Zürichsee by Judith Blom (University of Zürich, Limnological Station). Günther Bruscek and Karl Mayrhofer (BAW Scharfling, Institut für Gewässerökologie) provided samples from Irrsee and Schwarzensee. This study was supported by the Austrian Science Fund (P18185).

References

- Anisimova M, Nielsen R, Yang Z (2003) Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. *Genetics*, **164**, 1229–1236.
- Anneville O, Souissi S, Gammeter S, Straile D (2004) Seasonal and inter-annual scales of variability in phytoplankton assemblages: comparison of phytoplankton dynamics in three peri-alpine lakes over a period of 28 years. *Freshwater Biology*, **49**, 98–115.
- Barker GLA, Handley BA, Vacharapiyasophon P, Stevens JR, Hayes PK (2000) Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (Cyanobacteria) filaments in the Baltic Sea. *Microbiology*, **146**, 2865–2875.
- Carmichael WW, Beasley V, Bunner DL *et al.* (1988) Naming cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, **26**, 971–973.
- Challis GL, Ravel J, Townsend CA (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chemistry and Biology*, **7**, 211–224.
- Cho J, Tiedje J (2000) Biogeography and degree of endemism of fluorescent pseudomonas strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5448–5456.
- Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Börner T, Dittmann E (2003) Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *Journal of Bacteriology*, **185**, 564–572.
- Christiansen G, Kurmayer R, Liu Q, Börner T (2006) Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 117–123.
- Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, Brick P (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *The EMBO Journal*, **16**, 4174–4183.
- Davis PA, Dent M, Parker J, Reynolds CS, Walsby AE (2003) The annual cycle of growth rate and biomass change in *Planktothrix* spp. in Blelham Tarn, English Lake District. *Freshwater Biology*, **48**, 852–867.
- Fastner J, Erhard M, Carmichael WW *et al.* (1999) Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Archiv für Hydrobiologie*, **145**, 147–163.
- Feil E (2004) Small change: keeping pace with microevolution. *Nature Reviews*, **2**, 483–495.
- Feil E, Cooper J, Grundmann H *et al.* (2003) How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology*, **185**, 3307–3316.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, **5**, 164–166.
- Finlay B (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, **296**, 1061–1063.
- Henriksen P, Moestrup Ø (1997) Seasonal variations in microcystin contents of Danish cyanobacteria. *Natural Toxins*, **5**, 99–106.
- Horner-Devine M, Carney K, Bohannan J (2004) An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society London. Series B, Biological Sciences*, **271**, 113–122.
- Jongman R, Ter Braak C, Van Tongeren O (1995) *Data Analysis in Community and Landscape Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kimura M (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Komarek J (2003) Planktic oscillatoriallean cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects). *Hydrobiologia*, **502**, 367–382.
- Kurmayer R, Dittmann E, Chorus I (2002) Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology*, **43**, 107–118.
- Kurmayer R, Christiansen G, Chorus I (2003) The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 787–795.
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Börner T (2004) Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environmental Microbiology*, **6**, 831–841.
- Kurmayer R, Christiansen G, Gumpenberger M, Fastner J (2005) Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology*, **151**, 1525–1533.
- Lawton LA, Edwards C, Codd GA (1994) Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *The Analyst*, **119**, 1525–1530.
- Lodders N, Stackebrandt E, Nübel U (2005) Frequent genetic recombination in natural populations of the marine cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Environmental Microbiology*, **7**, 434–442.
- Luukkainen R, Sivonen K, Namikoshi M, Färdig M, Rinehart KL, Niemelä SI (1993) Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 2204–2209.
- Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews*, **97**, 2651–2673.
- Martin D, Rybicki E (2000) rDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, **16**, 562–563.
- Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM *et al.* (2003) Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *Journal of Bacteriology*, **185**, 2774–2785.
- Palys T, Nakamura LK, Cohan FM (1997) Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, **47**, 1145–1156.
- Papke RT, Ramsing NB, Bateson MM, Ward DM (2003) Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, **5**, 650–659.
- Papke RT, Ward DM (2004) The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiology Ecology*, **48**, 293–303.
- Rantala A, Fewer DP, Hisbergues M *et al.* (2004) Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **101**, 568–573.

- Rippka R (1988) Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, **167**, 3–27.
- Roberts M, Cohan F (1993) The effect of DNA sequence divergence on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics*, **134**, 401–408.
- Roberts M, Cohan F (1995) Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution*, **49**, 1081–1094.
- Rücker J, Wiedner C, Zippel P (1997) Factors controlling the dominance of *Planktothrix agardhii* and *Limnothrix redekei* in eutrophic shallow lakes. *Hydrobiologia*, **342/343**, 107–115.
- Rudi K, Skulberg OM, Jakobsen KS (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *Journal of Bacteriology*, **180**, 3453–3461.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning — A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sawyer S (1999) *GENECONV: a Computer Package for the Statistical Detection of Gene Conversion*. Distributed by the author, Department of Mathematics, Washington University in St Louis, available at <http://www.math.wustl.edu/~sawyer>.
- Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and Biology*, **6**, 493–505.
- Suda S, Watanabe MM, Otsuka S *et al.* (2002) Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoroid cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 1577–1595.
- Tanabe Y, Kaya K, Watanabe MM (2004) Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. *Journal of Molecular Evolution*, **58**, 633–641.
- Tillett D, Dittmann E, Erhard M *et al.* (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry and Biology*, **7**, 753–764.
- Walsby AE, Ng G, Dunn C, Davis PA (2004) Comparison of the depth where *Planktothrix rubescens* stratifies and the depth where the daily insolation supports its neutral buoyancy. *New Phytologist*, **162**, 133–145.
- Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*, **301**, 976–978.
- Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Computer Applications in Biosciences*, **13**, 555–556.
- Yang Z (1998) Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 568–573.
- Yang Z, Nielsen R (2000) Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 32–43.
- Yang Z, Nielsen R (2002) Codon-substitution models for detecting molecular adaptation at individual sites along specific lineages. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 908–917.
- Yang Z, Nielsen R, Goldman N, Krabbe Pedersen A-M (2000) Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*, **155**, 431–449.
- Zhang J, Nielsen R, Yang Z (2005) Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 2472–2479.
- Zöfel P (1992) *Statistik in der Praxis*, 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Our research aims towards understanding the evolution and maintenance of the impressive diversity of secondary metabolites in cyanobacteria. Apart from the problems involved in using water bodies affected by toxic cyanobacteria, the evolution of genes involved in secondary metabolite synthesis is also interesting from a biological perspective. By linking molecular insights with ecological research, we hope to identify the evolutionary mechanisms affecting the synthesis of natural products on a molecular and ecosystem level.

Diploid Amazon mollies (*Poecilia formosa*) show a higher fitness than triploids in clonal competition experiments

D. K. Lamatsch · K. P. Lampert · P. Fischer · M. Geiger · I. Schlupp · M. Schartl

Received: 2 January 2008 / Accepted: 25 April 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract The gynogenetic livebearing Amazon molly (*Poecilia formosa*) is a sexual parasite that exploits males of closely related species for sperm. This is needed as physiological stimulus for embryo development; however, none of the male's genes are normally incorporated into the genome of the gynogenetic offspring. Mostly diploid individuals were reported from the natural habitats in North-Eastern Mexico and South-Eastern Texas but stable populations of triploids have been reported from the Río Soto la Marina drainage and in the Río Guayalejo in North-Eastern Mexico. Triploidy is the result of defects in the mechanisms that normally clear the host sperm from the ameiotic diploid egg. Triploids also reproduce gynogenetically and their frequencies fluctuate markedly between years, seasons, and localities. To understand the dynamics of this mating system, it is important to understand the relative reproductive success of triploids and diploids. We hypothesize that triploids should have a selective advantage over diploids due to heterosis and/or gene redundancy based on the additional genetic material from the sexual host. However, clonal competition

Electronic Supplementary Material The online version of this article (doi:[10.1007/s10682-008-9264-2](https://doi.org/10.1007/s10682-008-9264-2)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. K. Lamatsch (✉) · K. P. Lampert · P. Fischer · M. Schartl
Physiological Chemistry I, Theodor-Boveri-Institute, Biocenter, University of Würzburg, Am
Hubland, 97074 Würzburg, Germany
e-mail: Dunja.Lamatsch@oeaw.ac.at

Present Address:

D. K. Lamatsch
Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, 5310 Mondsee, Austria

Present Address:

K. P. Lampert
Department of Evolutionary Ecology and Biodiversity of Animals, University of Bochum, 44780
Bochum, Germany

M. Geiger
MPI for Behavioural Physiology, Seewiesen, 82319 Starnberg, Germany

I. Schlupp
Department of Zoology, University of Oklahoma, 730 Van Vleet Oval, Norman, OK 73019, USA

experiments revealed a clear reproductive advantage of diploids competing with triploids. This result contradicts not only our hypothesis but also the stable co-existence of diploids and triploids in natural habitats. Frequency dependent selection, niche partitioning and environmental heterogeneity are discussed as possible explanations.

Keywords Polyploidy · Clonal reproduction · Host species · Sperm-dependent parthenogenesis · Gynogenesis · Paternal leakage

Introduction

The advantages and disadvantages of unisexual reproduction are still a matter of debate (West et al. 1999). While unisexually reproducing species should have the clear advantage of not having to produce males, and therefore should have a faster reproductive rate than sexually reproducing species they should also be slower to evolve and evolutionary short lived due to an accumulation of deleterious mutations (Kondrashov 1988; Bell 1982; Muller 1932). In asexuals no genotype can ever produce offspring with fewer mutations than its own load. Therefore, the accumulation of deleterious mutations will lead to a fitness decline and should in theory lead to the extinction of parthenogenetic forms within 10^4 – 10^5 generations (Lynch et al. 1993; Lynch and Gabriel 1990). Strategies to overcome this constraint include forms of ‘rare sex’ and have been hypothesized to be cyclical parthenogenesis (Kondrashov 1984), occurrence of rare males (Martens 1998), simultaneous occurrence of sexual and asexual (mixed) reproduction (Schön et al. 2000; Martens 1998), and paternal leakage in species reproducing by sperm-dependent parthenogenesis, also called gynogenesis or kleptospermy (Bogart et al. 2007; Scharl et al. 1995a). In unisexual vertebrates cyclic changes of reproductive mode, hermaphrodites, and mixed reproduction are unheard of. To overcome the restraints of unisexual reproduction gynogenetic all-female vertebrates therefore may rely on paternal introgression, eventually leading to ploidy elevation (Beukeboom 2007; D’Souza et al. 2006). Polyploidy is the heritable condition of possessing more than two complete sets of chromosomes. Polyploids are very common among plants, but can also be found among fish and amphibians. A specific link between polyploidy and asexual reproduction has been observed in insects, flatworms, fishes, and reptiles (Mogie 2007; Mable 2004; Otto and Whitton 2000; Benazzi and Lentati 1999; Lynch et al. 1993; Avise et al. 1992; Suomalainen et al. 1987; Benazzi Lentati 1979; Schultz 1969; Christensen 1960). For unisexual species there are some advantages as well as disadvantages of becoming polyploid (for an overview see Comai 2005 and Otto 2007). Disadvantages stated for polyploidy are so far mainly based on theoretical considerations and include the disrupting effects of nuclear and cell enlargement, an increased probability of polyploid mitosis and meiosis to produce aneuploid cells, as well as unbalanced gene expression (Comai 2005; Pandian and Koteeswaran 1998; Horner and Macgregor 1983). It is known that higher DNA contents are correlated with bigger cell sizes. As cell volume increases, however, the ratio of total surface area must decrease which is expected to change the functional ability of polyploids (Kozłowski et al. 2003; Oliva-Teles and Kaushik 1987). On the other hand, cell number in polyploid vertebrates is reduced to maintain the normal size of the individual. Some studies show a decrease in the number of erythrocytes per unit volume of blood in triploid fishes (reviewed by Pandian and Koteeswaran 1998). Horner and Macgregor (1983) found a positive relationship of genome size and cell cycle time: The larger the genome the larger the cell and the longer the cell cycle time. Prolonged cell cycle times might negatively

influence development and generation time as well as gamete production and wound healing.

Proposed advantages of polyploidy are heterosis and gene redundancy (Comai 2005). Experimental evidence has been provided that allopolyploids (i.e., polyploids with chromosomes derived from different species, e.g., by hybridisation) are more vigorous than their diploid progenitors (heterosis). This might be due to higher immunological resistance (Pandian and Koteeswaran 1998), higher survival and faster growth (Pandian and Koteeswaran 1998), sexual mimicry (Beukeboom and Vrijenhoek 1998), local adaptation (Beukeboom and Vrijenhoek 1998), or general higher within individual genetic variability (Rasch and Balsano 1989). Gene redundancy will shield polyploids from the deleterious effect of mutations (Otto and Whitton 2000). Moreover, the increase in gene copy number resulting from polyploidisation may lead to increased functional gene diversity. It has been found in bdelloid rotifers that additional gene copies have diverged in function so that the proteins they encode play complementary roles in survival of dry conditions (Pouchkina-Stantcheva et al. 2007). This “neo”- or “sub”-functionalisation of gene copies increases the functional gene diversity and therefore the ecological adaptation of species (Pouchkina-Stantcheva et al. 2007; Taylor and Raes 2004; Otto and Whitton 2000).

A well-studied vertebrate example for a unisexual species showing different ploidy levels is the Amazon molly (*Poecilia formosa*). It arose by hybridisation between two closely related species, *P. mexicana* and *P. latipinna*. Molecular analyses date its hybrid origin to approximately 280,000 years/840,000 generations ago (Lampert and Schartl 2008; Schartl et al. 1995b; Avise et al. 1991). This contradicts the predictions on the longevity of ameiotic species of 10^4 – 10^5 generations (Loewe and Lamatsch 2008; Judson and Normark 1996; Lynch and Gabriel 1990; Muller 1964).

Poecilia formosa is a small live-bearing fish which inhabits fresh water streams of Northern Mexico and Southern Texas. Its mode of reproduction is gynogenesis, i.e., embryogenesis is triggered by sperm of males of closely related species, mostly *P. mexicana* and *P. latipinna*, without fertilizing the egg. The mechanism which normally excludes the sperm from the oocyte may fail resulting in actual syngamy of the unreduced diploid egg nucleus (‘ml’ according to its hybrid origin) and the sperm nucleus (‘m’ or ‘l’). This will lead to triploid offspring (‘mlm’ or ‘mll’). Only a few triploid hybrids have been identified where *P. formosa* is sympatric with *P. latipinna* (four specimens ‘mll’ from the Rio Grande) or with *P. mexicana mexicana* (one specimen ‘mlm_m’ from the Rio Tuxpan) (Monaco et al. 1984). The majority of triploid unisexuals occur where *P. formosa* is sympatric with *P. mexicana limantouri* (‘mlm_l’). In natural habitats mostly diploids occur, however, stable triploid populations co-occur with diploids in mixed groups in the Río Soto la Marina drainage (Lampert et al. 2005; Rasch and Balsano 1974) and in the Río Guayalejo (Schories et al. 2007). These have been found to be of the ‘lmm_l’ type according to the presence of *P. m. limantouri* as host. The overall frequency of triploid females ranges from 5% to 20% (Lampert et al. 2005; Rasch and Balsano 1974), however, significant fluctuations between years, season and localities have been reported with up to 80% triploids on local scale (Rasch and Balsano 1974). Despite a slightly—but not significantly lower reproductive output of triploid females (Balsano et al. 1985; Rasch and Balsano 1974) natural selection seems to favor triploid juveniles over diploid ones (Balsano et al. 1983; Rasch and Balsano 1974).

Based on the latter observation and the theoretically positive effect of the increased heterosis in triploids due to the additional genetic material from the sexual host, we hypothesized that triploids should have a selective advantage over diploids. We tested this hypothesis in competition experiments where under identical environmental conditions

triploids competed with diploids for access to males. Unexpectedly, we found that diploids outcompeted triploids in these experiments.

Materials and methods

Experimental set-up

An equal number of diploid and triploid *P. formosa* of laboratory bred strains from the same locality (Barretál, Río Purificación, Tamaulipas, Mexico) were put together in one tank with an approximate volumes of 360–576 l (Table 1). Prior to the experiment ploidy has been confirmed by flow cytometry (Lamatsch et al. 2000). To simplify the experimental set up and interpretation, a single diploid and a single triploid clone were used in the experiments (Lampert et al. 2008). This reflects the natural situation for the triploids as triploids show a very low clonal variability in the field (Lampert et al. 2005), and the clone used in the experiments is the dominant clone in the field. For the diploids, clonal frequencies changed between the years but the clone used for our experiment was commonly found in field sites (KPL unpublished). Care was taken that diploid and triploid females used in each experiment did not differ significantly in size (standard length, recorded before start) (Table 1). Since no significant differences between birth size among diploid and triploid *P. formosa* females could be detected under lab conditions (Lamatsch 2001) we assumed equal size reflects equal age under the same laboratory conditions. Varying starting numbers of individuals (14–20) were due to varying availability of equally sized individuals of both ploidy levels. All *P. formosa* were virgins, and two males of *P. mexicana limantouri* (Barretál, Río Purificación, Tamaulipas, Mexico) were added as sperm donors after 1 week of acclimation resulting in a sex ratio of 1:7–1:10 (males/females). Due to the presence of diploid and triploid asexual females in addition to females of the sexual host species the sex ratio in natural habitats is extremely female-biased. In 1998 we found the female sex ratio to be 4.6 and 7.4 times the number of males (Döbler 1998) which is in accordance with data from Rasch and Balsano (1974) who found sex ratios from 5.9 to 6.7. We used an sex ratio of 7 to 10 times considering that access to female under aquarium conditions might be higher as the fish are not concerned with predator avoidance, finding food or seeking for mating partners in larger water bodies. Since most receptive females in natural habitats were inseminated (DKL pers. observation), these extremely female-biased sex ratios might at least partly be counterbalanced by the high potential rate of reproduction of males and the asynchrony in female receptivity.

The presence of males was controlled at least weekly and males were substituted if necessary (approximately every 6–8 weeks). Dead fish were stored in 70% ethanol for ploidy measurement to control for varying mortality rates in diploids and triploids throughout the course of the experiment.

In Würzburg this experiment was set up six times independently (designated as ‘W’ trials). In addition, two more experimental trials were set up in Seewiesen (designated as ‘S’ trials). To control for potential spontaneous changes in ploidy level (triploids losing a set of chromosomes and/or diploids gaining one), two tanks were installed containing only the diploid or the triploid clone, respectively ($N = 20$ females, one male), and randomly checked for ploidy approximately every 6 months. All fish were maintained for 18 months under standard conditions as described for *Xiphophorus* (Kallman 1975) at 24–27°C with a 13 h light/11 h dark light cycle and fed twice a day ad libitum.

Table 1 Experimental setup of Würzburg (W1-6) and Seewiesen trials (S1, S2)

	Tank size (cm)	Volume (l)	Number of fishes at $t = 0$	Size of fishes (mm)
W1	100 × 60 × 60	360	14 diploid	28.79 ± 1.26
			14 triploid	29.07 ± 2.37
W2	120 × 60 × 60	432	20 diploid	27.33 ± 1.39
			20 triploid	27.25 ± 1.18
W3	120 × 60 × 60	432	17 diploid	31.29 ± 1.60
			17 triploid	31.24 ± 1.52
W4	120 × 60 × 60	432	20 diploid	23.85 ± 1.81
			20 triploid	23.75 ± 1.89
W5	120 × 60 × 60	432	16 diploid	31.25 ± 2.8
			16 triploid	31.56 ± 2.42
W6	120 × 60 × 60	432	14 diploid	30.36 ± 2.02
			14 triploid	32.14 ± 3.04
S1	150 × 60 × 60	576	20 diploid	22.20 ± 2.11
			20 triploid	22.20 ± 2.11
S2	150 × 60 × 60	576	20 diploid	22.45 ± 2.91
			20 triploid	22.60 ± 3.67

After 12 and 18 months the ploidy level of all fish was measured by using the dorsal fin for flow cytometric measurement as described in Lamatsch et al. (2000). The DNA content of the cells was determined using chicken red blood cells as a reference (Vinogradov 1998).

Statistics

To test for significant deviations from the initial proportion of diploid and triploid individuals in the trials χ^2 -goodness-of-fit tests were performed with the data from 12 and 18 months. All P -values were calculated for a two-tailed probability of deviation from the initial status of the experiments (50% diploids, 50% triploids). Bonferroni correction was applied for multiple testing but did not change the outcome of the results as those were highly significant. To test for an overall trend in the experimental trials a Fisher exact test was performed for both data points (12 and 18 months) comparing the number of trials where diploids out-competed the triploids against the assumed outcome postulating a triploid advantage.

Results and discussion

Occasional leakage of genes from a paternal host into a sperm-dependent clone may provide a source of adaptive variation and possibly an avenue for the avoidance of 'Muller's ratchet' (Muller 1964) or 'mutational meltdown' (Lynch et al. 1993) by adding freshly recombined genetic material (Bogart et al. 2007; Schartl et al. 1995a; Wright and Lowe 1967). This mechanism might allow compensation for malfunctioning genes. Although heterosis may be involved in the success of asexual polyploids, clear documentation of their superior fitness to parental precursors is difficult to obtain since it

requires that all biotypes be measured under the same conditions (Otto and Whitton 2000; Schultz and Fielding 1989). To study possible fitness differences between triploid and diploid clones of the Amazon molly, clonal competition experiments were set up with equal numbers of diploid and triploid virgin *P. formosa* using only two *P. m. limantouri* males as sperm donors in each replicate representing the natural sex ratios.

Fish gave birth approximately from 2 months on after adding the *P. mexicana* males to the virgin females which ranges within the reproductive rate of animals bred in the laboratory. Reproductive rates varied greatly between the experimental trials: While in all W-trials fish numbers increased noticeably, the fish in the S-trials did not reproduce at the same rate (Table 2). Since this was most likely due to locally different (water) conditions the S-trials were analysed separately.

After 12 months three of the six W-experiments showed a significant bias towards diploid individuals (Table 2), two did not differ significantly from a 50% diploid 50% triploid distribution (W3, W5) and one experiment (W4) showed a slightly significant triploid dominance. After 18 months five out of six experiments showed a highly significant diploid bias (Table 2), while W4 showed a balanced proportion of diploids and triploids. A Fisher exact test of these results compared to the expected triploid dominance clearly showed a significant bias towards diploid dominance after 12 ($P = 0.033$) and 18 months ($P = 0.002$).

Therefore, the individual trials as well as an overall analysis of the clonal competition experiments revealed a clear reproductive advantage of diploids competing with triploids. This result was supported by the S-experiments (Table 2). The rather unexpected outcome of triploids being inferior to diploids may be explained by several mechanisms:

- (1) Disproportional amounts of death rates in triploids, in particular during the early phases of the experiments could have led to an early diploid bias in the experiments explaining the clear dominance of diploids at the end of the experiments. Flow cytometric measurements of deceased fishes, however, showed that the higher fitness of diploids is not based on higher mortality of triploids, since their overall mortality rates were not significantly different ($\chi^2 = 0.071$; $P = 0.79$; Supplementary Fig. 1): in diploids 28.65% (302/1,054) died, in triploids 27.51% (166/229). Even though it looks like diploids have a higher mortality in experiments 5 and 6, diploids were also much more common than triploids in the tanks at these stages of the experiment, and therefore relative death rates did not differ between ploidy levels.
- (2) A spontaneous change of ploidy. Earlier observations from the laboratory had shown that triploidisation happens in laboratory breeding strains of *P. formosa* (Nanda et al. 1995). It does, however, occur at low frequencies and the resulting females are sterile. A random combination of genotypes is obviously not sufficient to produce fertile new clones. According to recent analyses, the origin of natural triploids in *P. formosa* was restricted to only a few—successful—introgression events (Lampert et al. 2005; Schories et al. 2007). No change of ploidy was observed in the controls ($N = 141$) during the entire course of the experiment. Therefore, spontaneous ploidy elevations are negligible for our experiments. The loss of a chromosome set has never been observed under laboratory conditions and can therefore be excluded as a main cause of diploid dominance.
- (3) The most likely explanation for our experimental results is that under standardized lab condition i.e., in a physically stable, predator-free environment with food readily available and sole competition for mates triploids are inferior competitors to diploids. Under natural conditions, however, triploids make up a fluctuating but stable part of

Table 2 Numbers and percentage of diploid and triploid individuals after 12 and 18 months

	12 months				18 months				
		Diploid	Triploid	χ^2	<i>P</i>	Diploid	Triploid	χ^2	<i>P</i>
	<i>N</i> (%) Ø pg/nucleus Ø CV%								
W1	<i>N</i> (%) Ø pg/nucleus Ø CV%	100 (73%) 2.05 ± 0.12 4.58 ± 1.47	37 (27%) 2.97 ± 0.22 4.82 ± 1.44	28.97	<0.000001	125 (81.2%) 1.96 ± 0.09 3.16 ± 1.11	29 (18.8%) 3.01 ± 0.06 2.89 ± 1.04	59.84	<0.000001
W2	<i>N</i> (%) Ø pg/nucleus Ø CV%	81 (96.4%) 2.01 ± 0.07 4.26 ± 1.17	3 (3.6%) 3.08 ± 0.19 4.86 ± 1.43	43.8	<0.000001	155 (100%) 2.01 ± 0.06 2.95 ± 0.77	0 (0%)	155	<0.000001
W3	<i>N</i> (%) Ø pg/nucleus Ø CV%	44 (46%) 2.08 ± 0.07 2.65 ± 0.58	52 (54%) 3.13 ± 0.36 2.51 ± 0.61	0.67	0.414	184 (93.9%) 2.02 ± 0.05 2.45 ± 0.44	11 (5.6%) ^a 3.02 ± 0.10 2.35 ± 0.53	153.48	<0.000001
W4	<i>N</i> (%) Ø pg/nucleus Ø CV%	31 (32.3%) 2.05 ± 0.19 2.40 ± 0.47	65 (67.7%) 3.03 ± 0.09 2.13 ± 0.50	5.5	<0.02	61 (45.9%) 1.99 ± 0.05 2.55 ± 0.29	71 ^b (53.4%) 3.02 ± 0.07 2.21 ± 0.44	0.75	0.38
W5	<i>N</i> (%) Ø pg/nucleus Ø CV%	13 (50%) 2.01 ± 0.04 2.31 ± 0.45	13 (50%) 3.04 ± 0.06 2.33 ± 0.30	0	1	73 (84.9%) 1.92 ± 0.04 2.41 ± 0.45	13 (15.1%) 3.01 ± 0.08 2.64 ± 0.79	41.86	<0.000001
W6	<i>N</i> (%) Ø pg/nucleus Ø CV%	262 (82.1%) 2.02 ± 0.08 2.49 ± 0.45	57(17.9%) 3.03 ± 0.08 2.26 ± 0.51	131.74	<0.000001	154 (78.6%) 2.01 ± 0.05 2.46 ± 0.59	42 (21.4%) 3.01 ± 0.05 2.40 ± 0.67	64	<0.000001
S1	<i>N</i> (%) Ø pg/nucleus Ø CV%	35 (97.2%) 1.98 ± 0.06 2.61 ± 0.67	1 (2.8%) 3.10 2.46	18.3	<0.000001	46 (92%) 2.03 ± 0.03 2.52 ± 0.52	4 (8%) 3.00 ± 0.03 2.71 ± 0.23	19.43	<0.000001
S2	<i>N</i> (%) Ø pg/nucleus Ø CV%	^c ^c ^c	^c ^c ^c			106 (94.6%) 1.95 ± 0.05 2.33 ± 0.51	6 (5.4%) 2.97 ± 0.02 2.35 ± 0.58	53.5	<0.000001

Means are given for DNA content and coefficient of variation (ratio of the standard deviation to the mean) for each experiment. Results of the statistical analyses (χ^2) and *P*-values are given for each experimental trial in Würzburg (W1-6) and in addition for the independent trials in Seewiesen (S1, S2)

^a 1 Mosaic (0.5%); ^b 1 Tetraploid (0.7%) (Lampert et al. 2008); ^cMissing data

the population, and are found in mixed schools with diploids. Therefore, we have to assume that there are environmental conditions that stabilize this co-existence. Different environmental conditions e.g., might explain the initial dominance of triploids in W4.

Several possibilities exist to explain the occurrence of mixed ploidy levels within populations due to balancing selection: frequency dependent selection might favor triploids if the frequency of diploids becomes too high and vice versa. This might explain the fluctuating frequencies of triploids between different years (Rasch and Balsano 1974).

Another mechanism by which natural selection can preserve two or more phenotypic forms is heterozygote advantage. Polyploids might be less susceptible to parasites due to the presumed higher individual genetic variability (Rasch and Balsano 1989). Since triploids in *P. formosa*, however, show an unexpectedly low genotypic diversity (Lampert et al. 2005), they might actually be more exposed to parasitism by representing the most common genotype (Lively et al. 1990). Tobler and Schlupp (2005) could not detect differences in parasite load between asexual *P. formosa* and its sexual host *P. latipinna*, however, only diploid asexuals have been investigated. Whether the significantly higher genotypic diversity of diploid *P. formosa* versus triploid *P. formosa* is reflected in parasite load has to be investigated. Fish mycobacteriosis is a chronic bacterial disease that has the potential for infecting most fish species from both freshwater and saltwater habitats. Its pathogen, *Mycobacterium marinum* is known as a constitutive laboratory (Ranzani-Paiva et al. 2004) and natural (Poort et al. 2006; Lansdell et al. 1993) parasite, and seems a good target to address the above raised question.

A third explanation could be environmental heterogeneity. Triploids may be better suited to withstand stressful conditions due to physiological differences, e.g., in metabolic rates, resulting from the cell enlargements (Kozłowski et al. 2003; Oliva-Teles and Kaushik 1987). During late spring months in North-Eastern Mexico the rivers slowly dry up and eventually small pools detached from the stream will form showing high population densities, high temperatures and low oxygen levels. High frequencies of triploids reported from these rest water pools (Lamatsch 2001; Balsano et al. 1981) and higher numbers of triploids in summer months (Balsano and Rasch 1974) may indicate a higher tolerance towards stressful environmental conditions. Differences in the metabolic rate between diploid and triploid *P. formosa* were not tested in this experimental set-up but need to be investigated to evaluate whether this hypothesis is a reasonable explanation.

Another possibility for co-existence would also be niche partitioning as found in *Poeciliopsis* (Vrijenhoek 1978). Niche partitioning in *P. formosa*, as well as in their sexual hosts (*P. mexicana*, *P. latipinna*) has been suggested by Balsano et al. (1981) who found sexual females to be more abundant in headwater localities whereas unisexuals increased downstream. Their data support the hypothesis of microhabitat segregation among the three types of females (*P. mexicana*, diploid and triploid *P. formosa*) although both unisexual and sexual females were usually found in a given habitat. This hypothesis is currently being tested by us (Lamatsch and Schlupp et al. in preparation). Weiss et al. (1999) proposed that a combination of advantages and disadvantages of both biotypes account for a stable coexistence of different ploidy levels. Despite a large number of possible hypotheses explaining the pattern found here, the question whether intraspecific polyploidy is a form of genetic variation that may expand environmental tolerance requires more theoretical and experimental analyses.

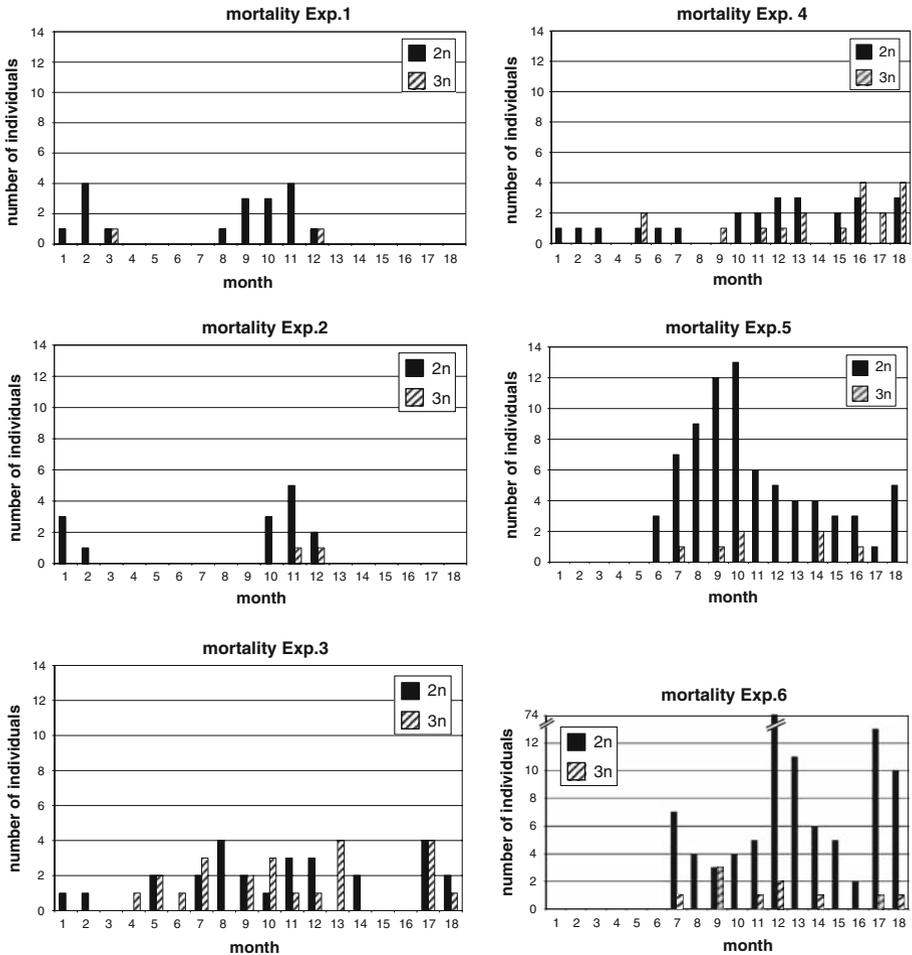


Fig. 1 Death of diploid (black columns) and triploid (hatched columns) fishes during 18 months of each Würzburg experiment

Acknowledgments We thank G. Schneider, H. Schwind, and P. Weber for breeding the fish, and A. Chadt, J. Delfgaauw, M. Hidding, C. Ryser, and T. Schäfer for technical support. Financial support for this study was granted by the DFG (SFB 567 “Mechanismen der interspezifischen Interaktion von Organismen”), and Fonds der Chemischen Industrie. I.S. was supported by a Heisenberg Fellowship. We are grateful to the Max-Planck-Society for financial support to M. Geiger. We owe special thanks to W. Wickler for his great support of this project.

References

Avise JC, Trexler JC, Travis J, Nelson WS (1991) *Poecilia mexicana* is the recent female parent of the unisexual fish *P. formosa*. *Evolution* 45:1530–1533
 Avise JC, Quattro JM, Vrijenhoek RC (1992) Molecular clones within organismal clones. *Evol Biol* (26), 225–245. Plenum Press, New York

- Balsano JS, Rasch EM (1974) Biochemical and cytogenetic studies of *Poecilia* from eastern Mexico. I. Comparative microelectrophoresis of plasma proteins of seven species. *Rev Biol Trop* 21:229–257
- Balsano JS, Kucharski K, Randle EJ, Rasch EM, Monaco PJ (1981) Reduction of competition between bisexual and unisexual females of *Poecilia* in north-eastern Mexico. *Env Biol Fish* 6:39–48
- Balsano JS, Rasch EM, Monaco PJ (1983) Reproductive interactions within bisexual/unisexual complexes of *Poecilia* from the Rio Purificación in north-eastern Mexico. *Nat Geogr Soc Res Repts* 1976 Projekts:113–135
- Balsano JS, Randle EJ, Rasch EM, Monaco PJ (1985) Reproductive behavior and the maintenance of all-female *Poecilia*. *Env Biol Fish* 12:251–263
- Bell G (1982) The masterpiece of nature: the evolution of sex and the genetics of sexuality. University of California Press, Berkeley
- Benazzi Lentati G (1979) Polyploidy and types of development in the triclad *Dugesia lugubris* S.L.: interaction between the ploidy level and the origin of amphimixis or pseudogamy. *Caryologia* 32:247–263
- Benazzi M, Benazzi Lentati G (1999) Gynogenesis and polyploidy in the animal kingdom. *Riv Biol* 92: 452–454
- Beukeboom LW (2007) Sex to some degree. *Heredity* 98:123–124
- Beukeboom LW, Vrijenhoek RC (1998) Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. *J Evol Biol* 11:755–782
- Bogart JP, Bi K, Fu J, Noble DWA, Niemeitz A (2007) Unisexual salamanders (Genus *Ambystoma*) present a new reproductive mode for eukaryotes. *Genome* 50:119–136
- Christensen B (1960) A comparative cytological investigation of the reproductive cycle of an amphimictic diploid and a parthenogenetic triploid form of *Lumbricillus lineatus* (O.F.M.) (Oligochaeta, Enchytraeidae). *Chromosoma* 11:365–379
- Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet* 6:836–846
- Döbler M (1998) Zum Fortpflanzungsmodus des Amazonenkärpfings [*Poecilia formosa* (Girard 1859)]. Thesis/Dissertation, Zoologisches Institut und Zoologisches Museum der Universität Hamburg
- D'Souza TG, Schulte RD, Schulenburg H, Michiels NK (2006) Paternal inheritance in parthenogenetic forms of the planarian *Schmidtea polychroa*. *Heredity* 97:97–101
- Horner HA, Macgregor HCC (1983) Value and cell volume: their significance in the evolution and development of amphibians. *J Cell Sci* 63:135–146
- Judson OP, Normark BN (1996) Ancient asexual scandals. *Trends Ecol Evol* 11:41–46
- Kallman KD (1975) The platyfish, *Xiphophorus maculatus*. In: King RC (ed) *Handbook of genetics*. Plenum Publishing Corp, New York, pp 81–132
- Kondrashov AS (1984) A possible explanation of cyclical parthenogenesis. *Heredity* 52:307–308
- Kondrashov AS (1988) Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336:435–440
- Kozłowski J, Konarzewski M, Gawelczyk AT (2003) Cell size as a link between noncoding DNA and metabolic rate scaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14080–14085
- Lamatsch DK (2001) Molecular and cytogenetic investigations on paternal leakage in the sperm-dependent parthenogen, *Poecilia formosa*. Thesis/Dissertation, University of Würzburg
- Lamatsch DK, Geiger M, Schlupp I (in preparation) Investigations on the habitat choice of diploid and triploid *P. formosa*, and their hosts *P. mexicana* and *P. latipinna*
- Lamatsch DK, Steinlein C, Schmid M, Scharl M (2000) Noninvasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry* 39:91–95
- Lampert KP, Scharl M (2008) The origin and evolution of a unisexual hybrid: *Poecilia formosa*. *Philos Trans R Soc Lond B*, in press. doi:10.1098/rstb.2008.0040
- Lampert KP, Lamatsch DK, Epplen JT, Scharl M (2005) Evidence for a monophyletic origin of triploid clones of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Evolution* 59:881–889
- Lampert KP, Lamatsch DK, Fischer P, Scharl M (2008) A tetraploid Amazon molly, *Poecilia formosa*. *J Hered* 99:223–226
- Lansdell W, Dixon B, Smith N, Benjamin L (1993) Isolation of several *Mycobacterium* species from fish. *J Aquat Anim Health* 5:73–76
- Lively CM, Craddock C, Vrijenhoek RC (1990) The Red Queen hypothesis supported by parasitism in sexual and clonal fish. *Nature* 344:864–866
- Loewe L, Lamatsch DK (2008) Muller's ratchet may threaten the Amazon molly and other ancient asexuals. *BMC Evol Biol* 8:88–108
- Lynch M, Gabriel W (1990) Mutation load and the survival of small populations. *Evolution* 44:1725–1737
- Lynch M, Burger R, Butcher D, Gabriel W (1993) The mutational meltdown in asexual populations. *J Hered* 84:339–344
- Mable BK (2004) Why polyploidy is rarer in animals than in plants: myths and mechanisms. *Biol J Linn Soc* 82:453–466

- Martens K (1998) Sex and ostracods: a new synthesis. In: Martens K (ed) Sex and parthenogenesis: evolutionary ecology of reproductive modes in non-marine Ostracods. Backhuys Publishers, Leiden, pp 295–322
- Mogie M (2007) On the relationship between asexual reproduction and polyploidy. *J Theor Biol* 122: 493–498
- Monaco PJ, Rasch EM, Balsano JS (1984) Apomictic reproduction in the Amazon molly, *Poecilia formosa*, and its triploid hybrids. In: Turner BJ (ed) Evolutionary genetics of fishes. Plenum Press, New York, NY, USA, pp 311–328
- Muller HJ (1932) Some genetic aspects of sex. *Am Nat* 66:118–138
- Muller HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res* 1:2–9
- Nanda I, Scharlt M, Feichtinger W, Schlupp I, Parzefall J, Schmid M (1995) Chromosomal evidence for laboratory synthesis of a triploid hybrid between the gynogenetic teleost *Poecilia formosa* and its host species. *J Fish Biol* 47:619–623
- Oliva-Teles A, Kaushik SJ (1987) Metabolic utilization of diets by polyploid rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol A* 88:45–47
- Otto SP (2007) The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131:452–462
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 34:401–437
- Pandian TJ, Koteswaran R (1998) Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384:167–243
- Poort MJ, Whippo CM, Watral VG, Font WF, Kent ML (2006) Molecular characterization of a Mycobacterium species in non-native poeciliids in Hawaii using DNA sequences. *J Fish Dis* 29:181–185
- Pouchkina-Stantcheva NN, McGee BM, Boschetti C, Tolleter D, Chakrabortee S, Popova AV, Meersman F, Macherel D, Hinch DK, Tunnacliffe A (2007) Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate. *Science* 318:268–271
- Ranzani-Paiva MJT, Ishikawa CM, Eiras ACd, Silveira VRd (2004) Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Braz Arch Biol Technol* 47:945–953
- Rasch EM, Balsano JS (1974) Biochemical and cytogenetic studies of *Poecilia* from eastern Mexico. II. Frequency, perpetuation, and probable origin of triploid genomes in females associated with *Poecilia formosa*. *Rev Biol Trop* 21:351–381
- Rasch EM, Balsano JS (1989) Trihybrids related to the unisexual molly fish, *Poecilia formosa*. In: Dawley RM, Bogart JP (eds) Evolution and ecology of unisexual vertebrates. New York State Museum, Albany, New York, pp 252–267
- Scharlt M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Eppelen JT, Schmid M, Parzefall J (1995a) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* 373:68–71
- Scharlt M, Wilde B, Schlupp I, Parzefall J (1995b) Evolutionary origin of a parthenoform, the Amazon molly *Poecilia formosa*, on the basis of a molecular genealogy. *Evolution* 49:827–835
- Schön I, Gandolfi A, di Masso E, Rossi V, Griffith HI, Martens K, Butlin RK (2000) Persistence of asexuality through mixed reproduction in *Eucypris virens* (Crustacea, Ostracoda). *Heredity* 84:161–169
- Schories S, Lampert KP, Lamatsch DK, Garcia de Leon FJ, Scharlt M (2007) Analysis of a possible independent origin of triploid *P. formosa* outside of the Río Purificación river system. *Front Zool* 4:13
- Schultz RJ (1969) Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *Am Nat* 103:605–619
- Schultz RJ, Fielding E (1989) Fixed genotypes in variable environments. In: Dawley RM, Bogart JP (eds) Evolution and ecology of unisexual vertebrates. New York State Museum, Albany, New York, pp 32–38
- Suomalainen E, Saura A, Lokki J (1987) Cytology and evolution in parthenogenesis. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Taylor JS, Raes J (2004) Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu Rev Genet* 38:615–643
- Tobler M, Schlupp I (2005) Parasites in sexual and asexual molly species of the genus *Poecilia* (Poeciliidae, Teleostei): a case for the Red Queen? *Biol Lett* 1:166–168
- Vinogradov AE (1998) Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship. *Cytometry* 31:100–109
- Vrijenhoek RC (1978) Coexistence of clones in a heterogeneous environment. *Science* 199:549–552
- Weiss MM, Hermesen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999) Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 52:243–251
- West SA, Lively CM, Read AF (1999) A pluralistic approach to sex and recombination. *J Evol Biol* 12:1003–1012
- Wright JW, Lowe CH (1967) Evolution of the allopolyploid parthenospecies *Cnemidophorus tessellatus* (Say). *Mammal Chromosome Newslett* 8:95–96

DOI: 10.1002/iroh.200610984

MARIA LEICHTFRIED

Institute of Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestr. 9, A–5310 Mondsee, Austria;
e-mail: maria.leichtfried@oeaw.ac.at

The Energy Basis of the Consumer Community in Streams Yesterday, Today and Tomorrow...

key words: stream ecosystems, organic matter, biofilms, benthos, Ritrodat

Abstract

Organic matter is the basic source of energy for consumers in ecosystems. In lotic ecosystems, most of the organic matter is allochthonous, imported as bank runoff or as aerial drift. Bank runoff is already processed soil material, particulate or dissolved. Unprocessed plant litter represents the aerial drift. The energy content of unprocessed organic matter is not readily available to consumers; it has to be processed by the microbial community. Microorganisms are most active in biofilms, comprised of fungi, bacteria, protozoa etc., and their organic excretions attached to surfaces. The colonizable surface area in sediments is negatively correlated with the grain size. Therefore, the largest amounts of organic matter are likely to occur in small grain size classes, which shows that biofilms are an important component of the organic matter pool. Most of the meiobenthic species, which play also a very important role in these processes, are closely connected to biofilms. These and their associated communities are doubtless an important food source for benthic consumers. The main energy pathway passes from organic matter (either particulate or dissolved) to the microbial community in biofilms, which transforms the organic matter and makes it available and palatable to benthic consumers. Wherever the benthic community is living, either in bed sediments or on macrophytic surfaces, the energy stored in biofilms or their associated communities is mostly used.

1. Introduction

The original aim of limnological research was to make processes predictable within water bodies. Empirical description of individual water systems should have brought limnology closer to this goal. A result of this first phase of limnological research was the realization that waterbodies are very complicated and interactive systems. Investigating the cycle of matter by tracking the relation between links, like chemical and physical variables, animals and plants, led to unforeseen difficulties. The focus on energy (*i.e.* viewing the energy flow through the system as interlinking parameter) facilitated this problem. The energy flow can be measured only indirectly but leads, however, to substantially clearer and simpler interpretations (BERRIE, 1976; BRETSCHKO, 1978).

This keynote address for the session “The Energy Basis of the Consumer Community” (RIVER BOTTOM VI Meeting in Brno 2005) is dedicated to GERNOT BRETSCHKO, the marvellous Austrian limnologist, thinker and best friend. In the seventies, he brought the limnology of lotic ecosystems to the Biological Station Lunz (one of the cradles of limnology, founded in 1906). With his RITRODAT-LUNZ CONCEPT, he gave the Biological Station Lunz a new sense of existence. GERNOT BRETSCHKO passed by far too early in 2002, in the last phase of the 25 years research on stream ecology in the framework of RITRODAT-LUNZ. Therefore, it was not possible for him to complete the work of 25 years’ research on streams through a published compilation about RITRODAT-LUNZ.



Figure 1. The logo of the RITRODAT-LUNZ.

The RITRODAT-LUNZ CONCEPT (BRETSCHKO, 1978 and 1979) (Fig. 1) is a 25 year program in stream ecology with the main objectives of illuminating and understanding the structural and functional relationships in a low order (STRAHLER, 1957), forested mountain stream. One of the important fields of interest in the framework of RITRODAT-LUNZ CONCEPT was to follow up the energy flow in the ecosystem stream, to acknowledge the energy basis in the system and to understand the consumer community.

2. Study Site and Methods

The RITRODAT-LUNZ study site was a 100 m long stretch of Oberer Seebach (Fig. 2) near Lunz am See, Lower Austria, 100 km (crow line) SW of Vienna. Oberer Seebach is a second order gravel stream [mean width: 15.8 (14.5–17.1) m, mean slope 4.1 (4.06–4.14)%o, 605 m a.s.l., 47°15' N, 15°04' E], about 500 m upstream of its inflow into Lunzer Untersee and around 300 m from the Biological Station Lunz.

The karstic catchment, of about 20 km², is uninhabited and used only for hunting and slight forestry. In accordance with the karstic catchment, discharge is extremely flashy (Table 1). The temperature regime is that of a typical summer cold stream. Averages of surface sediment water temperatures are very close together, down to a sediment depth of 60 cm (BRETSCHKO, 1991).

In the framework of the RITRODAT-LUNZ CONCEPT, during the last 25 years many methods and methodologies were tested, modified and developed (WAGNER and LEICHTFRIED, 2003). It is not possible and also not reasonable to present all these methods here. For further information, the reader should go to the original cited literature.

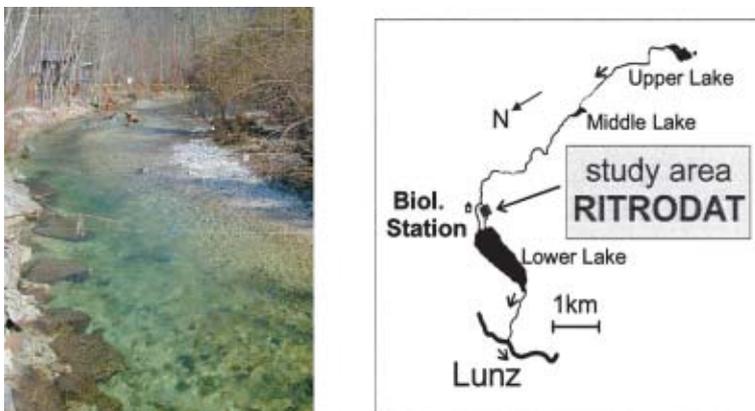


Figure 2. RITRODAT-LUNZ study area on the 2nd order mountain stream Oberer Seebach near Biological Station Lunz, Lower Austria.

Table 1. Oberer Seebach, RITRODAT STUDY AREA, abiotic data, annual means, (95% confidence limits), (BRETSCHKO, 1991 and 1998).

Discharge	(m ³ /s)
MQ	0.82 (0.62–1.02)
M MAXQ	15.13 (3.01–27.25)
M MINQ	0.28 (0.12–0.44)
Temperature (°C)	
Annual mean	6.8
Mean Max	11.1
Mean Min	1.9
Water chemistry	
pH	8.1 (7.9–8.2)
Cond.(µS/cm)	216 (210–222)
Alkal. (meq/l)	2.18 (2.11–2.25)
Ca ⁺⁺ (meq/l)	2.04 (1.98–2.10)
Mg ⁺⁺ (meq/l)	0.52 (0.48–0.56)
total P (mg/l)	0.009 (0–0.021)
total N (mg/l)	1.011 (0.773–1.249)

3. Results and Discussion

3.1. The Abiotic System

Each stream ecosystem can be schematically subdivided into functional groups such as catchment, airspace above the stream, water body, sediment surface, bed sediments and groundwater. The organization is based both on methodologically caused criteria and on the expected behaviour of the system-forming biocoenosis (BRETSCHKO, 1979; WAGNER and LEICHTFRIED, 2003).

The catchment space consists of the hydrographically defined catchment area as well as the entire area from which substances are imported into the system by air currents. Nevertheless, the system also exports materials into the catchment area. Import and export are measurable. On one hand, the transport vehicle is flowing water, whereby the following components have to be differentiated: import and export by drift in the water body, in the bed sediments and horizontal/vertical exchange mechanisms. On the other hand, air currents import materials into the system and also export materials. The exchange takes place at the surface of the water body (BRETSCHKO, 1979).

Airspace directly above the stream is excluded from the catchment space since micro-climatic phenomena crucially affect exchange processes here. The quantitative and qualitative importance of heterotopic insects is clear. They, as the aeolic drift, are affected directly by the micro-climate of the air space above the stream reach (hatching, migrations, oviposition).

Hydrographic, physical and chemical parameters were measured routinely, with special consideration of vertical and horizontal exchange processes. Additional measurements of the total water body movements in the streambed are of importance for the biocoenosis. Substantially, the energy flow is influenced by the system of the drift, where it is possible to differentiate between the organismic drift and the drift of particulate organic matter (POM).

Sediment surface in the stream is where autochthonic production takes place and also the residential area of the stream animals. Here, the microclimate and exchange processes between surface water and bed sediment are most important.

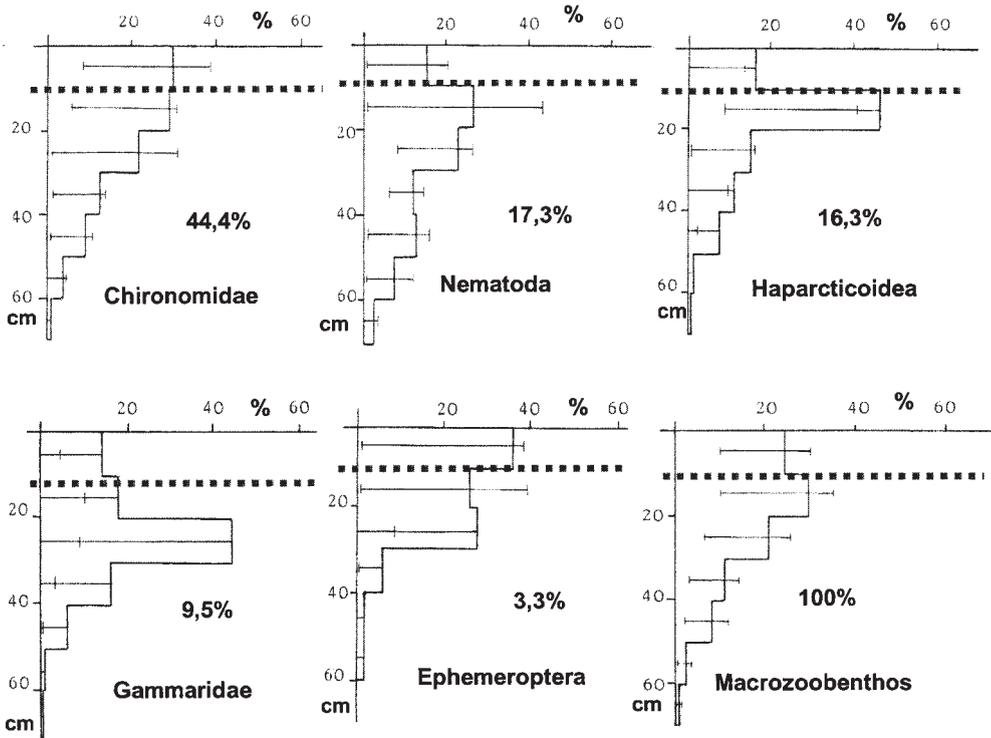


Figure 3. Relative vertical distribution of zoobenthic fauna and its main taxonomic groups in bed sediments of the RITRODAT-LUNZ study area, $n = 12$; 100% = 125490 ind/m³ on average (KLEMENS, 1985; KOWARC, 1991). Dotted lines = light discontinuity

Bed sediments: Investigations on Bear Brook in Canada by HYNES and his team in the early seventies showed a vertical distribution of the macrozoobenthic fauna in bed sediments down to depths of 50 cm for the first time (HYNES, 1974). One of the first hot questions in RITRODAT-LUNZ (Oberer Seebach) was, what is the pattern of vertical distribution of the invertebrate fauna in bed sediments. Their vertical distribution was confirmed down to 70 cm, with maximum numbers between the surface and 20 cm sediment depth, partly under the light discontinuity (Fig. 3, e.g. BRETSCHKO, 1981 and 1985; BRETSCHKO and KLEMENS 1986; KLEMENS, 1991; KOWARC, 1991). As a consequence of many invertebrate taxa appearing deeper in the sediment than the light discontinuity boundary, it can be assumed, that there is enough space, water flow, oxygen and food in this hyporheic habitat.

Thus, this habitat became particularly important in analyzing for the system analysis. An extensive development of methodologies was necessary, to get depth-defined, complete sediment samples of gravel bed sediments including the fauna (freeze core technique, permanently installed stand pipes, etc., BRETSCHKO and KLEMENS, 1986; LEICHTFRIED, 1986; WAGNER and LEICHTFRIED, 2003).

Grain size classes larger than 10 mm dominate the bed sediments in the RITRODAT study area, with the grain size class smaller 1 mm always comprising less than 10% of the total (Fig. 4). This fine sediment class is especially important in the system, contributing up to 88% of total nitrogen and up to 79% of total organic carbon to the organic matter content in bed sediments (LEICHTFRIED, 1988, 1995). This combination of coarse grains with a small, but nutritious amount of fine grain sizes forms a habitat with good living conditions. It offers enough space, through flow, oxygen and food for the consumer community.

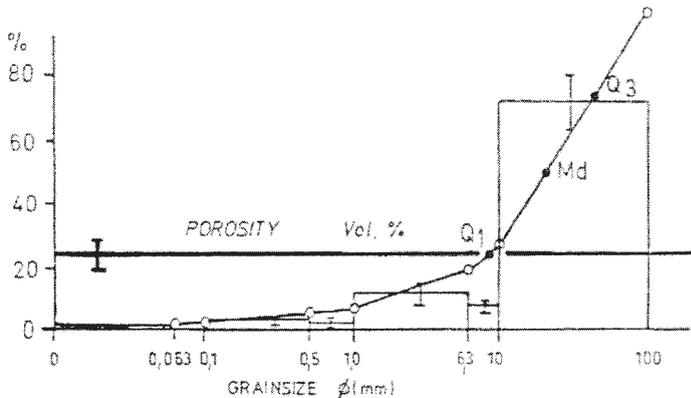


Figure 4. Grain size analysis of bed sediments in Oberer Seebach, RITRODAT-AREA, annual means, $n = 216$ (e.g. LEICHTFRIED, 1988, 1995).

Therefore, the porosity is relatively high with values between 20 and 30 vol% (Fig. 4), and the interstices are connected. Life and movement of invertebrate animals is possible down to around 70 cm sediment depth here (BRETSCHKO and LEICHTFRIED, 1988; LEICHTFRIED, 1988, 1995; WAGNER and BRETSCHKO, 2002).

Like the catchment space, the groundwater space can also be considered to be infinitely large. The exchange processes between bed sediments and groundwater area were also considered. The different zoobenthic fauna in the stream and in the groundwater make it possible to differentiate between these layers and the zone of transition (e.g. MARMONIER and DANIELOPOL, 1988).

3.2. The Biotic System

Into the framework outlined above, the biocoenosis is integrated. It is both affected by the framework and also influences the framework itself. The biocoenosis is a result and a carrier of the energy flow, that is the basis of the system analysis. (Fig. 5, BERRIE, 1976; LEICHTFRIED, 1995).

Energy basis: The system receives its energy from two sources: from solar radiation energy fixed in a biologically utilizable form in the system (autochthonic production) and from allochthonic organic matter (LEICHTFRIED, 1988, 1995, 2000; MOSER, 1991, 1994; UVIRA *et al.*, 2000) originating in the catchment space (with sizes from organic molecules or colloids to large tree remains), called POM or DOM (e.g. BATTIN *et al.*, 2003; BRETSCHKO, 1990; FISHER and LIKENS, 1973; WAGNER and BRETSCHKO, 2002).

Autochthonic production is limited to the upper sediment layer; light discontinuity in Oberer Seebach is at around sediment depths 9 to 13 cm. In a low order, mountain stream, algae attached to stone surfaces and a few mosses are almost exclusively responsible for the primary production. The three groups of algae, Chlorophyta, Cyanophyta and the Fuco-group, dominate the primary community and occur down to light discontinuity in bed sediments, with different temporal distributions. Fuco-group algae dominate the algal community in spring and autumn and the Chlorophyta and Cyanophyta in the summer (MÜLLNER, 1998, 1999).

Allochthonic organic matter: The distribution and quantity of the allochthonic energy source, the organic matter (particulate and dissolved), are functions of the condition of the catchment space and meteorological and hydrographic conditions. Knowledge of the nature,

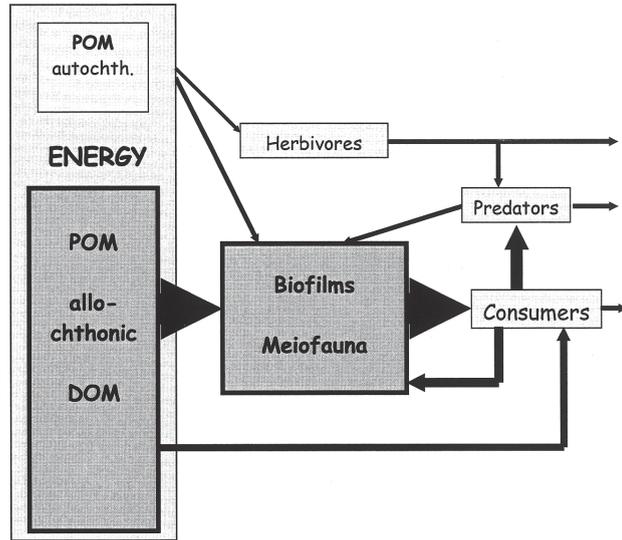


Figure 5. Energy flow in a low order stream ecosystem (modif. after BERRIE, 1976).

quantity, quality and distribution of the particulate organic matter (POM) in the system, in connection to the remaining system parameters, is a first step towards discovering the energy basis of the system (BRETSCHKO, 1978; LEICHTFRIED, 1985, 1988, 1991, 1995).

CUMMINS and his team classified particulate organic matter (POM) solely according to the particle size, irrespective of quality and source (CUMMINS, 1974; BOLING *et al.*, 1975). The often used groups of organic matter are: CPOM – coarse particulate organic matter (>1 mm), FPOM – fine particulate organic matter (<1 mm) and DOM – dissolved organic matter (<0.45 μm). Many other acronyms for sub-groups are no longer used.

Several different input systems of allochthonic organic matter, which deliver organic matter of different quality to the system, are distinguished:

- Imported by aerial drift (plant litter, twigs, pollen and others that are generally unusable by consumers without prior processing)
- Imported by bank runoff (mainly fine, pre-processed organic matter)
- Imported by subsurface system (dissolved or fine particulate organic matter, immediately available for the consumer community in bed sediments, not well known).

In the temperate zone, the input of organic matter by aerial drift is discontinuous with a maximum in autumn (Fig. 6). The driving variables for aerial drift are bank vegetation and season. Bank runoff, also an input system of organic matter is lower and follows a different temporal pattern (Fig. 6). Driving variables here are the riparian vegetation of the banks, the bank inclination and also the season (snow thaw, defoliation), independent of the quantity of the runoff (MOSER, 1991, 1994). In tropical streams, different organic matter input patterns are considered (MAGANA and BRETSCHKO, 2003).

The ratio between the input *via* aerial drift and bank runoff (36 kg TOC/year/RITRODAT AREA) and the mean annual standing crop in bed sediments (area of 1600 m² to 60 cm sediment depth) of RITRODAT-LUNZ study area (3343 \pm 325.3 kg TOC/year/RITRODAT AREA) is 1 to 100 (LEICHTFRIED, 1991). The standing crop of organic matter is surprisingly high in bed sediments. On one hand this can be explained by the high contribution of biofilms in the system but on the other hand, there is also a still undefined subsurface input of organic matter (POM and DOM). Research on this topic started in the last years of the

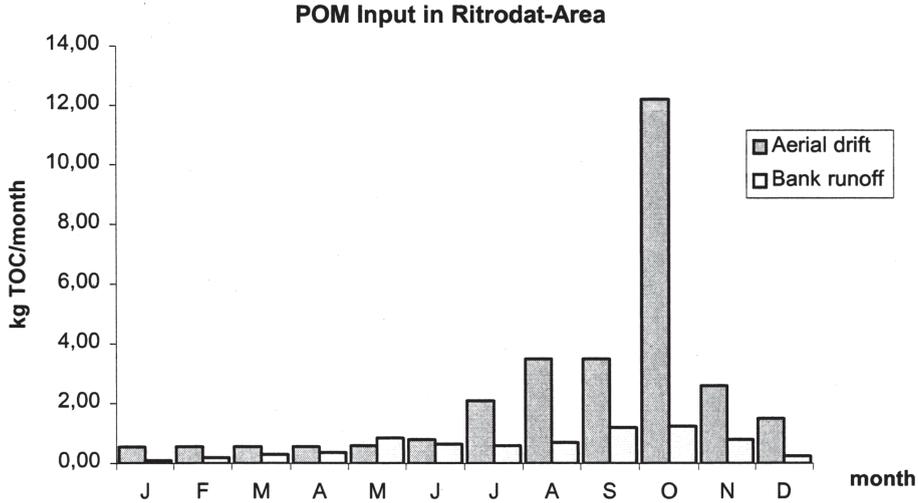


Figure 6. Temporal distribution of POM input in the RITRODAT Study Area (1600 m²), Oberer Seebach, Seeaerial drift = 29 kg TOC per year, bank runoff = 7 kg TOC per year (MOSER, 1991).

RITRODAT-LUNZ CONCEPT and should and will be continued (BATTIN, 2000; BATTIN *et al.*, 2003; WAGNER and BRETSCHKO, 2002, 2003).

A large part of the allochthonic, particulate organic matter (*e.g.* leaves) is not available/usable for consumers when it enters the stream. This part (plant tissue) has to be processed/decomposed by the microbial community to become usable and palatable for animal consumers (*e.g.* FLEITUCH and LEICHTFRIED, 2004; LEICHTFRIED, 1988; LEICHTFRIED and BRETSCHKO, 2001; LOCK and HYNES, 1976). The temporal distribution pattern of organic

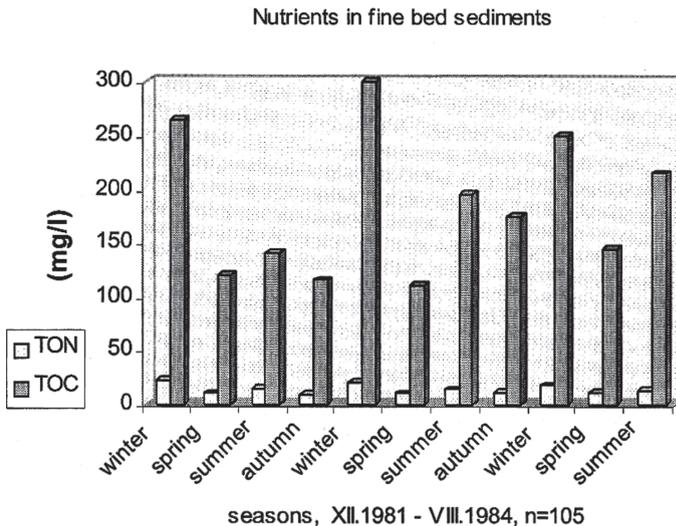


Figure 7. Temporal distribution of total organic carbon content (TOC) and nitrogen (TON) in interstitial fine bed sediments (<1 mm, sediment depth 0–60 cm, means of seasons; $n = 105$; winter: XII, I, II; spring: III, IV, V; summer: VI, VII, VIII; autumn: IX, X, XI; (LEICHTFRIED, 1988, 1995).

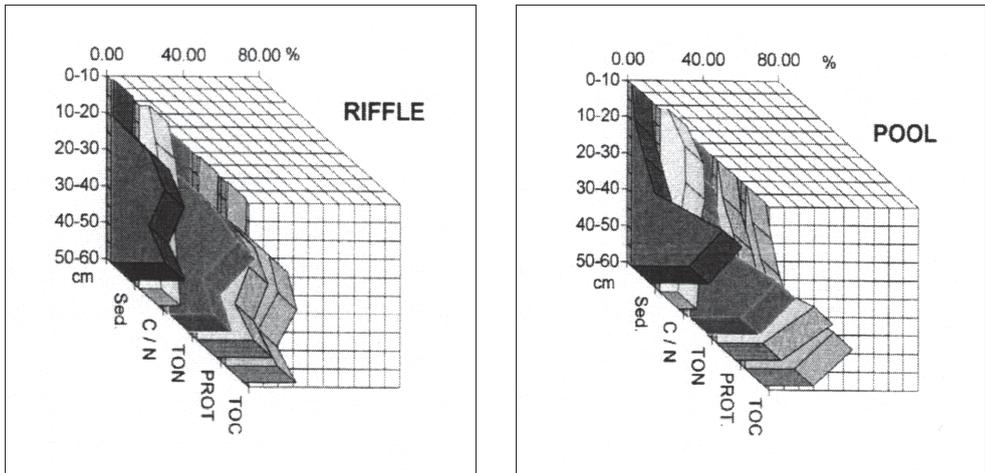


Figure 8. Relative vertical distributions in bed sediments of a riffle and a pool in the RITRODAT-LUNZ study area, Oberer Seebach: nutrients as total organic carbon (TOC), nitrogen (TON) and proteins (PROT.); TOC/TON ratio as food quality indicator (C/N) and grain size class <1 mm in diameter (Sed.), (LEICHTFRIED, 1998), biannual means, $n = 72$.

matter in bed sediments differs greatly from the import regime of allochthonic, particulate organic matter in the temperate zone (see Fig. 6 and 7, LEICHTFRIED, 1991, 1995).

In the temperate climatic zone, around 80% of the annual particulate organic imports enter the stream during the defoliation period in autumn (MOSER, 1991). CPOM accumulations on the channel surface are highest at the same time (Fig. 6, BRETSCHKO, 1990). The organic matter content of bed sediments is highest during summer and winter (Fig. 7). The summer maximum can be explained by the flashy discharge regime importing organic matter, processed in the riverbanks. The material is mainly DOM and/or FPOM, which is rapidly flushed into the bed sediments. The winter maximum is most probably connected with the autumnal imports. These imports consist mainly of leaves and twigs (CPOM), which have to be processed, decomposed and worked into the bed sediments. The time lag can be explained by the processing time and the less flashy discharge regime in autumn and winter (LEICHTFRIED, 1988, 1995).

Studies of the vertical distribution of nutrients in bed sediments show maximal values in the sediment depth under the light discontinuity in both, riffle (around 30 cm sed. depth) and pool (around 40 cm sed. depth) areas (Fig. 8, LEICHTFRIED, 1998).

If we consider not only the particle size, but also the quality of organic matter particles, we can assess that the particulate organic matter appears in three main pools in bed sediments as; a) pure organic particles, plant tissues, b) living organisms and c) biofilms. How much does each of these pools contribute to the whole amount? And why is there more organic matter at such sediment depths? Between 18 and 35% of the total POM in bed sediments can be assigned as pure organic particles and plant tissues (LEICHTFRIED, 1991). The relation between TOC-content and the organic carbon fraction appearing as macrozoobenthic fauna is in the range of $10^5:1$. The organic carbon content of the benthic invertebrate fauna is estimated on the basis of direct counts and body size. Therefore, the contribution of this organic carbon fraction the TOC distribution does not seem to be high.

Biofilms: Most of the microbial community is concentrated in the so-called biofilms. The biofilm is defined by MARSHALL (1984) as biomass of microorganisms (fungi, bacteria, protozoa, algae etc.) and their organic excretions (exocellular polymers) attached to surfaces

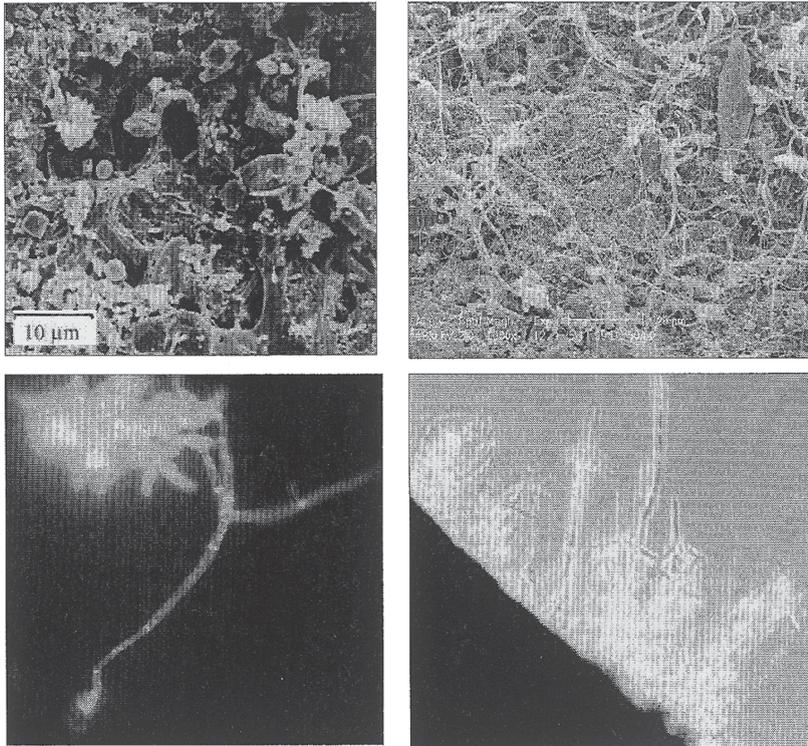


Figure 9. Selection of biofilm photographs: top left and right – early biofilm photographs in RITRODAT-LUNZ, taken by K. STEINER and T. KLEPAL in late eighties; bottom left – biofilm with aquatic hyphomycetes, photo by M. LEICHTFRIED in 2005; bottom right – aquatic hyphomycetes sporulating on leaf surface, photo by KENDRICK in 1995.

(Fig. 9). In the bed sediments, the colonizable surfaces of sediment grains and also of organic particles are colonized by biofilms.

The surface area and grain size are correlated as a negative-exponential relation (Fig. 10). Smaller grains offer substantially more colonizable surface area than larger grains. In contrast, in order to offer a 5 m² area for colonization in Oberer Seebach sediments, 2715 g of grains larger than 10 mm in diameter, 366 g of grains between 1 and 10 mm, and only 34 g of grains smaller than 1 mm are needed. The relationship described explains why the fine grain size classes in bed sediments can contribute such a large part of organic matter, if this is dominated by biofilms.

Biofilm development is therefore limited by the availability of surface, which is negatively correlated with grain diameters. The size of the colonizable surface area in sediments can be approximated as a mean between the directly measured (monomolecular liquid nitrogen layer, overestimated) and the calculated (assumption, the grains are spheres in defined positions and packing, underestimated) grain surface area (Fig. 10, LEICHTFRIED, 1985, 1995).

Up to 92% of the bacterial community is living as biofilms attached to surfaces of particles. KASIMIR (1991) was able to show this in the RITRODAT-LUNZ study area in his very first ecological investigations of microbial populations in Lunz (Fig. 11).

Biofilms play an important role in decomposition processes of plant organic matter; they make it available and palatable for consumers (*e.g.* BÄRLOCHER and MURDOCH, 1989; IVERSEN, 1973). The exocellular polymers are able to bind the dissolved nutrient molecules

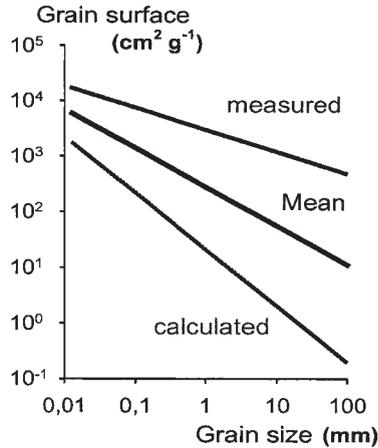


Figure 10. Surface area (cm^2/g dry weight) for different size classes, negative potential correlation: Measured by areameter; $n = 13$, $R^2 = 0.892$, $y = 4.846 x^{-0.301}$; (monomolecular liquid nitrogen layering, Technical University Vienna) and *calculated* on the assumption that the grains are spheres in defined positions and packing; $n = 23$, $R^2 = 1.000$, $y = 22.473 x^{-1.00015}$, (LEICHTFRIED, 1985).

through adhesion processes, make this DOM particulate again and offer it as food of good quality for micro-, meio- and macrozoobenthic organisms. We can see them as the “butter on dry bread” or as a “turntable” between POM and consumers.

Zoobenthic communities: In many streams, the zoobenthic community dwells preferentially in the bed sediments (Fig. 3, BRETSCHKO and KLEMENS, 1986; HYNES, 1974, HYNES *et al.*, 1976), exploiting the organic content of the sediments, composed mainly of biofilms and their associated communities (*e.g.* meiofauna).

Meiofauna (body size in freshwater ecosystems $< 100 \mu\text{m}$, permanent or temporary) is the unexpectedly rich invertebrate community in streams (SCHMID-ARAYA, 1994a, 1994b). Meiofaunal groups have usually been ignored in lotic research, which has changed slowly recent-

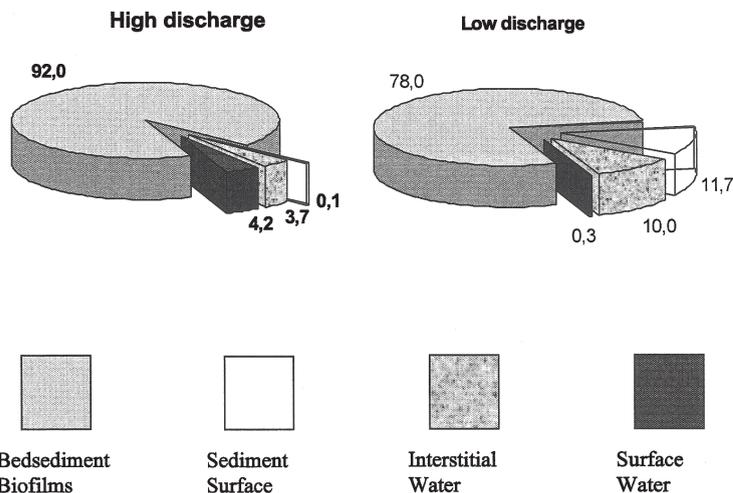


Figure 11. Relative distribution of bacteria in Oberer Seebach, RITRODAT-LUNZ study area (KASIMIR, 1991).

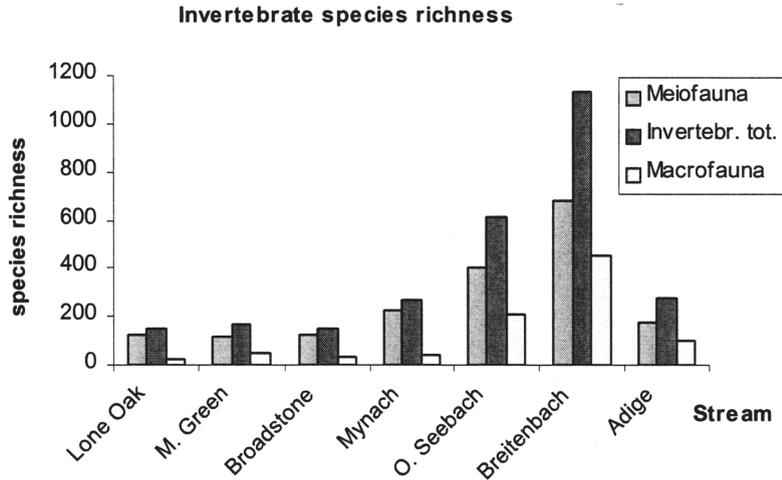


Figure 12. Species richness of invertebrate fauna in different European streams (after ROBERTSON *et al.*, 2000).

ly. The variation in form and the biological complexity of the meiofauna makes it difficult to work with these groups but their ecological role is becoming clearer. They have high densities (KOWARC, 1990; PALMER, 1991; SCHMID-ARAYA, 1997) and have a greater number of species (Fig. 12, ROBERTSON *et al.*, 2000).

Results of all the streams investigated and compared show more meiobenthic than macrobenthic species in the invertebrate community (Fig. 12). These animals prefer to live in bed sediments below the light discontinuity, as demonstrated impressively by SCHMID-ARAYA in RITRODAT-LUNZ study area (Fig. 13, SCHMID-ARAYA, 1994b). She also demonstrated that meiofauna increases the number of intermediate species (species that have predator and prey) in stream food webs. Only a few specialists work on the meiofauna because of the methodological difficulties. The few investigations undertaken show the high importance of these animals in the functioning of ecosystems (*e.g.* LINHART *et al.*, 2002; LINHARTOVÁ *et al.*, 2005; SCHMID-ARAYA, 1993, 1994a, 1994b, 1997, 1998, 2000).

STEAD, SCHMID-ARAYA and HILDREW demonstrated that about 51% of total production could be accounted for by the permanent and temporary meiofauna together (STEAD *et al.*, 2005). Their study indicated the probably substantial underestimation of production arising from the problems of assessing the meiofauna. This includes the use of coarse-mesh sampling devices, the requirement for live sorting of many soft-bodied taxa, and other difficulties of counting and identifying less well known groups.

Macrofauna (>100 μm body size in freshwater ecosystems) with, on average, around 125000 individuals per m^3 , is quite rich in the RITRODAT-LUNZ study area (Fig. 2, BRETSCHKO and KLEMENS, 1986). However, it neither reaches the species richness (Fig. 11) nor abundances of the meiobenthic fauna (SCHMID and SCHMID-ARAYA, 2000).

Energy flow: The main energy pathway in low order streams goes from the allochthonic organic matter (POM or DOM) via biofilms and meiobenthic fauna to the macrozoobenthic consumer community (Fig. 4, BERRIE, 1976; LEICHTFRIED, 1995). This pathway is exemplified by the fate of leaf falling in the stream in autumn (HYNES and KAUSHIK, 1971). The leaching process starts immediately, with colonization first by fungi and then by bacteria. Biofilms on the leaf grow and attract other organisms (Protozoa) to colonize the leaf. Meiobenthic and macrozoobenthic animals next feed on the leaf and its biofilms, making it smaller, richer in proteins and able to enter the bed sediments to be included in the food supply available there.

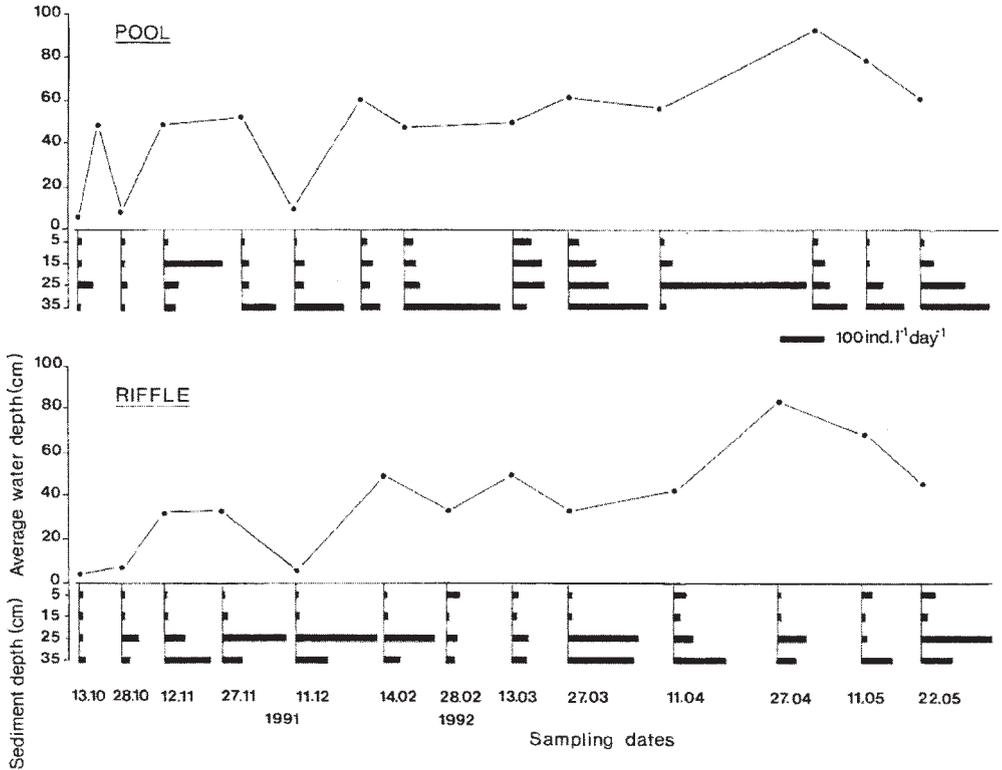


Figure 13. Water depth and vertical distribution of Rotatoria (mean abundances) in bed sediments of a pool and a riffle in the RITRODAT-LUNZ study area, Oberer Seebach (SCHMID-ARAYA, 1994).

The last members of this energy flow processes are predators like fish that feed on the consumers or even on the complex biofilm-plant tissue (LEICHTFRIED, 1988, 1991). This complex, organic matter – biofilms with meiobenthic and macrozoobenthic fauna – causes and influences the important self-purification capacity in low order mountain streams.

4. Suggestions, Conclusions

Yesterday, today and tomorrow, the energy basis of the consumer community in a low order mountain stream was the particulate and dissolved allochthonic organic matter.

The surface inputs of organic matter and the spatial and temporal distributions as well as the standing crop of organic matter in bed sediments were investigated within the framework of the RITRODAT-LUNZ CONCEPT. Some of the following processes, like decomposition processes after entering the stream ecosystem, were partly illuminated as well.

The role of subsurface imports and dynamics of organic matter, dissolved or particulate, has not yet been studied sufficiently. This is one possibility for continuing the research.

It was only around two decades ago that the appearance and importance of biofilms in streams was first recognized. A “new world” in the stream was discovered but not all questions are answered yet. Their multiple role in energy flows, as a “turntable” between the imported organic matter (particulate and dissolved) and the consumer community, is slow-

ly being accepted but not everything, by far, is known about biofilms leaving another possible avenue for future research.

The consumer community research was often focused on just the macrozoobenthic fauna. In comparison to thousands of these studies, only a few, albeit fascinating studies were made of the meiobenthic part of the community. Based on this non-observance of the meiofauna and its role in the lotic ecosystems, these should be studied more intensively.

For a very long time, people have intuitively avowed to the ability of streams to self-purify. However, the awareness and knowledge of all the complex processes involved in the functioning of streams and their self-purification capacity, as well as the value for the human community, should be developed within the society. This could be the next possible pathway for basic natural science to meet the human community.

Concluding the 25 years of study of stream ecology within the framework of GERNOT BRETSCHKO'S RITRODAT-LUNZ CONCEPT, I want to present and deposit here the main found regularities in low order mountain streams as highlight results of RITRODAT-LUNZ studies:

- I. No ecological functionality without spatial structures
- Ia. The natural topography makes retention possible
- Ib. The morphology of the stream makes the exchange processes possible
- Ic. The sediment composition influences the biofilm quantity
- II. Biodiversity needs habitat heterogeneity
- IIa. Meiofaunal community plays an important role in energy flow
- III. Flashy discharge is one of the strongest influencing parameter
- IV. Bed sediment is the central structure in the ecosystem stream
- V. Biofilms are the necessary "turntable" in the energy flow

5. Acknowledgements

The author thanks all involved colleagues for 25 years of enthusiasm and contribution to the realization of GERNOT BRETSCHKO'S RITRODAT-LUNZ CONCEPT. Thanks are due to the Austrian Academy of Sciences for logistic support.

6. References

- BATTIN, T. J., 2000: Hydrodynamics is a major determinant of streambed biofilm activity: from the sediment to the reach scale. – *Limnol. Oceanogr.* **45**: 1308–1319.
- BATTIN, T. J., L. A. KAPLAN, J. D. NEWBOLD and S. P. HENDROCKS, 2003: A mixing model analysis of stream solute dynamics and the contribution of a hyporheic zone to ecosystem function. – *Freshw. Biol.* **48**: 995–1014.
- BÄRLOCHER, F. and J. H. MURDOCH, 1989: Hyporheic biofilms – a potential food source for interstitial animals. – *Hydrobiologia* **184**: 61–67.
- BERRIE, A. D., 1976: Detritus, microorganisms and animals in fresh water. – *In*: ANDERSON, J. M. and A. M. MAC FADYEN (eds). – *The Role of Terrestrial and Aquatic Organisms in Decomposition Processes*. – 17th Symposium of BES, 15th–18th April 1975. – Blackwell Scient. Publ., 323–337.
- BOLING, R. H., E. D. GOODMAN, J. A. VAN SICKLE, J. O. ZIMMER, K. W. CUMMINS, R. C. PETERSON and S. R. REICE, 1975: Toward a model of detritus processing in a woodland stream. – *Ecology* **56**: 141–151.
- BRETSCHKO, G., 1978: Ökosystemforschung Gebirgsbach, RITRODAT-LUNZ. – *Jber. Biol. Stn Lunz* **1**: 1–16.
- BRETSCHKO, G., 1979: The new research concept of the Biological Station Lunz of the Austrian Academy of Sciences. – *Stygo News* **2**: 9–10.
- BRETSCHKO, G., 1981: Vertical distribution of zoobenthos in an alpine brook of the Ritrodat-Lunz study area. – *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **21**: 873–876.

- BRETSCHKO, G., 1985: Quantitative sampling of the fauna of gravel-streams (Project Ritrodat-Lunz). – Verh. Internat. Verein. Limnol. **22**: 2049–2052.
- BRETSCHKO, G. and W. E. KLEMENS, 1986: Quantitative methods and aspects in the study of the interstitial fauna of running waters. – Stygologia **2**: 297–316.
- BRETSCHKO, G., and M. LEICHTFRIED, 1988: Distribution of organic matter and fauna in a second order, alpine gravel stream (Ritrodat-Lunz study area, Austria). – Verh. Internat. Verein. Limnol. **23**: 1330–1339.
- BRETSCHKO, G., 1990: The dynamic aspect of coarse particulate organic matter (CPOM) on the sediment surface of a second order stream free of debris dams (Ritrodat-Lunz study area). – Hydrobiologia **203**: 15–28.
- BRETSCHKO, G., 1991: The limnology of a low order alpine stream (Ritrodat-Lunz study area, Austria). – Verh. Internat. Verein. Limnol. **24**: 1908–1912.
- BRETSCHKO, G., 1998: The river bottom in gravel streams. – In: BRETSCHKO, G. and J. HELEŠIĆ (eds.). Advances in River Bottom Ecology. – Backhuys Publ., Leiden, NL: pp. 1–11.
- CUMMINS, K. W., 1974: Structure and function of stream ecosystems. – Bio Science **24**: 631–641.
- FISHER, S. G. and G. E. LIKENS, 1973: Energy flow in Bear Brook, New Hampshire: an integrative approach to stream ecosystem metabolism. – Ecol. Monogr., **43**: 421–439.
- FLEITUCH, T. and M. LEICHTFRIED, 2004: Ash tree leaf litter (*Fraxinus excelsior* L.) breakdown in two different biotopes and streams. – Internat. Rev. Hydrobiol. **89**: 508–518.
- HYNES, H. B. N. and N. K. KAUSHIK, 1971: The fate of the dead leaves that fall into streams. – Arch. Hydrobiol. **68**: 465–515.
- HYNES, H. B. N., 1974: Further studies on the distribution of stream animals within the substratum. – Limnol. Oceanogr. **19**: 92–99.
- HYNES, H. B. N., D. D. WILLIAMS and N. E. WILLIAMS, 1976: Distribution of the benthos within the substratum of a Welsh mountain stream. – Oikos **27**: 307–310.
- IVERSEN, T. M., 1973: Decomposition of the autumn-shed beech leaves in a spring-brook and its significance for the fauna. – Arch. Hydrobiol. **72**: 305–312.
- KASIMIR, G. D., 1991: Die mikrobielle Biozönose eines alpinen Baches: Kompartimentierung, Biomassen und Aktivität. – Abschlussbericht FWF Projekt P6995-Bio: 56 pp.
- KLEMENS, W. E., 1985: Zur Problematik quantitativer Probennahmen in den Bett sedimenten von Schotterbächen unter besonderer Berücksichtigung der Makro- und Meio-Invertebraten. – Diplomarbeit, FU-Berlin, 109 pp.
- KLEMENS, W. E., 1991: Quantitative sampling of bed sediments (Ritrodat-Lunz study area, Austria). – Verh. Internat. Verein. Limnol. **24**: 1926–1929.
- KOWARC, V. A., 1990: Production of a harpacticoid copepod from the meiofaunal community of a second order mountain stream. – Stygologia **5**: 25–32.
- KOWARC, V. A., 1991: Distribution of Harpacticoids in a second order mountain stream (Ritrodat-Lunz study area, Austria). – Verh. Internat. Verein. Limnol. **24**: 1930–1933.
- LEICHTFRIED, M., 1985: Organic matter in gravel-streams. – Verh. Internat. Verein. Limnol. **22**: 2058–2062.
- LEICHTFRIED, M., 1986: Räumliche und zeitliche Verteilung von partikulärer organischer Substanz (POM-Particulate Organic Matter) in einem Gebirgsbach als Energiebasis der Biozönose. – Dissertation, Univ. Wien, 360 pp.
- LEICHTFRIED, M., 1988: Bacterial substrates in gravel beds of a second order alpine stream (Project Ritrodat-Lunz, Austria). – Verh. Intern. Verein. Limnol. **23**: 1325–1332.
- LEICHTFRIED, M., 1991: POM in bed sediments of a gravel stream (Ritrodat-Lunz study area, Austria). – Verh. Internat. Verein. Limnol. **24**: 1921–1925.
- LEICHTFRIED, M., 1995: Organic matter in bed sediments – an energy source for lotic ecosystems (a compilation of a long term study). – Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Masarykianae Brunensis, Biologia **91**: 77–93.
- LEICHTFRIED, M., 1998: Proteins: a very important fraction of particulate organic matter in riverbed sediments. – In: BRETSCHKO, G. and J. HELEŠIĆ (eds.). Advances in River Bottom Ecology. Backhuys Publ., Leiden, NL: pp. 65–76.
- LEICHTFRIED, M., 2000: Gravel bars in low-order streams: (A) distribution of organic matter (Ritrodat-Lunz study area). – Verh. Internat. Verein. Limnol. **27**: 1611–1615.
- LEICHTFRIED, M. and G. BRETSCHKO (eds.), 2001: Plant Litter Processing in Freshwater. – Internat. Rev. Hydrobiol. **86**: 369–584.

- LINHART, J., M. FIURÁŠKOVÁ and V. UVÍRA, 2002: Moss- and mineral substrata-dwelling meiobenthos in two different low-order streams. – Arch. Hydrobiol. **154**: 543–560.
- LINHARTOVÁ, Š., V. UVÍRA and J. LINHART, 2005: Stream meiobenthos and flow velocity – do mossy and mineral substrata differ? – Verh. Internat. Verein. Limnol. **27**: 1069–1071.
- LOCK, M. A. and H. B. N. HYNES, 1976: The fate of “dissolved” organic carbon derived from autumn-shed maple leaves (*Acer saccharum*) in a temperate hard-water stream. – Limnol. Oceanogr. **21**: 436–443.
- MAGANA, A. M. and G., BRETSCHKO, 2003: Retention of coarse particulate organic matter on the sediments of Njoro River, Kenya. – Internat. Rev. Hydrobiol. **88**: 414–426.
- MARMONIER, P. and D. DANIELOPOL, 1988: Decouverte de *Nannocandona faba* ECKMANN (Ostracoda, Candoninae) en basse Autriche. Son origine et son adaptation au milieu interstitial. – Vie Milieu **38**: 35–48.
- MARSHALL, K. E. (eds.), 1984: Microbial Adhesion and Aggregation. – Life Sciences Research Report 31, Springer Verlag.
- MOSER, H., 1991: Input of organic matter (OM) in a low order stream (Ritrodlat-Lunz study area, Austria). – Verh. Internat. Verein. Limnol. **24**: 1913–1916.
- MOSER, H., 1994: Factors influencing the surface input of organic matter into an alpine woodland stream. – Verh. Intern. Verein. Limnol. **25**: 1641–1645.
- MÜLLNER, A. N., 1998: Vertikal- und Horizontalverteilung des Phytobenthos in einem Kalkschotter-Gebirgsbach (Ritrodlat-Lunz, Österreich). – Diplomarbeit, Univ. Wien, 106 pp.
- MÜLLNER, A. N., 1999: The Algal Species of a Gravel Stream “Oberer Seebach”, Lunz. – Jber. Biol. Stn. Lunz **16**: 41–50.
- PALMER, M. A., 1991: Temporal and spatial dynamics of meiofauna within the hyporheic zone of Goose Creek, Virginia. – J. N. Am. Benthol. Soc. **9**: 17–25.
- ROBERTSON, A. L., S. D. RUNDLE and J. M. SCHMID-ARAYA, 2000: Putting the meio- into stream ecology: current findings and future directions for lotic meiofaunal research. – Freshw. Biol. **44**: 177–183.
- SCHMID, P. E. and J. M. SCHMID-ARAYA, 2000: Invertebrate assemblages of low-order British and Austrian streams. – Jber. Biol. Stn. Lunz **16**: 51–72.
- SCHMID-ARAYA, J. M., 1993: Spatial distribution and population dynamics of a benthic rotifer, *Embata laticeps* (MURRAY) (Rotifera, Bdelloidea) in the bed sediments of gravel brook. – Freshw. Biol. **30**: 395–408.
- SCHMID-ARAYA, J. M., 1994a: Temporal and spatial distribution of benthic microfauna in sediments of a gravel streambed. – Limnol. Oceanogr. **39**: 1813–1821.
- SCHMID-ARAYA, J. M., 1994b: Spatial and temporal distribution of micro-meiofauna groups in an alpine gravel stream. – Verh. Internat. Verein. Limnol. **25**: 1649–1655.
- SCHMID-ARAYA, J. M., 1997: Temporal and spatial dynamics of meiofaunal assemblages in the hyporheic interstitial of a gravel stream. – In: GIBERT, J., J. MATHIEU and F. FOURNIER (eds.), Groundwater/Surface Water Ecotones: Biological and Hydrological Interactions and Management Options, Cambridge Univ. Press: pp. 29–36.
- SCHMID-ARAYA, J. M., 1998: Small-sized invertebrates in a gravel stream: community structure and variability of benthic rotifers. – Freshw. Biol. **39**: 25–39.
- SCHMID-ARAYA, J. M., 2000: Invertebrate recolonization patterns in the hyporheic zone of a gravel stream. – Limnol. Oceanogr. **45**: 1000–1005.
- STEAD, T. K., J. SCHMID-ARAYA and A. G. HILDREW, 2005: Secondary production of a stream metazoa community: Does the meiofauna make a difference? – Limnol. Oceanogr. **50**: 398–403.
- STRAHLER, A. N., 1957: Quantitative analysis of watershed geomorphology. – Am. Geophys. Union Trans. **38**: 913–920.
- UVÍRA, V., G. BRETSCHKO and W. WAITZBAUER, 2000: Gravel bars in low-order streams: (B) lotic and terrestrial fauna (Ritrodlat-Lunz study area). – Verh. Internat. Verein. Limnol. **27**: 1616–1621.
- WAGNER, F. H. and G. BRETSCHKO, 2002: Interstitial flow through preferential flow paths in the hyporheic zone of the Oberer Seebach, Austria. – Aquatic Sciences **64**: 307–316.
- WAGNER, F. H. and G. BRETSCHKO, 2003: Riparian trees and flow paths between the hyporheic zone and groundwater in the Oberer Seebach, Austria. – Internat. Rev. Hydrobiol. **88**: 129–138.
- WAGNER, F. H. and M. LEICHTFRIED, 2003: RITRODAT 1977–2003, Struktur und funktionelle Zusammenhänge im Ökosystem Bach. – Endbericht, 132 pp.

Manuscript received February 14th, 2006; revised February 5th, 2007; accepted April 14th, 2007

Research article

Open Access

Quantifying the threat of extinction from Muller's ratchet in the diploid Amazon molly (*Poecilia formosa*)

Laurence Loewe^{*1,2} and Dunja K Lamatsch^{3,4,5,6}

Address: ¹Institute of Evolutionary Biology, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, Ashworth Laboratories, King's Buildings, Edinburgh EH9 3JT, UK, ²Centre for Systems Biology Edinburgh, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, Darwin Building, King's Buildings, Edinburgh EH9 3JU, UK, ³Universität Würzburg, Institute of Physiological Chemistry I, Biocenter, Würzburg, 97074 Würzburg, Germany, ⁴Freshwater Biology, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Vautierstraat 29, B – 1000 Brussels, Belgium, ⁵University of Sheffield, Department of Animal and Plant Sciences, Alfred Denny Building, Western Bank, Sheffield, S10 2TN, UK and ⁶Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria

Email: Laurence Loewe^{*} - Laurence.Loewe@evolutionary-research.net; Dunja K Lamatsch - Dunja.Lamatsch@oeaw.ac.at

^{*} Corresponding author

Published: 19 March 2008

Received: 28 June 2007

BMC Evolutionary Biology 2008, 8:88 doi:10.1186/1471-2148-8-88

Accepted: 19 March 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/8/88>

© 2008 Loewe and Lamatsch; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The Amazon molly (*Poecilia formosa*) is a small unisexual fish that has been suspected of being threatened by extinction from the stochastic accumulation of slightly deleterious mutations that is caused by Muller's ratchet in non-recombining populations. However, no detailed quantification of the extent of this threat is available.

Results: Here we quantify genomic decay in this fish by using a simple model of Muller's ratchet with the most realistic parameter combinations available employing the evolution@home global computing system. We also describe simple extensions of the standard model of Muller's ratchet that allow us to deal with selfing diploids, triploids and mitotic recombination. We show that Muller's ratchet creates a threat of extinction for the Amazon molly for many biologically realistic parameter combinations. In most cases, extinction is expected to occur within a time frame that is less than previous estimates of the age of the species, leading to a genomic decay paradox.

Conclusion: How then does the Amazon molly survive? Several biological processes could individually or in combination solve this genomic decay paradox, including paternal leakage of undamaged DNA from sexual sister species, compensatory mutations and many others. More research is needed to quantify the contribution of these potential solutions towards the survival of the Amazon molly and other (ancient) asexual species.

Background

It is a general observation that asexual lineages do not last over very long periods of time, but the precise reasons for this are less clear [1]. Ancient asexuals are the rare exceptions to this rule and it is of considerable biological interest to know what mechanisms allow them to survive for so long. They must have found a way to overcome the long-term fitness-degrading consequences of genetic processes

like Muller's ratchet and/or ecological processes like Red-Queen dynamics [1-6]. Muller's ratchet describes the long-term accumulation of slightly deleterious mutations in asexual populations and has been suggested as a key mechanism for the extinction of asexual species on the long term [3,7,8]. Unfortunately most of these predictions remain at a stage of verbal argument [1], making it very difficult to rule out that Muller's ratchet may not have had

enough time to cause extinction. As the behavior of Muller's ratchet can be very sensitive to model parameters [7], realistic values need to be used to predict the consequences of mutation accumulation for a given ancient asexual species. We employ a simple null hypothesis [see [7]] for testing the threat of extinction from Muller's ratchet in the unisexual fish *Poecilia formosa*, the Amazon molly.

Overcoming the lack of quantification

Quantifications of the threat of extinction from Muller's ratchet are often not trivial theoretical work that requires either challenging mathematics [9] or complex computer simulations [7] or both [7]. Therefore some adopt the pragmatic approach that any system with no recombination and a potential for appreciable slightly deleterious mutation rates could be driven to extinction by Muller's ratchet [3]. Such arguments frequently overlook the fact that the particular combination of parameters in that species might not be expected to lead to extinction within the known time of its existence, even if Muller's ratchet is clearly operating [1,3,7]. Thus statements about the evolutionary short lives of asexuals are often less quantitative than would be desirable [1]. In other words there may not be a genomic decay paradox that calls for any special solutions [7]. We advocate the use of a simple model for predicting extinction times caused by Muller's ratchet in order to make current discussions about ancient asexuals more quantitative [1,7], even if that model cannot capture the full complexity of our study species and therefore only leads to tentative predictions. We believe that small steps in model development will allow future models to benefit from the experiences with simpler models. Hence our use of a simple model of Muller's ratchet that ignores all complications like potential Red Queen dynamics that might accelerate the rate of Muller's ratchet (see discussion below and [6]). We focus on testing the null hypothesis that Muller's ratchet could not have led to extinction in a given time frame, as described by Loewe [7]. While this is an important advance over the purely verbal stage, we want to encourage future work to model the various processes that increase or decrease the predicted speed of genomic decay. We also want to encourage more empirical work to establish the precise values of parameters in these models. Such work is needed for other asexual species as well.

The Amazon molly and Muller's ratchet

The fish *Poecilia formosa* was the first unisexual vertebrate that was discovered [10]. This all-female species resulted from hybridization between relatives of *Poecilia mexicana* and *Poecilia latipinna* [11,12] that probably happened between 40,000 and 100,000 years ago (see section 'Age ...' below and [11,12]). Reproduction normally occurs by sperm-dependent parthenogenesis, i.e. diploid eggs are

produced, which need to be activated for embryonic development by sperm of closely related species. It has been argued that paternal leakage, leading to the expression of paternal genes, plays a pivotal role to stop Muller's ratchet [13] that otherwise would have driven the species to extinction in less time than its current estimates of existence [11]. Paternal leakage and other processes that may slow down genomic decay are discussed below. We want to determine if these processes are necessary to explain the survival of this fish into our times.

Habitat and population structure

The Amazon molly is a small fish (3 – 7 cm) that lives in a rather limited range from the Nueces River in south-east Texas southward to the mouth of the Rio Tuxpan, north of the Sierra del Abra in Mexico. All these river systems flow from west to east and have no connection other than the sea. The population on such a large scale may have some structure, as populations from south Texas, for example, have no reasonable connection with those in the Río Purificación. However, as the Amazon molly tolerates marine conditions [14], migration cannot be entirely excluded. A study of F_{ST} in subpopulations that span a distance of about 100 km in the same river system did not find significant population subdivision [15]. Some simple models of population subdivision do not affect the effective population size N_e and probabilities of the fixation [such as some island models [16,17]]. However, more realistic models of population structure that allow for extinctions and recolonizations can have a substantial impact on deleterious mutation accumulation [18,19]. To simplify our theoretical treatment, we will assume that the whole species has no substructure that is not already accounted for by our assumed N_e .

Genetics

The Amazon molly reproduces gynogenetically, i.e. its eggs contain an unreduced set of chromosomes, that need the sperm of one of the sister species *Poecilia mexicana* or *Poecilia latipinna* as a mechanical trigger to start development [20-22]. Usually, only the diploid set of maternal genes is expressed and the paternal genome is expelled. However, occasionally, the paternal genome remains, giving rise to a triploid clone, that reproduces as a triploid gynogen [15,23]. In other cases, only traces of the paternal genome (so-called micro-chromosomes) escape the enzymatic machinery that clears the egg from the nucleus that arrived with the sperm [24]. In all cases, the full diploid or triploid set of chromosomes (with or without micro-chromosomes [24,25]) is clonally passed on to offspring, without an obvious opportunity for recombination [26]. Based on this lack of recombination it was hypothesized that Muller's ratchet should have driven the Amazon molly to extinction within the presumed time of its exist-

ence, unless processes like paternal leakage would stop genomic decay [13].

Aims

Here we aim to quantify the verbally predicted effects of Muller's ratchet in order to see, whether there really is a genomic decay paradox as defined by Loewe [7] that calls for an explanation. Results show that indeed a range of realistic parameter combinations should have led to the extinction of Amazon molly within the time of its presumed existence.

Results

We quantified the rate of mutation accumulation due to Muller's ratchet using the best available analytical approximations [9,27,28] and globally distributed individual-based simulations run by Simulator005r6 of evolution@home [7,29-31] assuming our estimates of the most realistic parameter combinations. To this end we used the standard null model of Muller's ratchet described elsewhere [7] and extended it to accommodate the slowdown in fitness decay that can be caused by polyploidy and mitotic recombination. We employ the U-shaped plot of extinction times against selection coefficients to allow easy visualization of situations that lead to a genomic decay paradox. The frequency of these situations can be measured by specifying the range of critical selection coefficients s_c that are defined by the prediction of corresponding extinction times that are below T_{age} , the presumed age of asexuality in an evolutionary line. For more detailed explanations of this plot see Loewe [7].

The results show that values for U_{sdm} , the slightly deleterious mutation rate, that are above $U_{sdm} \approx 0.1$, lead to the extinction of the Amazon molly within the estimated $T_{age} = 81,000$ years of its existence, even if lower and upper limits for T_{age} are considered (see Figure 1 and T_{age} estimates below). This is also true for our best estimate of U_{sdm} in the unlikely case of extremely high levels of mitotic recombination (then U_{sdm} is scaled to 0.2 deleterious mutations with critical effects/diploid genome/generation). These findings are rather independent of the effective population size N_e , as even $N_e = 10^7$ (certainly larger than the true N_e of the Amazon molly) will not help against Muller's ratchet if mutation rates are too high.

A deleterious mutation rate of about $U_{sdm} \approx 0.05$ per generation results in extinction times that border with upper limits of estimates of the age of the Amazon molly of 10^5 years. At this mutation rate some values of N_e , R_{max} and T_{gen} permit persistence and others cause extinction within this timeframe, where R_{max} is the maximal reproductive capacity of the non-degenerated ancestors and T_{gen} is the generation time. The variability due to N_e , R_{max} and T_{gen} is indicated for $U_{sdm} = 0.05$ by the dashed black lines in Fig-

ure 1. These factors lead to similar variability of extinction times for other mutation rates. If the deleterious genomic mutation rate were only 0.01, then extinction due to Muller's ratchet in the known age of the *P. formosa* lineage could be excluded, even with the current uncertainty in other parameters.

If deleterious mutation rates are greater than our best estimate of $U_{sdm} \approx 0.4$, then Muller's ratchet will cause extinction of the Amazon molly in a few thousand years from the origin of asexuality under the standard model in the absence of mitigating forces. Such high mutation rates seem to be supported by our best approximation of the genetic architecture in the Amazon molly (many approximately codominant mutations of small effects in a genome with very low levels of mitotic recombination lead to an effective doubling of U_{sdm} as shown in the Equal-Contribution-Model in Table 1 and discussed in the Models section below).

Following Loewe [7], the threat of extinction from Muller's ratchet in Amazon molly can be quantified in detail as follows:

$U_{sdm} = 0.5$ (and a mean of all other values) yields a minimal extinction time, T_{ex} of $T_{ex} \approx 5$ Kyr due to most critical selection coefficients, s_{cm} , in the range from $s_{cm} \approx 0.005$ to 0.05. A genomic decay paradox for this mutation rate exists at $T_{age} = 100$ Kyr in the range of critical selection coefficients $s_c \approx 0.0002$ to 0.06.

$U_{sdm} = 0.1$ (and a mean of all other values) yields a minimal extinction time of $T_{ex} \approx 50$ Kyr due to most critical selection coefficients in the range from $s_{cm} \approx 0.005$ to 0.01. A genomic decay paradox for this mutation rate exists at $T_{age} = 100$ Kyr in the range of critical selection coefficients $s_c \approx 0.001$ to 0.01.

Lower mutation rates under the same conditions lead to minimal extinction times that are longer than the assumed age of the line ($U_{sdm} = 0.05$ leads to extinction in $T_{ex} \approx 200$ Kyr at $s_{cm} \approx 0.005$ and $U_{sdm} = 0.01$ to $T_{ex} \approx 3$ Myr at $s_{cm} \approx 0.001$). See the coloured lines in Figure 1 for a visual overview.

If mutation rates are increased beyond the natural levels that we estimated (e.g. by mutagenic pollution), then the most damaging mutational effects are all in the range of several percent or more and resulting minimal extinction times can be surprisingly short. For example, $U_{sdm} = 1$ can lead to extinction times of about 300 years by accumulating deleterious mutational effects of $s \approx 10\%$. If mutagenic pollution leads to a further 10-fold increase of U_{sdm} , then extinction times are expected to be less than 30 years, as

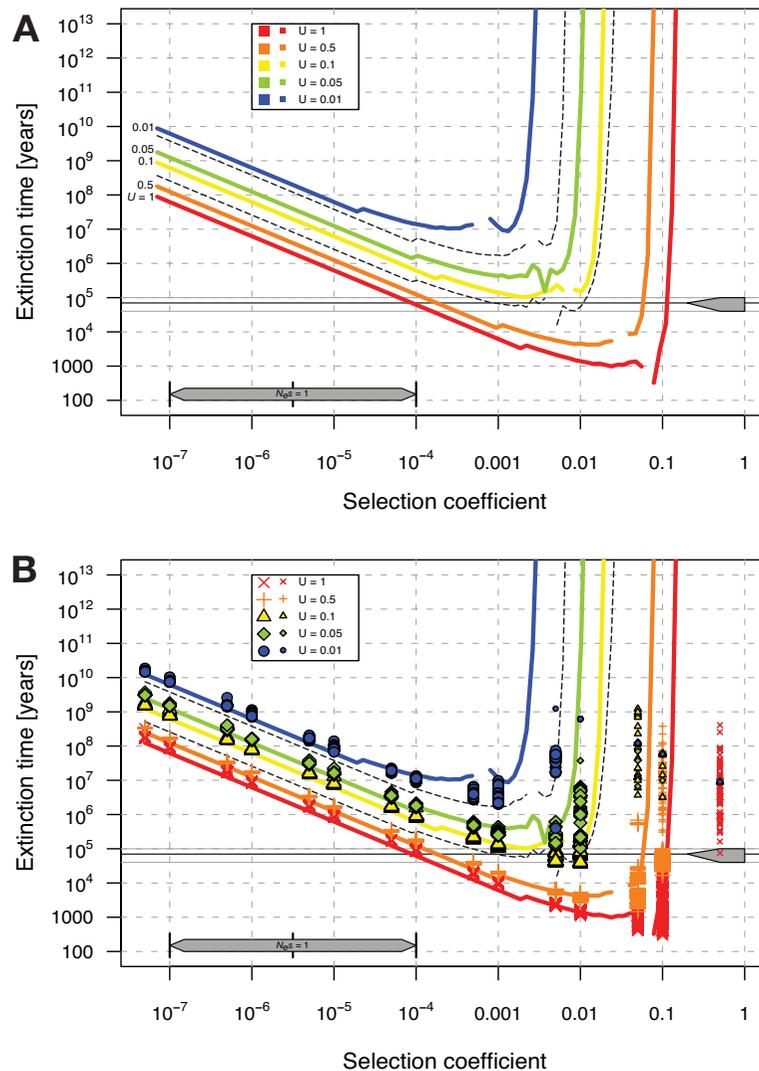


Figure 1

Predicted extinction times of the Amazon molly. Muller's ratchet might cause extinctions of the unisexual Amazon molly due to the accumulation of slightly deleterious mutations. **(A)** analytical results only, **(B)** analytical results and simulations combined. The upper bar denotes the assumed age of the line (70 Ky, min 40 Ky, max 100 Ky). The lower bar marks the border to neutrality for the effective population sizes (N_e) used by spanning the selection coefficients from $N_{es} = 1$ for the largest (10^7 females) to the smallest conceivable N_e (10^4 females). The lines represent the analytic predictions of the extinction time for different deleterious genomic mutation rates (U_{sdm}) with $N_e = 316,000$, generation time $T_{gen} = 1$ year and maximal reproductive capacity $R_{max} = 500$ offspring/generation. Our current best overall estimate for U_{sdm} is 0.4 critically deleterious mutations/diploid genome/generation. Our upper limit is close to $U_{sdm} = 1$. The dashed lines indicate the variability of the extinction time estimates for a value that is close to our lowest credible mutation rate estimate ($U_{sdm} = 0.05$, green diamonds) using the corresponding upper and lower limits of N_e , T_{gen} and R_{max} ; variability in extinction time is similar for other U_{sdm} . Large symbols denote valid extinction time estimates from simulations with at least 2 observed clicks of Muller's ratchet (usually many more, up to 500). Small symbols denote lower limits for extinction times from simulations without observed clicks, based on the (usually wrong) assumption that the ratchet would have clicked just after stopping the simulation. Each symbol denotes an independent simulation with a different random seed and assumes the same mean T_{gen} and R_{max} as analytic predictions (different N_e have been plotted on top of each other to avoid a series of similar plots). This plot contains 24,251 simulations with a total of 14.78 years of computing time. See main text for a discussion of parameter combinations and Loewe [7] for an in-depth explanation of the U-shaped plot shown here. The location of the wall of background selection for a particular parameter combination is approximately given by the vertical part of the corresponding line: all mutations with effects larger than the location of this wall are removed deterministically.

Table 1: Useful transformations for computing expectations and bounds for the rate of Muller's ratchet in diploids.

Genome type	Recessive ($h = 0$)	Co-dominant ($h = 0.5$)	Dominant ($h = 1$)
(1) asexual haploid	$\frac{U_{sdm}}{s}$	$\frac{U_{sdm}}{s}$	$\frac{U_{sdm}}{s}$
(2) asexual diploid	Core-Genome-Model (extreme forms are unrealistic) Stage 1 (MA is easy, may be harmless): $\frac{2U_{sdm}}{sh} \rightarrow \frac{0}{sh}$ Stage 2 (MA is harder, may be impossible): $\frac{0}{s(1-h)} \rightarrow \frac{<2U_{sdm}}{s(1-h)}$	Equal-Contribution-Model (useful first order approximation) $\frac{2U_{sdm}}{sh}$	Every-Allele-Needed-Model (most unrealistic) Stage 1 (MA is hard, may be impossible): $\frac{2U_{sdm}}{sh} \rightarrow \frac{>>0}{sh}$ Stage 2 (MA is easier, may be still hard): $\frac{0}{s(1-h)} \rightarrow \frac{<<2U_{sdm}}{s(1-h)}$
(3) asexual diploid with mitotic recombination	intermediate between genome type (2) and (4)	intermediate between genome type (2) and (4)	intermediate between genome type (2) and (4)
(4) automictic selfing diploid with free recombination	$\frac{2U_{sdm}}{2s}$	$2U_{sdm} / 2s \frac{(1+sh)}{(1-sh)}$	$2U_{sdm} / 2s \frac{(1+s)}{(1-s)}$

The table gives the variables in the exponent of $N_0 = N_e \cdot e^{-U_{sdm}/s}$, where N_0 is the number of individuals in the population that are in the 'best class' (has the highest fitness) in mutation-selection balance. Here we propose that Muller's ratchet in a given genome type can be approximated by using predictions for Muller's ratchet in a haploid asexual genome and applying the scaling given here. U_{sdm} = slightly deleterious mutation rate/haploid genome, s = homozygous selection coefficient, h = dominance coefficient, sh = heterozygous selection coefficient, where in this table positive s denote harmful mutations. The two stages for asexual diploids denote the fixation of the first and second deleterious mutation that can occur at a diploid locus. For individual stages, arrows indicate the change of U_{sdm}/s with increasing mutation accumulation (= MA). '<' or '>' indicate that mutation rates will remain below or above the indicated level, respectively.

increasingly harmful mutations start to accumulate as well (extrapolation from Figure 1).

Discussion

This is the first detailed assessment of the threat of extinction from deleterious mutation accumulation through Muller's ratchet in the Amazon molly. Combining our best estimates of the haploid deleterious mutation rate ($U_{sdm} \approx 0.2$) with our best approximation of the genetic architecture in the Amazon molly (many approximately codominant mutations of small effects in a genome with very low levels of mitotic recombination) leads to an effective deleterious mutation rate of $U_{sdm} \approx 0.4$ mutations with critical effects/diploid genome/generation. In the absence of significant mitigating forces this would cause extinction of the Amazon molly in a few thousand years. More precise results can be taken from Figure 1 if needed. This represents a big step forward for understanding the asexuality in the Amazon molly, since never before have

the times to extinction been quantified in such detail for this fish.

Genomic decay paradox

Combining predicted extinction times with current estimates of the age of asexuality in the Amazon molly leads to a genomic decay paradox, as defined by Loewe [7]. Thus mechanisms that extend our standard model of Muller's ratchet are needed to explain why this fish has thus far escaped extinction. Such mechanisms are not needed if either our most plausible mutation rate estimates are too high or the Amazon molly is younger than current age estimates suggest (effective $U_{sdm} = 0.04 - 0.9$; $T_{age} = 40,000 - 100,000$ years, see section 'Age...' below and [11,12]). As current evidence seems hardly compatible with such low mutation rates or such a young age of *P. formosa*, the quest for mechanisms that help this fish escape genomic decay seems to be valid. This is corroborated by our observation of a fitness correlate, the number of embryos found in females, which does not show signif-

icant differences between *P. formosa* and *P. mexicana* (one of its parental species, see section on life history below). While we have no such information for other correlates such as longevity, number of broods per life, offspring survival, etc., our current limited evidence suggests that *P. formosa* experiences only little or no genomic decay despite our predictions of substantial deleterious mutation accumulation. Below we will discuss processes that might be of special importance for maintaining fitness in the Amazon molly.

Mitotic recombination

Some reports of apomixis in the Amazon molly suggest a little debated potential solution to the mystery of its long-term survival. Rasch *et al.* [26] reported low, but consistent, levels of tissue graft rejections after prolonged periods (up to one year) within certain sibships, suggesting that not all inheritance is strictly isogenic in the Amazon molly. In the absence of a meiotic prophase these observations have been interpreted as the result of either a mutation rate that exceeds expectations or as the result of somatic cell crossing-over [26,32]. This process is also known as mitotic recombination and is most likely an inevitable result of the way that cells organize mitosis. It was first discovered in *Drosophila* [33,34] and has been intensively studied in yeast [35-37], mice [38], humans [39] and *Daphnia* [40]. The frequency of mitotic recombination in some fungi was found to be between 10^2 and 10^4 times less than that of meiotic recombination [41] and recent experiments in yeast reported a factor of $\approx 25,000$ [37]. Estimates suggest that about 10 sister chromatid exchanges per cellcycle can occur in mammalian cells [42]. Such evidence suggests that the Amazon molly experiences mitotic recombination, even if the effective rate of segregation of different mutations is probably much lower than in selfers with meiotic recombination. The fact that asexual *Daphnia* have been shown to experience mitotic recombination [40] means that the Amazon molly would not be the only asexual to experience mitotic recombination.

If this is true, the resulting segregation might slow down Muller's ratchet for some selection coefficients [43-45], compared to expectations from the Equal-Contributions-Model described below. However, the fact that the distribution of mutational effects is expected to be very wide on a log scale [46,47] means that corresponding smaller selection coefficients will continue to drive Muller's ratchet. Thus it is difficult to see how mitotic recombination could stop the ratchet on its own without the contribution of other processes. We can use a simple model to put an upper limit on the maximal potential of mitotic recombination to stop Muller's ratchet. Mitotic recombination cannot possibly do more to stop fitness decay than in the case of completely free mitotic recombination. This

allows for mutations to segregate at a maximal rate and has been used to model Muller's ratchet in selfers [45]. As shown below (see section on Muller's ratchet with selfing), a simple scaling of mutation rate and selection coefficient is enough to extend the standard model of Muller's ratchet to this case. Applying such a scaling to our results does not remove the genomic decay paradox that we find (see Table 1; it is questionable whether mitotic recombination will have a large effect, since the rates of mitotic recombination are probably far from free recombination). Similarly an analysis of the various levels of dominance that are possible for diploids and triploids as shown in Table 1 does not remove the paradox. Thus we will have to search for other solutions.

Rare recombination events during oogenesis in the Amazon molly are not conceptually different from mitotic recombination in the germ line or selfing. To limit the largest possible contribution of these processes towards stopping genomic decay we assume the most generous form of selfing, which is free recombination between both diploid copies. As our analysis above shows, the largest possible amount of recombination during oogenesis cannot stop Muller's ratchet – if no fresh genes are introduced by outcrossing of some sort.

Paternal leakage

Occasional paternal leakage of fresh genetic material from sexual sister species could serve as a template for DNA repair [48] or restore genes that had been destroyed by Muller's ratchet [13,49]. Paternal leakage has been demonstrated to lead to the expression of paternal genes [13,50], suggesting a compensatory role in the Amazon molly [13]. There are two mechanistic scenarios that may facilitate this.

(i) Micro-chromosomes with a size of about 1% of the genome have been observed to leak from a sexual sister species to the Amazon molly [13,24]. If they carry an occasional random sample of genes from the non-degraded sexual genome into the degrading Amazon molly population, then the possibility exists that they might restore an ancient, non-degraded state of fitness. This could slow down Muller's ratchet enough to solve the genomic decay paradox [13,25]. Micro-chromosomes have been demonstrated to be stably inherited over many generations [25,51].

(ii) The finding of triploid clones might encourage the speculation that the third genome copy that is contributed by the sexual sister species might help restore fitness [49]. One might speculate that triploids should produce more offspring or survive better and ultimately substitute the diploid individuals. However, observations suggest the contrary, as triploids are rather limited in their range,

young, and much less frequently produced than in other asexuals [15,23]. An alternative possibility is that triploids might occasionally lose one of their three genome copies and give rise to secondary diploids that can carry presumably fitter genes from their sexual sister species. If such a gene flow exists from the sexual sister species over paternal leakage and an intermediate triploid stage to a final diploid stage, then such a flow might contribute towards solving a genomic decay paradox [49]. However, there is no evidence for such a directed gene flow and triploids are produced much rarer in the Amazon molly than in other asexuals or than micro-chromosomes in *P. formosa* [23].

In any case, paternal leakage should not be confused with true recombination, which has stimulated discussions about the ratchet stopping potential of paternal leakage [52,53]. It has also been speculated that the paternal genome might be used as a template for DNA repair, but its precise role remains unclear [48].

Other processes

There is a long list of other potential solutions for the genomic decay paradox that has been given elsewhere [7] and thus shall not be discussed in detail here. This list includes the unlikely possibility that the true deleterious mutation rate might be much lower, either because mutation rates in the Amazon molly happen to be generally much lower for yet unknown reasons, or because the distribution of mutational effects happens to be strongly bimodal with almost no mutations in the critical intermediate range. These hypotheses are not well supported by comparative analyses of mutation rates and effects in different species (see Parameter Estimates below). Synergistic epistatic effects have also been argued to have the capacity to stop genomic decay [54,55], but this is only true in combination with very specific distributions of mutational effects. If these distributions are reasonably wide, the potential for epistatic effects to decelerate Muller's ratchet is virtually non-existent [56].

We have also ignored advantageous and compensatory mutations, which have a substantial potential to stop genomic decay completely, if they are frequent enough [57-59]. Recent work has suggested that a substantial fraction of all mutations is advantageous [47,60]. If the underlying patterns are not caused by other processes and the selection coefficients of the corresponding mutations are large enough, then advantageous mutations can stop Muller's ratchet. Recent work in viruses has suggested that the ratio of beneficial to deleterious mutations can increase as the mean fitness decreases [61]. If similar dynamics hold for fish then Muller's ratchet may operate much slower, if at all. A more detailed discussion of back mutations and compensatory mutations can be found elsewhere ([7] and references therein).

To increase the precision of extinction time estimates it would be desirable to have more direct empirical estimates of mutation rates and effects in the Amazon molly. Such more precise estimates are needed when specific potential solutions for this genomic decay paradox are to be tested. The evidence presented here makes it seem unlikely that such added information will change our main conclusion that a genomic decay paradox exists for the current age estimates. For more details and additional potential solutions, please see [7].

Red Queen

It is possible that Muller's ratchet is not the only process that leads to genomic decay and that the speed of Muller's ratchet may be significantly increased by other processes. The Amazon molly and its closely related sister species are known to harbor parasites [62,63]. These parasites probably decrease the fitness of their host substantially in the wild and co-evolve with it in an evolutionary arms race for survival. This scenario is described by the Red Queen hypothesis [3,5,64,65] and may in itself lead to the extinction of a species. A Red Queen scenario can also be caused by antagonistic co-evolution in general, which may occur in many circumstances, including evolving predator-prey or plant-herbivore relationships or intra-specific co-evolution. It is also known that the speed of mutation accumulation caused by Muller's ratchet is enhanced in a population that experiences Red Queen dynamics [6,66]. Empirical support for a prerequisite of the Red Queen hypothesis could be found in another member of the family Poeciliidae to which the Amazon molly belongs [67]. Thus the Amazon molly might participate in such an arms race, however we currently do not know the range of biologically realistic parameter combinations that are needed to quantify Red Queen dynamics here. The Red Queen Hypothesis predicts an increased load from parasites in asexuals, because they cannot adapt as fast as sexuals to newly evolving parasites. Based on this prediction one might not expect substantial Red Queen dynamics in the Amazon molly, since it seems to have about as many parasites as its sexual sister species [68]. Another attempt to discover Red Queen dynamics in the Amazon molly was also negative [69,70]. If the Amazon Molly is forced to constantly evolve as under Red Queen dynamics, then the genomic decay paradox might be more extreme.

Implications for the origin of the Amazon molly

Many attempts to produce fertile asexual hybrids in the laboratory have been unsuccessful [71-73], but under natural conditions such hybridization attempts between the sympatric parental species of the Amazon molly, *P. mexicana* and *P. latipinna*, might happen occasionally. If such hybridization events occurred regularly, they could have led to a stable existence of the Amazon molly form, even though all individual hybrids are on their way to extinc-

tion as they will soon be replaced by fresh hybrids. In this case we expect multiple different young hybrid lines in random samples from the overall population of the Amazon molly, as each lineage of hybrids will be closer to its parental species than to other independent hybrids. The corresponding phylogenetic tree is expected to be polyphyletic.

Such a scenario is not supported by existing mtDNA data [12,72]. Amazon molly individuals sampled from a wide range of locations show a paraphyletic tree that is compatible with a single hybridization event in the distant past. This is based on the observation that Amazon molly mtDNA sequences cluster either with each other or with exactly the same ancestral sequence from the parental species [12]. If all sequences sampled in the future follow the same pattern, this rules out polyphyly and casts serious doubts over the hypothesis of multiple hybridizations in the past [12]. Combining this with the difficulties to produce asexual hybrids in the lab [71-73] suggests that the Amazon molly probably comes from a singularly rare hybridization success. This is in marked difference to some other species, where asexual hybrids are much easier to obtain [73]. Thus our quantification of Muller's ratchet only applies to the descendants of this one clone that appears to have an age of about 80 Ky.

We cannot distinguish whether the Amazon molly originated by a single ancient hybridization event or whether there was a small series of such events involving very similar parental individuals in the distant past. This is of no importance for our conclusions, as the subsequent course of mutation accumulation is not expected to be different from that in a population that goes back to a single hybridization event.

In order for other hybridization events to affect our conclusions, there would have to be a repeated production of fresh clones that could then constantly replace the decaying genomes in the population. This is expected to show in phylogenetic analyses. Current analyses show the absence of polyphyly and indicate that there is no ongoing hybridization in the wild [12,72]. Thus our analysis is appropriate for the time that came after the population was cut off from geneflow. This is the time T_{age} that we estimate as the time that Muller's ratchet had for degrading the Amazon molly. In the case that future work uncovers multiple hybridization events, our analysis is valid for the lifespan of each clone, assuming no additional factors like interclonal competition that is independent of Muller's ratchet.

As current genetic data cannot infer what happened before the origin of our current lineage of the Amazon molly, this lineage might well be only the *last* unisexual Amazon

molly that did not yet go extinct, with many others preceding it. As we know nothing about potential previous clones our ability to test the so-called "Frozen-Niche-Variation model" [73,74] is rather limited in this case.

Conservation genetics

Since extinction time is very sensitive to changes in the mutation rate, it is conceivable that the anthropogenic release of mutagenic substances could lead to such a strong increase in mutation rate that extinction times are predicted to be in time frames that are frequently considered by conservation biologists. One of us (DKL) could actually observe a typical *Poeciliid* habitat that had lost almost all vertebrate life due to apparent water pollution (Altamira, Tamaulipas, Mexico, 2002). Although we have no evidence to decide whether this incident was mutagenic or not, pollution in general often has mutagenic side effects. This suggests the possibility of considerable pollution at least of parts of the habitat of the Amazon molly and would not be the first instance where pollution in rivers leads to a several-fold increase of mutation rates (see observations in ferns [75-78]).

Quantifying Muller's ratchet in other ancient asexuals is easier now

It is well known that asexual lineages are typically short-lived. While this observation is central to theories about the origin of sex, it still needs to be properly quantified [1]. The evolution@home results used in this work make it manageable to quantify the threat from Muller's ratchet for the long list of other putatively ancient asexuals that have been suspected of being threatened by genomic decay [1,4,79,80], including the Amazon molly's close relative *Poeciliopsis* [74,81]. We suspect that it might not be possible to explain the existence of all these asexuals by the surprising discovery of a recent ancestor with a very young age as in the case of the clonal, hybrid, gynogenetic mole salamander *Ambystoma* [82-84]. Even if that were the case, then it would still be interesting to quantify Muller's ratchet, as this would shed more light on how fast it actually clicks in clonal lineages, where some evidence is consistent with its operation [85-89]. Examples of ancient asexuals that could benefit from a more rigorous quantification of the effects of Muller's ratchet include:

(i) *Darwinula stevensoni*, a small non-marine ostracod. Darwinulidae are believed to have lived for about 200 Myr without sex as the fossil record shows only females [80] – but see Smith *et al.* [90]. The species *Darwinula stevensoni* is a member of this group and is thought to exist for more than 20 Myr now [80,91,92].

(ii) Bdelloid rotifers. The Class Bdelloidea of the Phylum Rotifera is the largest taxonomic group that has apparently lived completely without sex for at least 40 Myr [93-95].

The ancient asexuality of these 0.1 to 1 mm long animals appears to be as well established as it can possibly be. Various special features of this group have been discussed as the reason behind its long-term survival [96-99].

(iii) Oribatid mites. Parthenogenetic automicts are frequent among oribatid mites [100,101]. Current estimates suggest that some lines have lived parthenogenetically for perhaps 100 Myr and that their extant distribution was strongly affected by continental drift [102].

Practical aspects

To quantify the possibilities of extinction from Muller's ratchet in a given asexual system using the evolution@home results database, please contact one of us (LL). You will receive help in completing a survey of various details about your study system (see online questionnaire [103]) and if enough data is available, a preliminary report will be produced (including plots similar to Figure 1). If necessary, the existing evolution@home infrastructure can be used to compute new parameter combinations. Our experience shows that the prediction of extinction times in ancient asexuals can often be simplified by using rough upper and lower limits for important parameters. For some parameters the lack of precision will not be critical, where as for others it will help focus further empirical work towards parameter estimation.

Why quantify the ratchet as often as possible?

There are many open questions that can be asked about the general accuracy of the simple standard model of Muller's ratchet used for the quantifications presented here [7]. We believe that the following reasons justify a series of analyses of extinction times in various asexuals based on our null-model. We expect such work to contribute towards a mature, quantitative discussion about the evolutionary biology of asexuals.

(i) Critical predictions of extinction time help biologists to look for the key data that is also needed for more realistic quantifications of the effects of mutation accumulation. Therefore such predictions help in the design of empirical work.

(ii) It can be expected that at least some of the putative ancient asexuals are not examples of the genomic decay paradox, because the known age of their asexuality is smaller than their predicted extinction time. This does not deny the age of their asexuality, it just takes the 'scandal' out of the observations [4].

(iii) Those species with an apparent genomic decay paradox can be subject to a more detailed search for mechanisms that solve the paradox and help them to avoid extinction [7].

(iv) Experiences with the present simple system for predicting extinction times can be expected to lead to the development of more realistic systems for the quantification of genomic decay paradoxes. Such improved systems might include the processes discussed here and might measure their mitigating effects on mutation accumulation.

Conclusion

A genomic decay paradox is predicted by a large number of biologically realistic parameter combinations for the unisexual Amazon molly. This is based on a simple model of Muller's ratchet that accounts for the distribution of mutational effects on fitness, the availability of multiple copies of the genome and mitotic recombination. Our prediction of a genomic decay paradox strengthens the conclusions of earlier work that suggested the existence of additional biological processes that slow down or halt the mutational decay of fitness in this fish. This conclusion is consistent with our observation that the Amazon molly carries approximately the same number of embryos per adult as its sexual sister species. Future work will have to establish whether paternal leakage of micro-chromosomes or still other processes have helped the Amazon molly to survive until today. If these mitigating processes are weak enough, an increase of mutagenic substances in the environment could easily lead to a rate of mutation accumulation that might allow extinction within time frames that are frequently of interest to conservation biologists.

Methods

Standard null model

To test the hypothesis that Muller's ratchet does not threaten the Amazon molly with extinction during the known time of its existence, we used the null model for quantifying the threat of extinction from Muller's ratchet, as described elsewhere in detail [7]. This model is a simple extension of the standard model of Haigh [104] combined with mutational meltdowns [105]. In short, we combined a multiplicative fitness model with an upper limit for R_{max} , the maximal effective number of offspring that can be produced by an individual. This allows computing C_{mm} , the number of clicks of Muller's ratchet that are needed to start mutational meltdown

$$C_{mm} = \log(1/R_{max})/\log(1 - s), \quad (1)$$

where each click is the stochastic extinction of the genotype carrying the fewest deleterious mutations that have the constant positive selection coefficient s [see [7,105]]. While this extinction does not require the fixation of a new mutation in the population, such a fixation typically follows shortly after the loss of the best class [106,107], unless there are special circumstances. Combining the

effective population size N_e with U_{sdm} , the genomic rate of the origin of slightly deleterious mutations with effect s , allows us to compute T_{cl} , the average effective time between two clicks of Muller's ratchet in generations that are assumed to be discrete. Since computation of this click time is rather difficult, we combine two of the best analytical approximations [9,27,28] with extensive individual-based computer simulations that were distributed over the Internet using evolution@home, the first global computing system for evolutionary biology [7,29-31]. We do not quantify mutational meltdown, because this demographic process at the end of genomic decay is so fast that it can be neglected. Therefore, we approximate T_{ex} , the time to extinction by

$$T_{ex} = C_{mm} * T_{cl} * T_{gen} \quad (2)$$

where T_{gen} is the time between generations that are assumed to be discrete [7]. Extinction times are computed for a large number of parameter combinations that span the whole realistic range of parameters, to assess how many parameter combinations could lead to an extinction by T_{age} , the known age of existence of the asexual lines of descent. Our simplifying assumption here is that no significant mutation accumulation had occurred in the sexual ancestors, since regular recombination would have facilitated the selective removal of all slightly deleterious mutations of critical effects (i.e. effects that could endanger the long-term survival of the Amazon molly in the presence of Muller's ratchet). To account for the distribution of mutational effects we scale the total genomic mutation rate appropriately to obtain U_{sdm} [7] and we estimate N_e from diversity data [108]. This approach is justified in the corresponding sections below.

Mutation rate estimates

Before we can estimate U_{sdm} , we need to estimate U_{tot} , the mutation rate at all potentially deleterious sites in a haploid genome per generation. To do this we focus on synonymous point mutations for estimating the rate per base pair and later extrapolate to potentially harmful sites that change amino acids or affect regulatory functions. We focus on synonymous point mutations for several reasons.

(i) Synonymous mutations are expected to be mostly effectively neutral (or only under weak selection) and therefore their rate of fixation can be predicted from the neutral theory [109] (the rate is slightly lower if there is very weak selection). Thus synonymous substitution rates are probably very close to the true mutation rates of neighbouring non-synonymous sites that accumulate the actual mutational damage.

(ii) We cannot apply observations from microsatellites, since their mutational model is very different from that of normal point mutations and it is not clear, how an estimate of one rate could be converted to a direct estimate of the other rate.

(iii) One might want to ignore chromosome rearrangements and frame-shift mutations like indels or TE insertions, if one wants to obtain a conservative estimate of extinction time. Many of these mutations are so strongly selected against that they have no chance of accumulating in a large population (their selection coefficients are firmly behind the 'wall of background selection', see Figure 1 and [7]). Thus, such drastic mutations are probably only of importance in the context of corrections for polyploidy that were discussed above and if mutation rates are already very high.

In addition to mutation rates in the nuclear genome, one might want to consider mutation rates in the mitochondrial genome, since mitochondria are probably as essential to fish as they are to humans [7].

Distribution of mutational effects

To quantify Muller's ratchet in the presence of a distribution of mutational effects on fitness we partition this distribution in three as suggested elsewhere [7,108]:

(i) Very deleterious mutations are implicitly dealt with by our method of determining N_e , see below.

(ii) Slightly deleterious mutations with effects in the critical range or close to the critical range are the main focus of our attention here, as these contribute most to extinction, see below.

(iii) Effectively neutral mutations that accumulate like neutral mutations are ignored, as their effects are too small for impacting fitness.

In order to quantify Muller's ratchet we need a good estimate of U_{sdm} , the slightly deleterious mutation rate, which is given by

$$U_{sdm} = U_{tot} * f_{sdm} \quad (8)$$

where U_{tot} is the genomic mutation rate at sites that are in a functional category with potentially deleterious effects like non-synonymous mutations, and f_{sdm} is the fraction of sites with slightly deleterious, critical selection coefficients s_c among all potentially deleterious mutations (for more details on this approach, see [7]). The corresponding range of critical selection coefficients approximates all s that lead to extinction within a minimal time or within a given time T_{age} ; this can be determined from Figure 1. To

compute f_{sdm} we need to combine the range of all s_c with estimates of the distribution of mutational effects on fitness, which traditionally have been difficult to obtain. However recent progress has been substantial and we now know that the distribution of non-synonymous mutational effects is very leptokurtic and spans many orders of magnitude in many different species [46,47,110-112].

Effective population size

There are three population sizes that are potentially relevant here:

- (i) total census population size N_V ,
- (ii) effective population size in the absence of any deleterious mutations N_{e0} ,
- (iii) effective population size in the presence of background selection N_{eb} .

Here we argue that $N_e = N_{eb}$ for the purposes of quantifying the rate of Muller's ratchet; this is how we use N_e outside of this section. In order to see this, we need to consider how to approximate the rate of Muller's ratchet in the presence of a wide distribution of mutational effects. New work by Söderberg & Berg [108] has shown that the rate of the ratchet in the presence of such a distribution can be approximated reasonably by dividing mutational effects into different categories (see above). Here we consider the category that contains mutations with very strong effects (see background selection theory [113,114]). Simulations [108] show that the effect of these mutations on the rate of the ratchet is well approximated by using a scaled effective population size N_{e0} that is appropriately reduced by the factor N_{eb}/N_{e0} so that it only contains individuals that are free from strongly deleterious mutations (see equation 7 in [108]). This is consistent with classical Hill-Robertson effect theory, which states that a locus that is linked to another locus under selection will experience a reduction in effective population size [109].

In the absence of deleterious mutations, estimates of $N_e = N_{e0}$ can be made from diversity data and mutation rates, but we cannot estimate N_{e0} in our system, since deleterious mutations are present. Surprisingly, we do not need such an estimate, since background selection theory predicts that any estimate of N_e based on diversity and mutation rates will in reality be an estimate of N_{eb} , the effective size of the class that is free from strongly deleterious mutations [113,114]. This means that two difficulties in our analysis cancel each other out: we do not need to estimate N_{e0} and we do not need to simulate background selection for a population of size N_{e0} to quantify the rate of the ratchet for mutations with critical effects. We only need to

use standard approaches for measuring N_e from DNA sequence diversity; this will approximately give us N_{eb} for our simulations, which then have to ignore all mutations with effects in the background selection range [108]. Thus our analysis uses information from two categories of sites:

- (i) Neutral sites are important for estimating $N_e = N_{eb}$ under background selection, but not for the ratchet itself (ignore when computing U_{sdm}).
- (ii) Selected sites contribute towards operating the ratchet (use for computing U_{sdm}), but cannot be used to estimate N_e .

Since mtDNA and all nuclear chromosomes are completely linked with the same selective unit in the absence of outcrossing, N_e is the same for both systems like in pure selfers [115,116].

Simplifications overview

Here we approximate the effects of Muller's ratchet in a real diploid genome by proposing to choose (i) effective deleterious mutation rates that are adjusted for the corresponding ploidy level and exclude mutations with effects that are either too large to accumulate or too small to cause effective harm and (ii) effective selection coefficients that are adjusted for arbitrary levels of ploidy, dominance and mitotic recombination. The corresponding adjustments are compiled in Table 1 and explained below. Given the large degree of uncertainty about mutation rates and selection coefficients in our study organism, the errors from these approximations seem insignificant. Also, it is not possible to convincingly decide between the "Core-Genome-Model" and the alternative "Equal-Contribution-Model", although the latter seems to be much more realistic (both models are explained below). Therefore all possible options are explored by including a wide range of possible mutation rates and effects.

Extensions for diploids and polyploids

To apply the model above to non-haploid organisms requires some adjustments to account for the fact that duplicate copies of genes can buffer deleterious effects. To avoid the complexity associated with recent models of the evolution of gene duplicates [117-121], we propose two simple models that allow the reduction of polyploids to an effectively haploid genome model: (i) The *Core-Genome-Model* assumes that one functional copy of each essential gene is sufficient and all other alleles can be discarded without problems, so that fitness degradation from Muller's ratchet can only start when the 'backup alleles' have been deactivated. (ii) The *Equal-Contribution-Model* assumes that each allelic copy contributes equally to fitness, so that selection coefficients are reduced and mutation rates are increased proportionally to the ploidy level.

Both models are discussed below for diploid and triploid Amazon molly along with the impact of a variable dominance coefficient h on quantifications of Muller's ratchet.

Core-Genome-Model

One might assume that only one copy of each important gene is really needed and that all additional copies from higher ploidy levels of the genome could be regarded as 'neutral backups' that can be deleted without any negative effect, as long as the last functional copy is still working. An extreme interpretation of this assumption implies that all deleterious mutations are completely recessive (dominance coefficient $h = 0$), which is rather unrealistic in many settings [122-130]. However, in less extreme cases, recessivity may be strong enough to reduce the effects of a complete gene knockout to effective selective neutrality ($N_e sh < 1$). Under the Core-Genome-Model otherwise strongly deleterious mutations like indels or transposable element insertions can disrupt gene function in all additional copies and thus accumulate effectively like neutral mutations. Eventually the core genome will be distributed across all the different haploid copies of the original genome, as it is really only a combination of all the least damaged parts of the genome. Since one frame-shifting mutation is enough to transform a copy of gene i into a pseudogene, we can approximate its time to inactivation, T_{ko} , by

$$T_{ko} \approx 1/(l_i * \mu_{bp} * f_{ko}) \quad (3)$$

where f_{ko} is the factor that specifies the frequency of frame-shift or other knock-out mutations relative to μ_{bp} , the synonymous point mutation rate/basepair/generation, and l_i is the total length of gene i . Let's assume a typical gene has 2,000 base pairs and frame-shifts occur at a rate of $\mu_{bp} * f_{ko} \approx 1 * 10^{-9}$ (probably a lower limit if compared to $\approx 1 * 10^{-8}$ mutations/bp/generation in mice and $f_{ko} \approx 1/3$ as observed in bacteria [see the 'C' parameter in [131,132]]). In this case one may have to wait on average for about 500,000 generations, before inactivation of such a gene can be expected. Since these events most probably follow a Poisson distribution, it can be expected that a substantial fraction of essential genes would be inactivated very quickly, leaving only one copy that is then maintained by selection. It is these last copies that are then slowly degraded by Muller's ratchet, since they can most probably mutate to such slightly deleterious states that allow the operation of the ratchet. Early inactivation of enough 'backup copies' will give Muller's ratchet extensive periods of time for degrading the core genome (late inactivation may allow for slightly deleterious point mutations in the non-deactivated allele). For example, the rates above suggest that frame-shift accumulation in 20,000 diploid genes would inactivate on average about 1,000 genes (sd = 32) over 25,000 generations. A precise calculation of extinction

time in this model would require the integration of the effects of increasing mutation accumulation over time, where the increase is caused by rising deleterious mutation rates due to the progressive inactivation of genes. To avoid these complex calculations, the following two extreme simplifications are proposed.

A lower limit of T_{ex} can be obtained by ignoring all additional copies of the essential core genes. In this case the resulting U_{sam} to use for the computation of click time is that of the haploid core copy of the genome. An upper limit can be obtained by partitioning time into (i) the accumulation of knockouts while ignoring Muller's ratchet and (ii) the operation of Muller's ratchet while neglecting any further increase of mutation rates due to additional knockouts. Testing several possible ratios of these two times allows minimization of extinction time between the extreme of no time for frameshifts (no extinction due to Muller's ratchet, since mutation rates are too low) and all time for frame-shifts (no extinction, because Muller's ratchet will always need some time to cause an extinction, even with high mutation rates).

In the case of triploids or higher ploidy levels, the Core-Genome-Model needs correspondingly longer for genomic decay, but in no case can additional copies stop genomic decay. Higher ploidy levels are not discussed here, since we assume that the first Amazon molly was diploid. Triploids lose their advantage in the Core-Genome-Model, if they occasionally lose one of their three sets of chromosomes, as they might do [49]. The fact that this is possible indicates that the lost set of chromosomes does not carry any last functional copy of a vital gene. For more details on triploids see the Equal-Contribution-Model.

Equal-Contribution-Model

Diploids

Many mutations of small effects do not seem to be completely recessive, but rather close to codominance, especially if their effects are very small [122-130]. If that is approximately true for most genes, then both copies in a diploid genome are actually needed to produce the required dose of proteins to maintain fitness. In this case, all copies of the genome of the Amazon molly will contribute approximately the same amount of functionality, implying that the size of the mutational target increases two-fold, while effective selection coefficients decrease two-fold, relative to the haploid case (there are twice as many sites to hit and selection only operates against heterozygotes with strength sh , where $h = 0.5$).

Triploids

It is not clear whether such reasoning can be extended to triploids, as ancestral genomes may have been fine-tuned

for diploidy. The fact that triploids can have significant disadvantages if compared directly to diploids [133,134] cautions against a positive functional role of the additional copy of the genome. On the other hand, one could argue that the surprising flexibility of fish in tolerating various ploidy levels [133] allows for an easy incorporation of an additional dosage of proteins provided by a third set of chromosomes. This is not contradicted by the fact that Amazon molly triploids can be observed in the wild [23], as strong purifying selection would predict vanishing frequencies, since the rates of origin of triploids are rather low in this fish [23]. Existing data on expression patterns of muscle proteins in Amazon molly triploids are inconclusive [50]. These complications suggest that triploids may face purifying selection and therefore they are not likely to reach 100% in a population. Depending on the specific mechanism of how triploids incur a possible disadvantage, the inactivation of one copy might occasionally even be beneficial for triploids. In addition, triploids may revert back to diploidy by occasionally losing one of their three sets of chromosomes [49]. The fraction of triploids in the wild seems to fluctuate substantially, but no population with 100% triploids has been observed. Frequencies of triploids for two different samples were in the range of 4%–15% (Lamatsch et al., unpublished) and 3% – 46% [135], indicating that selection against triploids is probably weak. Therefore, equal-contribution-corrections to haploid estimates of U_{sdm} (and s if available) have to be treated with caution in the case of triploids, but appear to be reasonable approximations for diploids.

Varying dominance

The two models above assume either complete recessivity or codominance. Observed dominance levels in other species are frequently somewhere in-between, where mutations with smaller effects tend to be closer to codominance [122-130]. While we know very little about the precise values of the dominance coefficient, h , and the selection coefficient, s , in the Amazon molly, it appears to be highly probable that general findings from other species apply here too. Of special interest here is the fact that the distribution of mutational effects on fitness appears to be very wide on a log scale [46,47]. Thus we can propose a simplification that allows for arbitrary dominance coefficients between $h = 0$ and $h = 1$ by making slight adjustments to the effective s used in simulations. The simplification is based on the observation that

- (i) deleterious mutations with smaller effects have a higher probability of accumulating in the population than those with larger effects and
- (ii) mutations with large enough effects do not accumulate (see the 'wall of background selection' in Figure 1 and in [7]).

To simplify the treatment we speak of the ratchet as if it fixes mutations, although strictly speaking the ratchet will only cause the mutation-free class to go extinct and fixing happens shortly after that by genetic drift (see [106,107]). The following qualitative analysis is supported by published simulation results [106].

We can treat *dominant* mutations as follows. If and only if the ratchet can fix the first mutation at a site (i.e. individuals that are homozygous for that site go extinct and all individuals in the population become heterozygous) then it will eventually also fix the second mutation (i.e. all individuals become homozygous for the deleterious allele). If a heterozygote cannot be fixed, there is no way the homozygote state can be fixed and the effective mutation rate used to compute the speed of the ratchet should be reduced accordingly to exclude such sites.

In the case of *recessive* deleterious mutations, there are the two following extremes. If s is small (most mutations), then click times are hardly affected and almost no correction is necessary. If s is large enough to prevent fixation of heterozygotes, then again the effective mutation rate may be reduced, as fixation of the homozygous state is impossible. Only few intermediate s can become heterozygous but not homozygous, as they have to be close to the switch-like transition between 'can accumulate' and 'cannot accumulate' (see the 'wall of background selection' in Figure 1 and [7]) and their homozygous effects have to be too deleterious to accumulate. This simplification relies on the almost switch-like transition between mutation accumulation by Muller's ratchet and complete mutation removal by background selection.

We ignore *overdominant* sites, assuming that these stay in their optimal heterozygous state. This will lead to a conservative estimate of extinction time, as these sites do not contribute to fitness decay under this assumption. Future models will have to investigate to what extent such an approximation is justified in the presence of a small fraction of overdominant sites [129,130].

Extensions for mitotic recombination

Non-meiotic recombination can play a substantial role in reducing diversity in asexual lineages [40]. To assess the extent to which the rate of Muller's ratchet could be reduced by this process [43,44,136], the following approach was used. We assume that the maximal possible rate of mitotic recombination is equivalent to selfing with free recombination between loci. The true reduction of the rate of Muller's ratchet is probably much smaller, since mitotic recombination is certainly not as effective as free recombination in a selfing population. Thus the strongest possible reduction of the rate of Muller's ratchet from mitotic recombination can be estimated from the analyti-

cal work of Heller and Maynard Smith [45]. As explained below, a simple scaling of U and s is enough to reduce predictions to the haploid case.

Muller's ratchet with selfing

Heller and Maynard Smith [45] derived an equation that describes the distribution of deleterious mutations in a selfing population under Muller's ratchet. We assume here that the expectation of the size of the 'best class' in mutation-selection balance mainly determines the rate of Muller's ratchet. This appears to be supported by some simulation results [43,44] although Gordo & Charlesworth [137] found that the ratchet could click at different rates for the same size of the best class if other parameters were different. Our assumption allows us to use a simple scaling of U and s to reduce predictions for diploid selfers to the haploid case.

In detail, Heller and Maynard Smith [45] show that in a selfing population x_{ij} , the fraction of individuals carrying i homozygous and j heterozygous mutations is given by

$$x_{ij} = \frac{1}{i!} \left[\frac{U_{sdm,d}(1-sh)}{2s(1+sh)} \right]^i \cdot \exp \left[-\frac{U_{sdm,d}(1-sh)}{2s(1+sh)} \right] \cdot \frac{1}{j!} \left[\frac{2U_{sdm,d}}{1+sh} \right]^j \cdot \exp \left[-\frac{2U_{sdm,d}}{1+sh} \right], \tag{4}$$

where $U_{sdm,d}$ is the slightly deleterious mutation rate/diploid genome/generation that changes wildtype homozygotes into heterozygotes, h is the dominance coefficient and s is the homozygous selection coefficient (positive for harmful mutations). This equation assumes that (i) recombination is free between sites, so that the ratchet only operates at homozygous sites, since selfing can restore the best class on a heterozygous site, (ii) $U_{sdm,d}$ is constant and independent from the number of mutations per individual, (iii) mutations at heterozygous sites are negligible, since selfing produces many more homozygotes, (iv) the standard model of Muller's ratchet without back mutations is valid [7,104]. Then the number of individuals in the 'best class', N_0 , can be computed by adding up all heterozygotes that are free from homozygous deleterious mutations and then scaling by the effective population size

$$N_0 = N_e \cdot \sum_{j=0}^{\infty} x_{0j} \tag{5}$$

Using the well known result that

$$\sum_{j=0}^{\infty} \left(\frac{x^j}{j!} \right) = \exp(x) \tag{6}$$

equations (4) – (6) yield

$$N_0 = N_e \cdot \exp \left[-\frac{U_{sdm,d}(1-sh)}{2s(1+sh)} \right]. \tag{7}$$

For complete recessivity ($h = 0$) this reduces to the haploid asexual case ($N_0 = N_e \cdot e^{-U_{sdm}/s}$), because the diploid mutation rate $U_{sdm,d}$ equals twice the haploid rate U_{sdm} . It is easy to see from (7) that the degree of dominance of mutations with small selection coefficients does not significantly affect numerical values and hence the rate of the ratchet. Since the ratchet does not click for large s , one might as well neglect dominance altogether.

Parameter estimates

Effective population size

For our simulations we need an estimate of the effective population size in the presence of background selection ($N_e = N_{eb}$, see above). To arrive at such an estimate we obtain corresponding diversity data from the control region of mtDNA, since it is linked to the rest of the genome by unisexual inheritance (see the Models section above for a justification of this approach). We use the DNA sequence diversity data from Möller (see pp. 46, 47 and 55 in [12]), who observed 14 haplotypes with $S = 13$ sites segregating for single base pair polymorphisms in a total of $n = 63$ sequences of length $L = 886$ bp from 17 geographic locations. Since the control region of mtDNA is likely to evolve neutrally at most sites, we can use Waterson's [138] equation to compute $N_e = S/(L * \mu_{bp} * a)$, where N_e is the effective population size of mitochondrial DNA in the presence of background selection, μ_{bp} is the mutation rate per site/generation and $a = 1 + 1/2 + 1/3 + \dots + 1/(n-1)$ for n sequences in the sample. Here we assume an mtDNA divergence rate of $3.6\% \pm 0.46\%$ /site/Myr as estimated in the species groups of the fish *Centropomus* [139] from divergence since the Panama seaway closed 3.0–3.5 Myr ago [140]. This suggests a value for N_e between 153,000 and 198,000 that will have to be scaled downward, if actual mutation rates are higher, like in human pedigrees [141]. The nuclear value is identical to this mtDNA estimate, if there is no outcrossing [115,116].

Comparative analyses suggest that the resulting values are reasonable. The total population size N_t may be used to place upper bounds on N_e in most situations. Some mark and recapture experiments could only estimate that $N_t > 10,000$ in that local study area (M. Doebler, personal communication). One may speculate that about 10 million individuals of *P. formosa* may exist in total. If this is combined with the typical finding that vertebrates frequently have N_e -values that are about 10% of their census population sizes [142], then N_e would be about a million. Given that a species as abundant as the fruitfly *Drosophila*

melanogaster has effective population sizes of little more than a million [143], suggests that the Amazon molly probably has $N_e < 10^6$. On the other extreme it is highly unlikely that the Amazon molly would have an effective population size smaller than that of primates, suggesting $N_e > 10^4$.

We use deliberately wide upper and lower bounds of $N_e = 10^4$ to 10^7 to demonstrate that population size has a rather small influence on the operation of Muller's ratchet in the presence of a distribution of mutational effects.

Life history

Based on observations we estimate that generation time T_{gen} is between 4 month (min) and 2.5 years (max), so we assume 1 year as our middle value. The maximal reproductive capacity in the wild with a non-degraded genome R_{max} is assumed to be 50 (min) 500 (mid) and 2000 (max) offspring per lifetime (see below). While T_{gen} scales extinction times linearly, R_{max} has a much smaller effect. It is possible that our values for R_{max} are too large since they are more based on the highest possible values conceivable under laboratory conditions than on any real life survival situation. Once such data are available, results from Figure 1 can be easily scaled appropriately (see equation 2).

Unfortunately there is very little information about life history from natural habitats. Most of the knowledge about *P. formosa* comes from extensive aquarium cultures. In captivity the Amazon molly reaches maturity between 4 and 6 months, produces more offspring at larger body sizes and may live for up to 3 years under optimal laboratory conditions. Here we report that females caught in the wild contain a mean of 28 embryos (sd ± 16 ; $n = 20$; observed maximum in the wild = 70 embryos, slightly less than the maximum of 90 observed in the lab [144]). Females will probably produce this number of newborn fish about every 28 days, depending on water temperature. They stop reproduction about 3 to 6 months before death in the lab. The number of surviving newborn fish can be reduced considerably by predation or disease. Thus under good conditions R_{max} might be 18 periods * 28 offspring = 504, assuming a life span of 2 years. As a lower limit one might use 50 offspring per lifetime, assuming that many offspring die due to predation or disease and many parents are small and frequently trapped in little ponds without sister species that provide the sperm that they need as a trigger for development. An upper limit of $R_{max} = 2,030$ might be derived from combining the maximal number of offspring-producing periods observed in the lab (29 = 36-4-3) with the maximal number of embryos per period observed in the wild (70 in $n = 20$, the upper expectation for a fish of this size [10]). We did not find that the sexual sister species, *P. mexicana limantouri*

differs significantly from these values (observed mean = 27 embryos \pm sd = 13; $n = 11$).

Age of the evolutionary line

The ancestor of the Amazon molly clone known to us was formed by a hybridisation event between a *Poecilia mexicana* female and a *Poecilia latipinna* male [11,12] and is believed to have reproduced asexually since then. A date T_{age} for this event may be derived from comparing alleles in the Amazon molly with alleles in their corresponding parent species using a molecular clock. At the moment there are two datasets that are large enough to infer an evolutionary age that is different from zero. Comparisons of 1,377 bp in various nuclear genes (mostly introns) lead to a point estimate of $T_{age} = 100,000$ years assuming a divergence rate of 2%/Myr from standard mitochondrial clocks [11]. This age may be an underestimate, since nuclear mutation rates are usually much lower than mitochondrial rates. However, the confidence intervals for this estimate range from $T_{age} = 8,930$ to $T_{age} = 209,000$ years due to the small number of substitutions observed [69,70]. Thus it is desirable to arrive at a more precise estimate. This can be done using the same set of mtDNA diversity data that was used to estimate N_e above [12]. Analyses of the median joining network show that there is only one mtDNA haplotype that is shared between *P. formosa* and *P. mexicana* and that this haplotype is at the center of *P. formosa* diversity (p.49 in [12]). Thus it is reasonable to assume that this haplotype was the most recent common ancestor (MRCA) of all Amazon mollies and one can use the number of mutational steps back to the MRCA as an indicator of the time since divergence of Amazon mollies from their MRCA. Using the method described by Saillard et al. [145] and the data of Möller [see p.69 [12]] leads to an estimate of 1.294 (\pm sd = 0.159) mutational steps back to the MRCA in the 886 bp of the control region of mtDNA that were sequenced for this purpose. If this is combined with the divergence rate of $3.6\% \pm 0.46\%/site/Myr$ as estimated in the species groups of the fish *Centropomus* [139] from divergence since the Panama seaway closed 3.0–3.5 Myr ago [140], then we arrive at an estimate of $T_{age} = 81,000$ years for the time to the MRCA of *P. formosa* ($1.294/(886 * 3.6 * 10^{-8}/2)$; lower and upper limits range from 63,000 to 104,000 years). This time will have to be scaled downward, if actual mutation rates are higher, as has been found in human pedigrees [141]. Thus we have marked $T_{age} = 40$ Kyr, 70 Kyr and 100 Kyr as estimates of the age of the Amazon molly in Figure 1. It is easy to check our conclusions, if more precise information becomes available. A more rigorous analysis involving multiple genes from multiple individuals from each species would be desirable [see [146]].

Mutation rate estimates

The last decades have seen a large increase of our understanding of mutation rates across a wide range of organisms [132,147,148] and we have no reason to assume that the Amazon molly might have extraordinarily low mutation rates. Thus it is possible in the absence of more specific data to extrapolate from other species to arrive at a credible estimate for the Amazon molly specific mutation rate at all potentially deleterious sites in a haploid genome per generation, U_{tot} .

The size of a haploid genome is about 950 Mbp, as derived from DNA content of cells [149]. If this is combined with the mutation rate counterpart of the divergence rate that was used to date the age of Amazon molly [11], then about 9.5 new mutations per haploid genome can be expected in each new generation (950 Mbp * 0.01 subst/bp/Myr assuming $T_{gen} = 1$ year). Since many of these mutations will be synonymous or affect only non-functional DNA, we have to scale this rate by the effective genome size [132]. Fish are presumably more complex than flies. Therefore, we may use the effective genome size of *Drosophila melanogaster* as a lower limit (13,379 genes with 54,934 exons and a total length of 27.8 Mbp in exons [150] suggest about 19 Mbp as the target size for non-synonymous, non-frameshifting mutations). This is just 2% of the actual genome size and has to be increased to about 8% to account for non-coding functional sequences that seem to be about three times as abundant as functional sequences in exons in organisms as diverse as fruitflies and mice [151,152]. This would result in $U_{tot} \approx 0.74$ potentially deleterious mutations/haploid genome/generation and may be an underestimate, as the amount of coding DNA in fish might be higher than in *Drosophila*. If a similar calculation is based on the 33 Mbp exons that we can estimate from the Fugu genome project, then $U_{tot} \approx 0.88$ seems plausible (all genes occupy 108 Mbp and we estimate that this includes roughly 75 Mbp introns from Figure 2 in [153]).

These estimates do not change much, even if we use a completely different way of obtaining the mutation rate. Observations in mice have led to estimates of 1.8×10^{-10} /site/cell replication, respectively [132]. If an estimated 88 Mbp functional sites in *P. formosa* experience about 25 germ line cell divisions per adult generation (as female mice [132] that have a similar body weight to the Amazon molly) then we arrive at $U_{tot} \approx 0.4$ potentially deleterious mutations/haploid genome/generation. Obviously, *P. formosa* is not a mouse and there is much room for improving the precision of such mutation rate estimates, even in mice. Recent high-precision measurements of the deleterious mutation rate in mutation accumulation experiments in *Drosophila* found $U_{tot} \approx 0.6$ deleterious mutations/haploid genome/generation [154]. Scaling this estimate by

the relative effective genome size of Fugu suggests $U_{tot} \approx 0.7$.

It is encouraging to find such general agreement between these estimates that are based on very different approaches. This suggests that we can have some confidence in our estimates, even in the absence of direct observations in the Amazon molly. Since mutations are the inevitable consequence of DNA replication errors and the number of mitotic cell divisions per generation is a key determinant of mutation rates per generation [132,155], we conclude that the absence of recombination in the Amazon molly is unlikely to cause a major change in mutation rate when compared to its sexual sister species.

Distribution of mutational effects

Recent progress has shown that the distribution of non-synonymous mutational effects is very leptokurtic and spans many orders of magnitude in many different species [46,47,110-112]. While we have no specific data for the Amazon molly, we have no reason to believe that this result does not hold here as well. One can use data on the ratio of non-synonymous to synonymous substitution rates, K_A/K_S , to infer that the fraction $1-K_A/K_S$ of all mutations must be more deleterious than about $s = 1/N_e$, since mutations with effects below that threshold accumulate as if they were neutral [47,156]. If the data in *Drosophila* can be used as a landmark in this new territory, then about 90% of all mutations are more deleterious than the limit of $1/N_e \approx 10^{-6}$ [112]. Estimates of the distribution of mutational effects in *Drosophila* have shown that this distribution may well follow a lognormal law and there may be good theoretical reasons for this [46]. Robust features are its large width on a logscale and the fact that most probability mass is between effective neutrality and lethality [46,47]. From this and from Figure 1 we may infer that the fraction of slightly deleterious mutations, f_{sdm} , could be perhaps around 30%, probably larger than 10%, but probably not much larger than 50%. We use these values as a point estimate with lower and upper bound. Thus U_{sdm} probably shares the same order of magnitude with U_{tot} . As this calculation has large errors, an array of other mutation rates is included as well when quantifying the ratchet. We assume that selection coefficients did not change much for most genes in the time since asexuality arose in the Amazon molly. This is compatible with the assumption that most genes in the Amazon molly are generic to similar fish species and thus well adapted, while only a small fraction is actually responsible for the specific adaptations of the Amazon molly.

Deleterious mutation rates summary

As discussed above, our best estimate for the total mutation rate at potentially deleterious sites per haploid genome per generation is expected to be between $U_{tot} \approx 0.4$

and $U_{tot} \approx 0.9$, while our best estimate of the fraction of mutations with critical slightly deleterious effects is expected to be between $f_{sdm} \approx 10\%$ and $f_{sdm} \approx 50\%$. Combining these values makes us expect $U_{sdm} \approx 0.2$ slightly deleterious mutations with critical effects/haploid genome/generation with a lower limit of $U_{sdm} \approx 0.04$ and an upper limit of $U_{sdm} \approx 0.45$. These values may have to be doubled, depending on the genome model that is used for accounting for the effects of diploidy. To err on the side of caution and provide a better feeling for the effects of mutation rates we plot values from $U_{sdm} = 0.01$ to $U_{sdm} = 1$ in Figure 1.

Authors' contributions

LL conceived the study, wrote the software, managed the computation of simulation results, developed the theoretical aspects of the paper, estimated many parameters, analyzed the results and wrote the manuscript. DKL provided most details on the Amazon molly biology, contributed to parameter estimation and helped writing the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Special thanks go to the more than 300 participants of evolution@home (especially to David Corbett, Rechenkraft.net and Seth A. Keel) for more than 80 years of CPU-time that are the basis of this analysis. We thank Kathrin Lampert and Ute Hornung for help in the field and Manfred Schartl, Brian Charlesworth and Asher Cutter for fruitful discussions and helpful comments on the manuscript. We also thank four anonymous reviewers for their feedback. Financial support came from the Leverhulme Trust, the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 567 "Mechanismen der interspezifischen Interaktion von Organismen") and EU Marie Curie Research Training Network 'SexAsex' (MCRN-CT-2004-512492).

References

- Butlin R: **Opinion – evolution of sex: The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineages.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**:311-317.
- Martens K, Schon I: **Parasites, predators and the Red Queen.** *Trends Ecol Evol* 2000, **15**:392-393.
- Maynard Smith J: **The evolution of sex.** New York: Cambridge University Press; 1978.
- Judson OP, Normark BB: **Ancient asexual scandals.** *Trends Ecol Evol* 1996, **11**:41-46.
- West SA, Lively CM, Read AF: **A pluralist approach to sex and recombination.** *J Evol Biol* 1999, **12**:1003-1012.
- Howard RS, Lively CM: **Parasitism, mutation accumulation and the maintenance of sex.** *Nature* 1994, **367**:554-557.
- Loewe L: **Quantifying the genomic decay paradox due to Muller's ratchet in human mitochondrial DNA.** *Genet Res* 2006, **87**:133-159.
- Kondrashov AS: **Classification of hypotheses on the advantage of amphimixis.** *J Hered* 1993, **84**:372-387.
- Stephan W, Kim Y: **Recent applications of diffusion theory to population genetics.** In *Modern developments in theoretical population genetics* Edited by: Slatkin M, Veuille M. Oxford: Oxford University Press; 2002:72-93.
- Hubbs CL, Hubbs LC: **Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin.** *Science* 1932, **76**:728-630.
- Schartl M, Wilde B, Schlupp I, Parzefall J: **Evolutionary origin of a parthenoform, the Amazon molly *Poecilia formosa*, on the basis of a molecular genealogy.** *Evolution* 1995, **49**:827-835.
- Möller D: **Aspekte zur Populationsgenetik des eingeschlechtlichen Amazonenkärpflings *Poecilia formosa* (GIRARD 1859) unter Berücksichtigung der genetischen parentalen**
- Arten, dem Breitflossenkärpfling *Poecilia latipinna* (LESUEUR 1821) und dem Atlantikkärpfling *Poecilia mexicana* (STEINDACHNER 1863). Hamburg, Germany: University of Hamburg; 2001.
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmid M, Parzefall J: **Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish.** *Nature* 1995, **373**:68-71.
- Schlupp I, Parzefall J, Schartl M: **Biogeography of the Amazon molly, *Poecilia formosa*.** *J Biogeogr* 2002, **29**:1-6.
- Lampert KP, Lamatsch DK, Epplen JT, Schartl M: **Evidence for a monophyletic origin of triploid clones of the Amazon molly, *Poecilia formosa*.** *Evolution* 2005, **59**:881-889.
- Maruyama T: **On fixation probability of mutant genes in a subdivided population.** *Genet Res* 1970, **15**:221-225.
- Maruyama T: **Simple proof that certain quantities are independent of geographical structure of population.** *Theor Popul Biol* 1974, **5**:148-154.
- Whitlock MC, Barton NH: **The effective size of a subdivided population.** *Genetics* 1997, **146**:427-441.
- Whitlock MC: **Fixation probability and time in subdivided populations.** *Genetics* 2003, **164**:767-779.
- Hubbs CL: **Interactions between bisexual fish species and its gynogenetic sexual parasite.** *Bull Tex Mem Mus* 1964, **8**:1-72.
- Schlupp I, et al.: **Dispensable and indispensable genes in an ameiotic fish, the Amazon molly *Poecilia formosa*.** *Cytogenet Cell Genet* 1998, **80**:193-198.
- Stöck M, Lamatsch DK: **Triploide Wirbeltiere: Wege aus der Unfruchtbarkeit oder Eingeschlechtigkeit.** *Naturw Rdsch* 2002, **55**:349-358.
- Schories S, Lampert KP, Lamatsch DK, de Leon FJ, Schartl M: **Analysis of a possible independent origin of triploid *P. formosa* outside of the Rio Purificación river system.** *Front Zool* 2007, **4**:13.
- Lamatsch DK, Nanda I, Schlupp I, Epplen JT, Schmid M, Schartl M: **Distribution and stability of supernumerary microchromosomes in natural populations of the Amazon molly, *Poecilia formosa*.** *Cytogenet Genome Res* 2004, **106**:189-194.
- Nanda I, Schlupp I, Lamatsch D, Lampert K, Schmid M, Schartl M: **Stable inheritance of host species-derived microchromosomes in the gynogenetic fish *Poecilia formosa*.** *Genetics* 2007, **177**:917-926.
- Rasch EM, Monaco PJ, Balsano JS: **Cytophotometric and autoradiographic evidence for functional apomixis in a gynogenetic fish, *Poecilia formosa* and its related, triploid unisexuals.** *Histochemistry* 1982, **73**:515-533.
- Gessler DDG: **The constraints of finite size in asexual populations and the rate of the ratchet.** *Genet Res* 1995, **66**:241-253.
- Stephan W, Chao L, Smale JG: **The advance of Muller's ratchet in a haploid asexual population: Approximate solutions based on diffusion theory.** *Genet Res* 1993, **61**:225-231.
- Loewe L: **evolution@home: Experiences with work units that span more than 7 orders of magnitude in computational complexity.** *Proceedings of the 2nd IEEE/ACM International Symposium on Cluster Computing and the Grid (CCGrid2002)* 2002:425-431 [<http://archive.evolution.ws/pdf/loewe-l/Loewe2002-EaHworkunits.pdf>]. Berlin, Germany: IEEE Computer Society
- Loewe L: **Evolution@home: observations on participant choice, work unit variation and low-effort global computing.** *Softw Pract Exper* 2007, **37**:1289-1318.
- Loewe L: **The evolution@home website.** 2008 [<http://evolution.ary-research.net>].
- Sola L, Galetti PM, Monaco PJ, Rasch EM: **Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. 6. Additional nucleolus organizer region chromosomal clones of *Poecilia formosa* (Amazon molly) from Texas, with a survey of chromosomal clones detected in the Amazon molly.** *Heredity* 1997, **78**:612-619.
- Stern C: **Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*.** *Genetics* 1936, **21**:625-730.
- Ashburner M: ***Drosophila: A laboratory handbook.*** Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- Prado F, Cortes-Ledesma F, Huertas P, Aguilera A: **Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Curr Genet* 2003, **42**:185-198.
- Aguilera A, Chavez S, Malagon F: **Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence.** *Yeast* 2000, **16**:731-754.

37. Barbera MA, Petes TD: **Selection and analysis of spontaneous reciprocal mitotic cross-overs in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:12819-12824.
38. Shao C, Stambrook PJ, Tischfield JA: **Mitotic recombination is suppressed by chromosomal divergence in hybrids of distantly related mouse strains.** *Nat Genet* 2001, **28**:169-172.
39. Holt D, Dreimanis M, Pfeiffer M, Firgaira F, Morley A, Turner D: **Interindividual variation in mitotic recombination.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**:1423-1427.
40. Omilian AR, Cristescu ME, Dudycha JL, Lynch M: **Ameiotic recombination in asexual lineages of *Daphnia*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:18638-18643.
41. Holliday R: **Recombination and meiosis.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1977, **277**:359-370.
42. Helleday T: **Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells.** *Mutat Res* 2003, **532**:103-115.
43. Antezana MA, Hudson RR: **Before crossing over: The advantages of eukaryotic sex in genomes lacking chiasmatic recombination.** *Genet Res* 1997, **70**:7-25.
44. Charlesworth D, Morgan MT, Charlesworth B: **Mutation accumulation in finite outbreeding and inbreeding populations.** *Genet Res* 1993, **61**:39-56.
45. Heller R, Maynard Smith J: **Does Muller's ratchet work with selfing?** *Genet Res* 1978, **32**:289-293.
46. Loewe L, Charlesworth B: **Inferring the distribution of mutational effects on fitness in *Drosophila*.** *Biol Lett* 2006, **2**:426-430.
47. Eyre-Walker A, Keightley PD: **The distribution of fitness effects of new mutations.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**:610-618.
48. Beukeboom LW, Vrijenhoek RC: **Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis.** *J Evol Biol* 1998, **11**:755-782.
49. Lamatsch DK, Schmid M, Schartl M: **A somatic mosaic of the gynogenetic Amazon molly.** *J Fish Biol* 2002, **60**:1417-1422.
50. Monaco PJ, Rasch EM, Balsano JS, Turner BJ: **Muscle protein phenotypes and the probable evolutionary origin of a unisexual fish, *Poecilia formosa*, and its triploid derivatives.** *J Exp Zool* 1982, **221**:265-274.
51. Monaco P, Rasch E, Balsano J: **Apomictic reproduction in the Amazon molly, *Poecilia formosa* and its triploid hybrids.** In *Evolutionary Genetics of Fishes* Edited by: Turner BJ. New York: Plenum Press; 1984:311-318.
52. Beukeboom LW, van Batenburg FHD: **The effect of paternal leakage on the rate of Muller's ratchet.** *7th Conference of the European Society for Evolutionary Biology: 1999; Barcelona, Spain 1999.* *handout for poster.*
53. Beukeboom LW, Weinzierl RP, Michiels NK: **Amazon molly and Muller's ratchet.** *Nature* 1995, **375**:111-112.
54. Crow JF: **The high spontaneous mutation rate: Is it a health risk?** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:8380-8386.
55. Kondrashov AS: **Muller's Ratchet under epistatic selection.** *Genetics* 1994, **136**:1469-1473.
56. Butcher D: **Muller's ratchet, epistasis and mutation effects.** *Genetics* 1995, **141**:431-437.
57. Poon A, Otto SP: **Compensating for our load of mutations: Freezing the meltdown of small populations.** *Evolution* 2000, **54**:1467-1479.
58. Bachtrog D, Gordo I: **Adaptive evolution of asexual populations under Muller's ratchet.** *Evolution* 2004, **58**:1403-1413.
59. Schultz ST, Lynch M: **Mutation and extinction: The role of variable mutational effects, synergistic epistasis, beneficial mutations, and the degree of outcrossing.** *Evolution* 1997, **51**:1363-1371.
60. Eyre-Walker A: **The genomic rate of adaptive evolution.** *Trends Ecol Evol* 2006, **21**:569-575.
61. Silander OK, Tenaillon O, Chao L: **Understanding the evolutionary fate of finite populations: the dynamics of mutational effects.** *PLoS Biol* 2007, **5**:e94.
62. Plath M: **Cave molly females (*Poecilia mexicana*) avoid parasitised males.** *Acta Ethol* 2004, **6**:47-51.
63. Tobler M, Plath M, Burmeister H, Schlupp I: **Black spots and female association preferences in a sexual/asexual mating complex (*Poecilia*, *Poeciliidae*, *Teleostei*).** *Behav Ecol Sociobiol* 2006, **60**:159-165.
64. Jaenike J: **An hypothesis to account for the maintenance of sex within populations.** *Evolutionary Theory* 1978, **3**:191-194.
65. Sasaki A, Hamilton WD, Ubeda F: **Clone mixtures and a pace-maker: new facets of Red-Queen theory and ecology.** *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 2002, **269**:761-772.
66. Meirmans S, Neiman M: **Methodologies for testing a pluralist idea for the maintenance of sex.** *Biol J Linn Soc* 2006, **89**:605-613.
67. Lively CM, Craddock C, Vrijenhoek RC: **Red Queen hypothesis supported by parasitism in sexual and clonal fish.** *Nature* 1990, **344**:864-866.
68. Tobler M, Schlupp I: **Parasites in sexual and asexual mollies (*Poecilia*, *Poeciliidae*, *Teleostei*): a case for the Red Queen?** *Biol Lett* 2005, **1**:166-168.
69. Dries LA: **The evolutionary persistence of the gynogenetic Amazon molly, *Poecilia formosa*.** Austin, Texas: University of Texas; 2000.
70. Dries LA: **Peering through the looking glass at a sexual parasite: Are Amazon mollies red queens?** *Evolution* 2003, **57**:1387-1396.
71. Lampert KP, Lamatsch DK, Fischer P, Epplen JT, Nanda I, Schmid M, Schartl M: **Automictic reproduction in interspecific hybrids of poeciliid fish.** *Curr Biol* 2007, **17**:1948-1953.
72. Schlupp I: **The evolutionary ecology of gynogenesis.** *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 2005, **36**:399-417.
73. Vrijenhoek RC: **Unisexual Fish - Model Systems for Studying Ecology and Evolution.** *Annu Rev Ecol Syst* 1994, **25**:71-96.
74. Vrijenhoek RC: **The origin and evolution of clones versus the maintenance of sex in *Poeciliopsis*.** *J Hered* 1993, **84**:388-395.
75. Schoen DJ, Brownstein JS, White PA: **Mutation load in natural populations of the sensitive fern *Onclea sensibilis* exposed to soil mutagens.** *Ecol Applic* 2002, **12**:124-137.
76. Klekowski EJ: **Mutational load in a fern population growing in a polluted environment.** *Am J Bot* 1976, **63**:1024-1030.
77. Klekowski EJ, Klekowski E: **Mutation in ferns growing in an environment contaminated with polychlorinated-biphenyls.** *Am J Bot* 1982, **69**:721-727.
78. Majer BJ, Grummt T, Uhl M, Knasmuller S: **Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment.** *Acta Hydrochim Hydrobiol* 2005, **33**:45-55.
79. Bell G: **The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality.** Berkeley: University of California Press; 1982.
80. Martens K, Rossetti G, Horne DJ: **How ancient are ancient asexuals?** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2003, **270**:723-729.
81. Leslie JF, Vrijenhoek RC: **Consideration of Muller's ratchet mechanism through studies of genetic-linkage and genomic compatibilities in clonally reproducing *Poeciliopsis*.** *Evolution* 1980, **34**:1105-1115.
82. Spolsky CM, Phillips CA, Uzzell T: **Antiquity of clonal salamander lineages revealed by mitochondrial DNA.** *Nature* 1992, **356**:706-708.
83. Hedges SB, Bogart JP, Maxson LR: **Ancestry of unisexual salamanders.** *Nature* 1992, **356**:708-710.
84. Robertson AV, Ramsden C, Niedzwiecki J, Fu J, Bogart JP: **An unexpected recent ancestor of unisexual *Ambystoma*.** *Mol Ecol* 2006, **15**:3339-3351.
85. Guex GD, Hotz H, Semlitsch RD: **Deleterious alleles and differential viability in progeny of natural hemiclinal frogs.** *Evolution* 2002, **56**:1036-1044.
86. Som C, Bagheri HC, Reyer HU: **Mutation accumulation and fitness effects in hybridogenetic populations: a comparison to sexual and asexual systems.** *BMC Evol Biol* 2007, **7**:80.
87. Som C, Reyer HU: **Hemiclinal reproduction slows down the speed of Muller's ratchet in the hybridogenetic frog *Rana esculenta*.** *J Evol Biol* 2007, **20**:650-660.
88. Vorburger C: **Fixation of deleterious mutations in clonal lineages: evidence from hybridogenetic frogs.** *Evolution* 2001, **55**:2319-2332.
89. Klekowski EJ: **Plant clonality, mutation, diploic selection and mutational meltdown.** *Biol J Linn Soc* 2003, **79**:61-67.
90. Smith RJ, Kamiya T, Horne DJ: **Living males of the 'ancient asexual' Darwinulidae (*Ostracoda*: *Crustacea*).** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2006, **273**:1569-1578.
91. Martens K: **Sex and ostracods: a new synthesis.** In *Sex and parthenogenesis: Evolutionary ecology of reproductive modes in non-marine ostracods* Edited by: Martens K. Leiden, Netherlands: Backhuys Publishers; 1998:295-321.

92. Butlin R, Schön I, Martens K: **Asexual reproduction in non-marine ostracods.** *Heredity* 1998, **81**:473-480.
93. Welch DM, Meselson M: **Evidence for the evolution of Bdelloid Rotifers without sexual reproduction or genetic exchange.** *Science* 2000, **288**:1211-1215.
94. Judson OP, Normark BB: **Evolutionary genetics. Sinless originals.** *Science* 2000, **288**:1185-1186.
95. Butlin RK: **Virgin rotifers.** *Trends Ecol Evol* 2000, **15**:389-390.
96. Dolgin ES, Charlesworth B: **The fate of transposable elements in asexual populations.** *Genetics* 2006, **174**:817-827.
97. Arkhipova I, Meselson M: **Deleterious transposable elements and the extinction of asexuals.** *Bioessays* 2005, **27**:76-85.
98. Pouchkina-Stantcheva NN, McGee BM, Boschetti C, Tolleter D, Chakrabortee S, Popova AV, Meersman F, Macherel D, Hincha DK, Tunnacliffe A: **Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate.** *Science* 2007, **318**:268-271.
99. Meselson M, Welch DM: **Evolution. Stable heterozygosity?** *Science* 2007, **318**:202-203.
100. Maraun M, Heethoff M, Scheu S, Norton RA, Weigmann G, Thomas RH: **Radiation in sexual and parthenogenetic oribatid mites (*Oribatida*, *Acari*) as indicated by genetic divergence of closely related species.** *Experimental and Applied Acarology* 2003, **29**:265-277.
101. Maraun M, Heethoff M, Schneider K, Scheu S, Weigmann G, Cianciolo J, Thomas RH, Norton RA: **Molecular phylogeny of oribatid mites (*Oribatida*, *Acari*): evidence for multiple radiations of parthenogenetic lineages.** *Experimental and Applied Acarology* 2004, **33**:183-201.
102. Heethoff M, Domes K, Laumann M, Maraun M, Norton RA, Scheu S: **High genetic divergences indicate ancient separation of parthenogenetic lineages of the oribatid mite *Platynothrus pel-tifer* (*Acari*, *Oribatida*).** *J Evol Biol* 2007, **20**:392-402.
103. Loewe L: **How to quantify effects of Muller's ratchet.** 2008 [<http://evolutionary-research.net/science/mullers-ratchet/>].
104. Haigh J: **The accumulation of deleterious genes in a population – Muller's ratchet.** *Theor Popul Biol* 1978, **14**:251-267.
105. Lynch M, Butcher RBD, Gabriel WV: **The mutational meltdown in asexual populations.** *J Hered* 1993, **84**:339-344.
106. Charlesworth B, Charlesworth D: **Rapid fixation of deleterious alleles can be caused by Muller's ratchet.** *Genet Res* 1997, **70**:63-73.
107. Higgs PG, Woodcock G: **The accumulation of mutations in asexual populations and the structure of genealogical trees in the presence of selection.** *J Math Biol* 1995, **33**:677-702.
108. Söderberg RJ, Berg OG: **Mutational interference and the progression of Muller's ratchet when mutations have a broad range of effects.** *Genetics* 2007, **177**:971-986.
109. Birky CW Jr, Walsh JB: **Effects of linkage on rates of molecular evolution.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, **85**:6414-6418.
110. Eyre-Walker A, Woolfit M, Phelps T: **The distribution of fitness effects of new deleterious amino acid mutations in humans.** *Genetics* 2006, **173**:891-900.
111. Piganeau G, Eyre-Walker A: **Estimating the distribution of fitness effects from DNA sequence data: Implications for the molecular clock.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:10335-10340.
112. Loewe L, Charlesworth B, Bartolomé C, Noël V: **Estimating selection on non-synonymous mutations.** *Genetics* 2006, **172**:1079-1092.
113. Charlesworth D, Charlesworth B, Morgan MT: **The pattern of neutral molecular variation under the background selection model.** *Genetics* 1995, **141**:1619-1632.
114. Charlesworth B, Morgan MT, Charlesworth D: **The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation.** *Genetics* 1993, **134**:1289-1303.
115. Pollak E: **On the theory of partially inbreeding finite populations. I. Partial selfing.** *Genetics* 1987, **117**:353-360.
116. Nordborg M, Donnelly P: **The coalescent process with selfing.** *Genetics* 1997, **146**:1185-1195.
117. Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J: **Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations.** *Genetics* 1999, **151**:1531-1545.
118. Lynch M, O'Hely M, Walsh B, Force A: **The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate.** *Genetics* 2001, **159**:1789-1804.
119. Lynch M, Katju V: **The altered evolutionary trajectories of gene duplicates.** *Trends Genet* 2004, **20**:544-549.
120. Lynch M, Force A: **The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization.** *Genetics* 2000, **154**:459-473.
121. Lynch M: **The origins of genome architecture.** Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 2007.
122. Greenberg R, Crow JF: **A Comparison of the Effect of Lethal and Detrimental Chromosomes from *Drosophila* Populations.** *Genetics* 1960, **45**:1153-1168.
123. Gillespie JH: **The heterozygous effects of alleles.** In *Population genetics: A concise guide* Edited by: Gillespie JH. Baltimore, Maryland: John Hopkins University Press; 1998:62-71.
124. Simmons MJ, Crow JF: **Mutations affecting fitness in *Drosophila* populations.** *Annu Rev Genet* 1977, **11**:49-78.
125. Higgins K, Lynch M: **Metapopulation extinction caused by mutation accumulation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:2928-2933.
126. Johnston MO, Schoen DJ: **Mutation rates and dominance levels of genes affecting total fitness in two angiosperm species.** *Science* 1995, **267**:226-229.
127. Willis JH: **Inbreeding load, average dominance and the mutation rate for mildly deleterious alleles in *Mimulus guttatus*.** *Genetics* 1999, **153**:1885-1898.
128. Charlesworth B, Hughes KA: **The maintenance of genetic variation in life-history traits.** In *Evolutionary genetics: from molecules to morphology* Edited by: Singh RS, Krimbas CB. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press; 2000:369-392.
129. Fry JD: **How common are overdominant mutations?** *Genetics* 2004, **167**:1031-1032.
130. Peters AD, Halligan DL, Whitlock MC, Keightley PD: **Dominance and overdominance of mildly deleterious induced mutations for fitness traits in *Caenorhabditis elegans*.** *Genetics* 2003, **165**:589-599.
131. Drake JW: **A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88**:7160-7164.
132. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF: **Rates of spontaneous mutation.** *Genetics* 1998, **148**:1667-1686.
133. Pandian TJ, Koteeswaran R: **Ploidy induction and sex control in fish.** *Hydrobiologia* 1998, **384**:167-243.
134. Comai L: **The advantages and disadvantages of being polyploid.** *Nat Rev Genet* 2005, **6**:836-846.
135. Balsano JS, Rasch EM, Monaco PJ: **The evolutionary ecology of *Poecilia formosa* and its triploid associate.** In *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)* Edited by: Meffe GK, Snelson FF. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall; 1989.
136. Pamilo P, Nei M, Li WH: **Accumulation of mutations in sexual and asexual populations.** *Genet Res* 1987, **49**:135-146.
137. Gordo I, Charlesworth B: **The degeneration of asexual haploid populations and the speed of Muller's ratchet.** *Genetics* 2000, **154**:1379-1387.
138. Watterson GA: **On the number of segregating sites in genetical models without recombination.** *Theor Popul Biol* 1975, **7**:256-276.
139. Donaldson KA, Wilson RR Jr: **Amphi-panamic geminates of snook (*Percoidei: Centropomidae*) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes.** *Mol Phylogenet Evol* 1999, **13**:208-213.
140. Knowlton N, Weigt LA, Solorzano LA, Mills DK, Birmingham E: **Divergence in proteins, mitochondrial-DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama.** *Science* 1993, **260**:1629-1632.
141. Howell N, Smejkal CB, Mackey DA, Chinnery PF, Turnbull DM, Herndon C: **The pedigree rate of sequence divergence in the human mitochondrial genome: there is a difference between phylogenetic and pedigree rates.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**:659-670.
142. Frankham R: **Effective population size/adult population size ratios in wildlife – a review.** *Genet Res* 1995, **66**:95-107.
143. McVean GAT, Vieira J: **Inferring parameters of mutation, selection and demography from patterns of synonymous site evolution in *Drosophila*.** *Genetics* 2001, **157**:245-257.
144. Woodhead AD, Setlow RB, Pond V: **The Amazon molly, *Poecilia formosa*, as a test animal in carcinogenicity studies: chronic exposures to physical agents.** *Natl Cancer Inst Monogr* 1984, **65**:45-52.
145. Saillard J, Forster P, Lynnerup N, Bandelt HJ, Norby S: **mtDNA variation among Greenland Eskimos: the edge of the Beringian expansion.** *Am J Hum Genet* 2000, **67**:718-726.

146. Graur D, Martin W: **Reading the entrails of chickens: molecular timescales of evolution and the illusion of precision.** *Trends Genet* 2004, **20**:80-86.
147. Lynch M, Blanchard J, Houle D, Kibota T, Schultz S, Vassilieva L, Willis J: **Perspective: Spontaneous deleterious mutation.** *Evolution* 1999, **53**:645-663.
148. Baer CF, Miyamoto MM, Denver DR: **Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**:619-631.
149. Lamatsch DK, Steinlein C, Schmid M, Schartl M: **Non-invasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: Detection of triploid *Poecilia formosa*.** *Cytometry* 2000, **39**:91-95.
150. Misra S, Crosby MA, Mungall CJ, Matthews BB, Campbell KS, Hradecky P, Huang Y, Kaminker JS, Millburn GH, Prochnik SE, Smith CD, Tupy JL, Whitfield EJ, Bayraktaroglu L, Berman BP, Bettencourt BR, Celniker SE, de Grey AD, Drysdale RA, Harris NL, Richter J, Russo S, Schroeder AJ, Shu SQ, Stapleton M, Yamada C, Ashburner M, Gelbart WM, Rubin GM, Lewis SE: **Annotation of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome: a systematic review.** *Genome Biol* 2002, **3**:research0083.0081-0022.
151. Gaffney DJ, Keightley PD: **Genomic selective constraints in murid noncoding DNA.** *PLoS Genetics* 2006, **2**:e204.
152. Halligan DL, Keightley PD: **Ubiquitous selective constraints in the *Drosophila* genome revealed by a genome-wide interspecies comparison.** *Genome Res* 2006, **16**:875-884.
153. Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, Dehal P, Christoffels A, Rash S, Hoon S, Smit A, Gelpke MD, Roach J, Oh T, Ho IY, Wong M, Detter C, Verhoeve F, Predki P, Tay A, Lucas S, Richardson P, Smith SF, Clark MS, Edwards YJ, Doggett N, Zharkikh A, Tavtigian SV, Pruss D, Barnstead M, Evans C, Baden H, Powell J, Glusman G, Rowen L, Hood L, Tan YH, Elgar G, Hawkins T, Venkatesh B, Rokhsar D, Brenner S: **Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*.** *Science* 2002, **297**:1301-1310.
154. Haag-Liautard C, Dorris M, Maside X, Macaskill S, Halligan DL, Charlesworth B, Keightley PD: **Direct estimation of per nucleotide and genomic deleterious mutation rates in *Drosophila*.** *Nature* 2007, **445**:82-85.
155. Kibota TT, Lynch M: **Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*.** *Nature* 1996, **381**:694-696.
156. Kimura M: **The neutral theory of molecular evolution.** Cambridge: Cambridge University Press; 1983.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Effects of predator-induced visual and olfactory cues on 0+ perch (*Perca fluviatilis* L.) foraging behaviour

Mikheev VN, Wanzenböck J, Pasternak AF. Effects of predator-induced visual and olfactory cues on 0+ perch (*Perca fluviatilis* L.) foraging behaviour.

Ecology of Freshwater Fish 2006: 15: 111–117. © Blackwell Munksgaard, 2006

Abstract – Foraging juvenile fish with relatively high food demands are usually vulnerable to various aquatic and avian predators. To compromise between foraging and antipredator activity, they need exact and reliable information about current predation risk. Among direct predator-induced cues, visual and olfactory signals are considered to be most important. Food intake rates and prey-size selectivity of laboratory-reared, naive young-of-the-year (YOY) perch, *Perca fluviatilis*, were studied in experiments with *Daphnia magna* of two size classes: 2.8 and 1.3 mm as prey and northern pike, *Esox lucius*, as predator. Neither total intake rate nor prey-size selectivity was modified by predator kairomones alone (water from an aquarium with a pike was pumped into the test aquaria) under daylight conditions. Visual presentation of pike reduced total food intake by perch. This effect was significantly more pronounced (synergistic) when visual and olfactory cues were presented simultaneously to foraging perch. Moreover, the combination of cues caused a significant shift in prey-size selection, expressed as a reduced proportion of large prey in the diet. Our observations demonstrate that predator-induced olfactory cues alone are less important modifiers of the feeding behaviour of naive YOY perch than visual cues under daylight conditions. However, pike odour acts as a modulatory stimulus enhancing the effects of visual cues, which trigger an innate response in perch.

**V. N. Mikheev¹, J. Wanzenböck²,
A. F. Pasternak³**

¹A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, ²Institute of Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondsee, Austria, ³P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Key words: juvenile perch; food intake rate; prey-size selectivity; pike kairomones; visual contact

V. N. Mikheev, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii prospekt 33, 119071 Moscow, Russia; e-mail: avamik@online.ru

Accepted for publication December 20, 2005

Introduction

Young fish are continually faced with conflicting time demands imposed by foraging and predator avoidance (Werner & Gilliam 1984; Lima & Dill 1990; Mikheev 2000) and often exhibit threat-sensitive trade-offs between foraging and antipredator responses (Godin 1990; Lima & Bednekoff 1999). Prey may respond to predation risk by a reduction in time spent foraging (e.g., hiding); however, this can only be sustained for a finite period of time before other constraints (e.g., hunger) make it necessary to resume foraging activity (Lima & Bednekoff 1999). Natural selection should

favour individuals that can reliably assess local current predation risks, as this would allow them to optimise the ratio between gains and losses of fitness (Lima & Bednekoff 1999; Golub & Brown 2003).

For fish, direct predator-induced cues, especially visual (Karplus & Algom 1981) and olfactory signals (Chivers & Smith 1998; Wisenden 2000) are considered to be most important. However, there is still limited knowledge concerning independent contributions of both visual and chemical cues (Mathis et al. 1993), as well as their interaction (Bouwma & Hazlett 2001) on foraging characteristics. Moreover, in spite of the growing number of publications on the role of

predator-induced chemical cues in fish foraging and other behaviours, their importance as a factor influencing foraging behaviour is still debatable. Some studies have shown that fish significantly reduce their intake rate in response to kairomones released by sympatric predators (Jachner 1995, 1997; Kats & Dill 1998) and even naive fish could distinguish between different piscivores on the basis of chemical cues only (Hirvonen et al. 2000). However, others have shown that juvenile fish do not respond to chemical stimuli from piscivores if they had no previous contacts either with the predators or with alarm substances from conspecifics (Chivers & Smith 1994; Utne-Palm 2001).

Foraging response to local predation risk is usually expressed as a reduction of total food intake, which could be caused either by avoidance of profitable but dangerous microhabitats (Cerri & Fraser 1983; Fraser & Gilliam 1987; Utne et al. 1997; Utne-Palm 2001) or by reducing time spent foraging (Fraser & Huntingford 1986; Jachner 1995, 1997) and engaging in other activities, e.g., hiding. As a more subtle response, a shift in prey-size selectivity has been observed in the guppy, *Poecilia reticulata*, which changed preference from large to small prey after visual contact with a predator (Godin 1990). It is unknown if young-of-the-year (YOY) perch exhibit similar responses to various predator-induced cues.

Young-of-the-year Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, is a daylight forager with relatively high food demands (Thorpe 1977; Persson 1983). It is vulnerable to various predators, including fish and birds (Goldspink 1990; Winfield 1990; Eklöv 1992). It is a particulate feeder with pronounced prey-size selectivity that varies temporally and spatially (Guma'a 1978; Mills et al. 1986; Bergman 1988; our unpublished data); however, the behavioural mechanisms of this variability have received little attention. Differences in the feeding response to different cues of predation risk could depend on intraspecific variability in risk taking (Fraser & Huntingford 1986; Metcalfe 1986; Wilson 1998; Westerberg et al. 2004), or might also be affected by the type of predator-induced cues available to foraging fish (Brown et al. 1997).

Our aim was to study the responses in feeding rate and prey-size selectivity of laboratory-reared, naive YOY perch subjected to influences of cues induced by northern pike, *Esox lucius*. The perch originated from a lake where it naturally coexists with pike. Specifically, we studied changes in total intake rate and prey-size selectivity of perch in relation to impacts of pike kairomones, of visual contact with pike and simultaneous presentation of both cues. We expected that a combination of visual and olfactory cues might elicit stronger feeding responses than separate cues alone. We also tested the prediction that reduction in food

intake rate caused by pike-induced cues was primarily related to reduced consumption of larger prey.

Materials and methods

Predators and prey

Perch juveniles were obtained from egg strands collected from Lake Wallersee (Austria). A mass culture was kept in flow-through tanks at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and a dark–light regime that imitated the seasonal changes of illumination. The fish were raised on a diet of living brine shrimp *Artemia salina* nauplii, lake zooplankton and *Daphnia magna*. Fish used in the experiments had a mean standard length (SL) of 22.1 ± 1.77 mm (mean \pm SD) and a mean dry weight (DW) of 39.6 ± 9.78 mg. A dense culture of *D. magna* was maintained in plastic basins on a mixture of green algae and yeast. Two prey sizes were produced by sieving: large prey having a mean body length (\pm SD) of 2.81 ± 0.22 mm and a mean body width of 1.85 ± 0.15 mm and small prey having a mean body length of 1.35 ± 0.24 mm and a mean body width of 0.83 ± 0.17 mm. Size distributions of the two classes did not overlap, and large and small prey were easy to discriminate visually. DW of *D. magna* was calculated from the regression equation, $DW = 8.47L^{2.6}$ (J. Wanzenböck, unpublished data, Institute of Limnology, Austrian Academy of Sciences). Thus, large prey had an average body weight of $124 \mu\text{g}$; small prey weight was $25 \mu\text{g}$. Gape width (GW) of perch juveniles was calculated using the equation, $GW = -0.176 + 0.099 \text{ SL}$, where SL (Kurmayer & Wanzenböck 1996) equalled 2.21 ± 0.18 mm (mean \pm SD).

The relative size (the ratio of prey width to mouth gape of the predator) of large prey (0.84) was slightly higher than optimal (Werner 1974; Kislalioglu & Gibson 1976). Handling of a prey of this size takes 14 times longer than handling small prey (relative size = 0.38). Handling time (HT, s) was calculated according to the equation, $HT = 1 + 0.0229 \exp(8.061 \text{ PS/MS})$, where PS/MS is the prey size/mouth size ratio (Werner 1974). HT was 21 s per large prey and 1.5 s per small one.

Experimental procedures and treatments

Experiments were carried out at the Institute for Limnology, Mondsee, Austria in 2001. They were run in glass aquaria of $30 \times 20 \times 20$ cm filled with 10 l of filtered lake water at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. For each of the three treatments (where foraging YOY perch were exposed to either predator-induced chemical and visual cues or a combination of both), 60 fish were randomly chosen from the flow-through holding tank and distributed in

groups of three among 20 aquaria (10 test and 10 control aquaria) before experimentation. Fish were tested in groups of three instead of individually because pilot observations demonstrated fish in groups calmed down and started feeding much earlier than isolated individuals. Overhead lighting was provided by two 36-W fluorescent tubes on a 16:8 h light:dark regime providing 400 lx at the water surface. Aquaria were permanently aerated except the short periods of the feeding tests. A day before the test, fish were fed with *D. magna ad libitum* for an hour in the experimental aquaria. After that, the rest of prey were removed and fish were left without food in the same aquaria for 20 h prior to the treatment.

Consumption of large and small prey was estimated in 15-min trials with 100 large and 200 small daphnia per aquarium. The high concentration of prey mimicked feeding in a dense zooplankton patch (Mikheev 1987). According to our pilot observations, consumption rate of hungry YOY perch was highest during the first 15 min. To test the impact of predator-induced chemical cues, water from the flow-through 40-l aquarium with a pike was allowed to drip through a plastic tube into test aquaria at a rate of 150–200 ml per 15-min period during the feeding test. The same amount of pure filtered lake water was introduced in the same manner into the control aquaria. The pike of 20-cm length had been food deprived for 3 days. Before that, it was fed with laboratory-reared YOY roach, *Rutilus rutilus*. After 15-min feeding, test perch were removed with a hand net, anaesthetised with MS-222 and measured. The remaining *D. magna* were collected from each aquarium with a sieve of 0.2-mm mesh and counted under a dissecting microscope. The impact of visual predator-induced stimuli was tested using the same experimental procedure and another group of 60 YOY perch. To produce visual contact, a small (11- to 12-cm total length) pike, *E. lucius*, was kept isolated within a transparent plastic bag in the corner of the same test aquarium. For controls, the bags were filled with pure lake water. The last test in the sequence of treatments was a combination of visual and olfactory cues. The third group of 60 perch was treated simultaneously either with visual contact (pike in the plastic bag) and pike odour in the test aquaria or with the empty bag and filtered water in the control. All experiments were run between 11:00 and 17:00 hours at a temperature of 20 °C. The whole sequence of experiments, together with the periods of acclimation and starvation between the tests, took 5 days.

Data analysis

The number of consumed prey items was assessed as the difference between introduced and remaining

D. magna after perch feeding. Large and small *D. magna* were counted separately. In trials without fish, no losses of either large or small prey caused by manipulations and sieving were found. Calculated numbers of large and small prey consumed in each test and control aquarium were transformed into the intake rate (DW of prey ingested per individual fish for 15 min). Ivlev's electivity index (Ivlev 1961) was used to assess the preference for large prey. Data were transformed [arcsine transformation for the Ivlev's electivity index, E ; $\ln(x + 1)$ for food intake rate data] to meet the assumption of normality and homogeneity of variance required by ANOVA tests. Two-way ANOVA was conducted to assess the effects of predation threat (predation and no predation) and type of cues (odour, visual contact and visual + odour) as factors. Differences between treatments were assessed using Tukey's *post hoc* honestly significant difference tests. Analyses of intake rate were performed with large prey, small prey and with the two sizes of prey pooled. The results of ANOVA and Tukey's tests in the three sets of analyses were similar (i.e., effects were identical on small daphnia, on large daphnia, and on total intake) and therefore only results of the analyses of total food intake are presented below.

Results

Food intake rate of YOY perch was significantly reduced under the impact of predation threat (two-way ANOVA: $F_{1,54} = 47.16$, $P < 0.0001$). The type of pike-induced cues also significantly influenced food intake ($F_{2,54} = 16.28$, $P < 0.0001$). Interaction between the two factors was significant ($F_{2,54} = 15.36$, $P < 0.0001$; Fig. 1). However, the effect of chemical cues on the perch intake rate was significant only when both signals of the predator were present (Tukey's test: $P = 0.0001$; Fig. 1). When chemical cues were present alone, they produced no noticeable impact on the intake rate in comparison to the control (Tukey's test: $P = 0.9989$). Visual contact with the predator significantly reduced perch feeding relative to the control (Tukey's test: $P = 0.0063$) even when it was present alone, but its impact was much less pronounced compared with the combined effect of both predator cues (Tukey's test: $P = 0.0003$; Fig. 1).

Preference for large prey assessed by Ivlev's electivity index, E , was significantly influenced by the threat of predation (two-way ANOVA: $F_{1,54} = 5.57$, $P = 0.0218$). The type of predator-induced cues had also significant effects on prey-size selectivity ($F_{2,54} = 3.24$, $P = 0.0468$). No interaction between the two factors was observed ($F_{2,54} = 2.66$, $P = 0.0786$). Neither chemical (Tukey's test: $P = 0.9892$) nor visual ($P = 0.9999$) cues presented alone had an effect on prey-size selectivity. The only

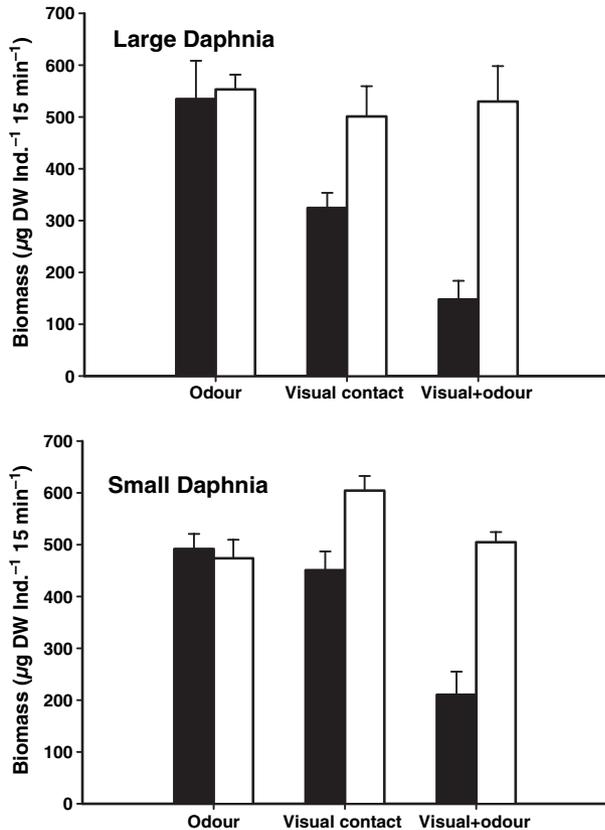


Fig. 1. Intake rate (dry weight of prey ingested per individual fish for 15 min) of young-of-the-year perch, *Perca fluviatilis*, for large (upper panel) and small *Daphnia magna* (lower panel) under the impact of pike-induced cues. Black and white bars are the results of treatments and controls, respectively. Mean and standard error bars are given ($N = 10$).

impact, which significantly reduced proportion of large prey in the diet compared with the control, was combined presence of visual and olfactory cues ($P = 0.0241$; Fig. 2).

Discussion

Our laboratory experiments with naive YOY perch clearly demonstrated that the presence of predator-induced chemical cues alone did not cause any significant changes in foraging behaviour of hungry fish. Neither total food intake nor proportion of large and small prey in the diet changed when perch in groups of three fish were exposed to northern pike kairomones during 15-min feeding bouts. Although chemical predator-induced cues are known to elicit innate antipredator responses for a range of aquatic animals (Kats & Dill 1998; Tollrian & Harvell 1999), our naive fish showed no response when first presented with a novel predator odour (Chivers & Smith 1994, 1998; Brown et al. 1997; Utne-Palm 2001; but see Hirvonen et al. 2000). However, naive fish that were exposed simultaneously to novel

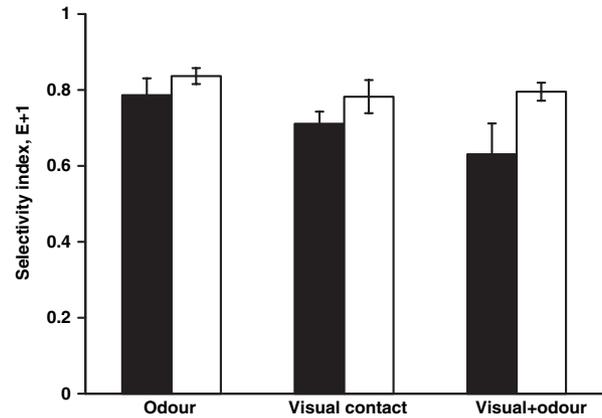


Fig. 2. Changes in prey-size selection of young-of-the-year perch caused by pike-induced cues. Bars show the values of Ivlev's electivity index, E , for large prey in controls (white) and under impact of pike-induced cues (black). Transformed data, $E + 1$, were used to avoid negative values and to make comparisons easier. Mean and standard error bars are given ($N = 10$).

predator-induced cues and conspecific alarm cues, or physical presence of a predator, learned to associate risk with novel stimuli (e.g., Magurran 1989; Chivers & Smith 1994; Utne-Palm 2001). In our experiments, laboratory-reared perch were not familiar with conspecific alarm cues either before or during tests. Other chemical cues related to injured or ingested perch could not be available to experimental fish because the pike used as a source of predator odour had no food for 3 days before the experiment, and before that it was fed with YOY roach from laboratory mass culture.

Visual contact with a predator significantly reduced consumption of both large and small prey by naive YOY perch. This finding is consistent with a large number of previous studies, which have demonstrated that vision may convey to fish accurate and reliable information about predator location and behaviour (e.g., Dill & Fraser 1984; Metcalfe et al. 1987; Utne-Palm 2001; Kelley & Magurran 2003). There is some evidence that fish have an innate ability to respond to particular visual cues and are predisposed to recognise predatory fish (Utne-Palm 2001; Kelley & Magurran 2003).

Although chemical cues may be considered more important in predator detection when vision is restricted by high turbidity, low illumination or dense vegetation (Brown et al. 1997; Brönmark & Hansson 2000), it does not seem to be the case with our YOY perch. At the age they were used in our experiments, perch inhabit predominantly littoral and sublittoral zones of Lake Wallersee (Upper Austria) with usually transparent water; however, dense vegetation and low illumination during night-time could impair vision. The upper layer of water, which is mainly used for foraging, is rather turbulent because of wind-induced

currents. As a result of the turbulent nature of the water, predator-released odours are dispersed in any direction and detectable directional gradients of a chemical signal are unlikely (Moore et al. 1994; Webster & Weissburg 2001). Determining the reliability of information is recognised as a primary challenge to foragers (Curaco & Gillespie 1986; Wiskerke et al. 1993), and if information provided by the chemical cue is of low quality (no exact indication on the direction and distance to a predator), the best choice for a forager may be not to alter its foraging behaviour (Brown 1988).

The most pronounced changes in foraging caused by simultaneous introduction of visual and olfactory stimuli suggest that laboratory-reared perch can detect kairomones released by pike, but respond to them only if they are presented in combination with visual predator cues. In this case, the highest reduction in total food intake as well as the stronger shift of prey-size selection towards the smallest prey was observed. In fish, the combination of chemical and visual cues has yielded several outcomes compared with single cues. There are additive effects (e.g., Brown et al. 1997), hierarchical fashion of interaction (e.g., Hartman & Abrahams 2000; Smith & Belk 2001) when fish ignore the cue in the modality that is least salient or reliable and a synergistic interaction between sensory modalities when the effect of the combination is greater or different from the sum of effects of the individual components (e.g., Wisenden et al. 2004). The results of our experiments demonstrate the synergistic interaction between visual and olfactory predator cues modifying foraging of naive YOY perch. Rather than inducing an immediate behavioural response, the detection of pike kairomones merely strengthens the feeding response of perch to visual predator input. Predator odour thus acts as a modulatory stimulus (Holldobler 1999) affecting the magnitude of responses to other inputs. However, the changes in perch foraging behaviour caused by the combined influence of olfactory and visual pike cues were not only quantitative, but a significant change in prey-size selection was also observed expressed in the marked reduction of the proportion of large prey in the diet. The disproportional reduction in consumption of large prey, which is costly in terms of time spent for their 'handling' that included pursuing, capturing and processing (in our experiments, calculated 'HT' of large prey was 14 times higher than that of small prey), suggests that under increased safety demands, fish avoid the most risky activities confronting vigilance. Because of limited attention and sensory overload (Milinski 1990; Clark & Ducas 2003), foragers are most vulnerable while engaged in a difficult behavioural task (Godin & Smith 1988; Krause & Godin 1996), which in our case is the pursuing, capturing and processing of large prey. Prey-size selectivity is known

to be influenced by fish satiation (Hirvonen & Ranta 1996). However, according to our observations with food-deprived YOY fish (Mikheev & Wanzenböck 1999 for roach; our unpublished data for perch), the most pronounced changes in prey-size selection occurred during 5–10 min after the beginning of feeding. After that, ingestion rate markedly decreased and selectivity stabilised. Our estimates obtained for 15-min trials can be considered as representative averages.

Our results suggest that a shift in prey-size selection towards smaller prey observed in juvenile percids foraging under daylight conditions (Mills et al. 1986; our unpublished data – respective: Wanzenböck et al. 2006) can be related to the impact of predator-induced cues in a period of high predation risk, rather than merely to more favourable conditions for vision (Mills et al. 1986). Our findings are most applicable to the period of the first summer during the transition of YOY perch from pelagial to littoral zones when naive fish encounter large piscivores like northern pike more often and the contact is closer.

Acknowledgements

We are grateful to two anonymous reviewers for their helpful comments on this manuscript and Jon Hateley for checking the English. This study was supported by the Austrian Academy of Sciences (exchange programme with Russian Academy of Sciences) and Russian Foundation for Basic Research (projects 05-04-48693 and 03-04-20010 to V. Mikheev and 04-04-48128 to A. Pasternak).

References

- Bergman, E. 1988. Foraging abilities and niche breadths of two percids, *Perca fluviatilis* and *Gymnocephalus cernua*, under different environmental conditions. *Journal of Animal Ecology* 57: 443–453.
- Bouwma, P. & Hazlett, B.A. 2001. Integration of multiple predator cues by the crayfish *Orconectes propinquus*. *Animal Behaviour* 61: 771–776.
- Brönmark, C. & Hansson, L.-A. 2000. Chemical communication in aquatic systems: an introduction. *Oikos* 88: 103–109.
- Brown, J.S. 1988. Patch use as an indicator of habitat preference, predation risk, and competition. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 22: 37–47.
- Brown, G.E., Chivers, D.P. & Smith, R.J.F. 1997. Differential learning rates of chemical versus visual cues of a northern pike by fathead minnows in a natural habitat. *Environmental Biology of Fish* 49: 89–96.
- Cerri, R.D. & Fraser, D.F. 1983. Predation and risk in foraging minnows: balancing conflicting demands. *American Naturalist* 121: 552–561.
- Chivers, D.P. & Smith, R.J.F. 1994. Fathead minnow, *Pimephales promelas*, acquire predator recognition when alarm substance is associated with the sight of unfamiliar fish. *Animal Behaviour* 48: 597–604.

- Chivers, D.P. & Smith, R.J.F. 1998. Chemical alarm signaling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. *Ecoscience* 5: 315–321.
- Clark, C.W. & Ducas, R. 2003. The behavioral ecology of a cognitive constraint: limited attention. *Behavioral Ecology* 14: 151–156.
- Curaco, T. & Gillespie, R.G. 1986. Risk-sensitivity: foraging mode in an ambush predator. *Ecology* 67: 1180–1185.
- Dill, L.M. & Fraser, A.H.G. 1984. Risk of predation and the feeding behavior of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 16: 65–71.
- Eklöv, P. 1992. Group foraging versus solitary foraging efficiency in piscivorous predators: the perch, *Perca fluviatilis*, and pike, *Esox lucius*, patterns. *Animal Behaviour* 44: 313–326.
- Fraser, D.F. & Gilliam, J.F. 1987. Feeding under predation hazard: response of the guppy and Hart's rivulus from sites with contrasting predation hazard. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 21: 203–209.
- Fraser, D.F. & Huntingford, F.A. 1986. Feeding and avoiding predation hazard: the behavioural response of the prey. *Ethology* 73: 56–68.
- Godin, J.-G.J. 1990. Diet selection under the risk of predation. In: Hughes, R.N., ed. *Behavioural mechanisms of food selection*. NATO ASI Series G, Vol. 20. Berlin: Springer-Verlag, pp. 739–770.
- Godin, J.-G.J. & Smith, S.A. 1988. A fitness cost of foraging in the guppy. *Nature (London)* 333: 69–71.
- Goldspink, C.R. 1990. The distribution and abundance of young (I+–II+) perch, *Perca fluviatilis* L., in a deep eutrophic lake, England. *Journal of Fish Biology* 36: 439–447.
- Golub, J.L. & Brown, G.E. 2003. Are all signals the same? Ontogenetic changes in the response to conspecific and heterospecific chemical alarm signals by juvenile green sunfish (*Lepomis cyanellus*). *Behavioural Ecology and Sociobiology* 54: 113–118.
- Guma'a, S.A. 1978. The food and feeding habits of young perch, *Perca fluviatilis*, in Windermere. *Freshwater Biology* 8: 177–187.
- Hartman, E.J. & Abrahams, M.V. 2000. Sensory compensation and the detection of predators: the interaction between chemical and visual information. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 267: 571–575.
- Hirvonen, H. & Ranta, E. 1996. Within-bout dynamics of diet choice. *Behavioral Ecology* 7: 494–500.
- Hirvonen, H., Ranta, E., Piironen, J., Laurila, A. & Peuhkuri, N. 2000. Behavioural responses of naive Arctic charr young to chemical cues from salmonid and non-salmonid fish. *Oikos* 88: 191–199.
- Holldobler, B. 1999. Multimodal signals in ant communication. *Journal of Comparative Physiology* 184: 129–141.
- Ivlev, V.S. 1961. *Experimental ecology of the feeding of fishes*. New Haven, CT: Yale University Press. 252 pp.
- Jachner, A. 1995. Changes in feeding behaviour of bleak (*Alburnus alburnus* L.) in response to visual and chemical stimuli from predators. *Archiv für Hydrobiologie* 133: 305–314.
- Jachner, A. 1997. The response of bleak to predator odour of unfed and recently fed pike. *Journal of Fish Biology* 50: 878–886.
- Karplus, I. & Algom, D. 1981. Visual cues for predator face recognition by reef fishes. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 55: 343–364.
- Kats, L.B. & Dill, L.M. 1998. Scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience* 5: 361–394.
- Kelley, J.L. & Magurran, A.E. 2003. Effects of relaxed predation pressure on visual predator recognition in the guppy. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 54: 225–232.
- Kislalioglu, M. & Gibson, R.N. 1976. Prey “handling time” and its importance in food selection by the 15-spined stickleback, *Spinachia spinachia* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 25: 115–158.
- Krause, J. & Godin, J.-G.J. 1996. Influence of prey foraging posture on flight behavior and predation risk: predators take advantage of unwary prey. *Behavioral Ecology* 7: 264–271.
- Kurmayer, R. & Wanzenböck, J. 1996. Top-down effects of underyearling fish on a phytoplankton community. *Freshwater Biology* 36: 599–609.
- Lima, S.L. & Bednekoff, P.A. 1999. Temporal variation in danger drives antipredator behavior: the predation risk allocation hypothesis. *American Naturalist* 153: 649–659.
- Lima, S.L. & Dill, L.M. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68: 619–640.
- Magurran, A.E. 1989. Acquired recognition of predator odour in the European minnow (*Phoxinus phoxinus*). *Ethology* 82: 216–223.
- Mathis, A., Chivers, D.P. & Smith, R.J.F. 1993. Population differences in responses of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to visual and chemical stimuli from predators. *Ethology* 93: 31–40.
- Metcalf, N.B. 1986. Intraspecific variation in competitive ability and food intake in salmonids: consequences for energy budgets and growth rates. *Journal of Fish Biology* 28: 525–531.
- Metcalf, N.B., Huntingford, F.A. & Thorpe, J.E. 1987. The influence of predation risk on the feeding motivation and foraging strategy of juvenile Atlantic salmon. *Animal Behaviour* 35: 901–911.
- Mikheev, V.N. 1987. On mechanisms of selective feeding in 0+ pikeperch in Daphnia swarms. *Gidrobiologicheskii Zhurnal* 23: 111–115. (in Russian).
- Mikheev, V.N. 2000. Foraging behaviour of fishes and habitat complexity: searching, prey selection and conflict of motivations. *Journal of Ichthyology* 40 (Suppl. 2): 262–270.
- Mikheev, V.N. & Wanzenböck, J. 1999. Satiation-dependent, intra-cohort variations in prey size selection of young roach (*Rutilus rutilus*). *Oecologia* 121: 499–505.
- Milinski, M. 1990. Information overload and food selection. In: Hughes, R.N., ed. *Behavioural mechanisms of food selection*, NATO ASI Series G, Vol. 20. Berlin: Springer-Verlag, pp. 721–737.
- Mills, E.L., Confer, J.L. & Kretchmer, D.W. 1986. Zooplankton selection by young yellow perch: the influence of light, prey density, and predator size. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 716–725.
- Moore, P.A., Weissburg, M.J., Parrish, J.M., Zimmer-Faust, R.K. & Gerhardt, G.A. 1994. Spatial distribution of odors in simulated benthic boundary layer flows. *Journal of Chemical Ecology* 20: 255–279.

- Persson, L. 1983. Food consumption and competition between age classes in perch *Perca fluviatilis* population in a shallow eutrophic lake. *Oikos* 40: 197–207.
- Smith, M.E. & Belk, M.C. 2001. Risk assessment in western mosquito fish (*Gambusia affinis*): do multiple cues have additive effects? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51: 101–107.
- Thorpe, J.E. 1977. Morphological physiology, behaviour and ecology of *Perca fluviatilis* L. and *Perca flavescens* Mitchill. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 34: 1504–1514.
- Tollrian, R. & Harvell, C.D. 1999. The ecology and evolution of inducible defenses. Princeton, NJ: Princeton University Press. 361 pp.
- Utne, A.C.W., Brannas, E. & Magnhagen, C. 1997. Individual responses to predation risk and food density in perch (*Perca fluviatilis* L.). *Canadian Journal of Zoology* 75: 2027–2035.
- Utne-Palm, A.C. 2001. Response of naive two-spotted gobies *Gobiusculus flavescens* to visual and chemical stimuli of their natural predator, cod *Gadus morhua*. *Marine Ecology Progress Series* 218: 267–274.
- Wanzenböck, J., Mikheev, V.N. & Pasternak, A.F. 2006. Modification of 0+ perch foraging behaviour by indirect cues of predation risk. *Ecology of Freshwater Fish* 15: 118–124.
- Webster, D.R. & Weissburg, M.J. 2001. Chemosensory guidance cues in a turbulent chemical odour plume. *Limnology and Oceanography* 46: 1034–1047.
- Werner, E.E. 1974. The fish size, prey size, handling time relation in several sunfishes and some implications. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 31: 1531–1536.
- Werner, E.E. & Gilliam, J.F. 1984. The ontogenetic niche and species interaction in size-structured populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 393–425.
- Westerberg, M., Staffan, F. & Magnhagen, C. 2004. Influence of predation risk on individual competitive ability and growth in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Animal Behaviour* 67: 273–279.
- Wilson, D.S. 1998. Adaptive individual differences within single populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 353: 199–205.
- Winfield, I.J. 1990. Predation pressure from above: observations on the activities of piscivorous birds at a shallow eutrophic lake. *Hydrobiologia* 191: 223–231.
- Wisenden, B.D. 2000. Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 355: 1205–1208.
- Wisenden, B.D., Vollbrecht, K.A. & Brown, J.L. 2004. Is there a fish alarm cue? Affirming evidence from a wild study. *Animal Behaviour* 67: 59–67.
- Wiskerke, J.S.C., Dicke, M. & Vet, L.E.M. 1993. Larval parasitoid uses aggregation pheromone of adult hosts in foraging behaviour: a solution to the reliability–detectability problem. *Oecologia* 93: 145–148.



Selective feeding behaviour of key free-living protists: avenues for continued study

David J. S. Montagnes^{1,*}, Ana B. Barbosa², Jens Boenigk³, Keith Davidson⁴, Klaus Jürgens⁵, Miroslav Macek⁶, Jacqueline D. Parry⁷, Emily C. Roberts⁸, Karel Šimek⁹

¹**School of Biological Sciences**, Biosciences Building, University of Liverpool, Crown Street, Liverpool L69 7ZB, UK

²CIMA, Center for Marine and Environmental Research, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

³Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestr. 9, 5310 Mondsee, Austria

⁴Scottish Association for Marine Science, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll PA35 1HY, UK

⁵Leibniz Institute for Baltic Sea Research, Department of Biological Oceanography, Seest. 15, 18119 Rostock-Warnemünde, Germany

⁶National Autonomous University of Mexico, FES Iztacala, Department of Tropical Limnology, Av. de los Barrios 1, 54090 Tlalnepantla, Edo. México, Mexico

⁷Division of Biomedical and Life Sciences, School of Health and Medicine, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK

⁸Biological Sciences, Swansea University, Singleton Park, Swansea SA2 8PP, UK

⁹Biological Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Institute of Hydrobiology, Na Sádkách 7, 37005 České Budějovice, Czech Republic

ABSTRACT: Phagotrophic protists are diverse and abundant in aquatic and terrestrial environments, making them fundamental to the transfer of matter/energy within their respective food webs. Recognising their grazing impact is essential to evaluate the **role of protists in ecosystems**, and this includes appreciating prey selectivity, efforts have been made by groups and individuals to understand selective grazing behaviour by protists: many approaches and perspectives have been pursued, not all of which are compatible. This article, which is not a review, is the product of our discourse on this subject at the SAME 10 meeting. **It is the work of individuals, assembled for their breadth of backgrounds, approaches, views, and expertise. Firstly, to communicate ideas and approaches, we develop a framework for selective feeding processes and suggest 6 steps: searching, contact, capture, processing, ingestion, digestion. We then separate study approaches into 2 categories: (1) those examining whole organisms at the community, population, and individual levels, and (2) those examining physiology and molecular attributes. Finally, we explore general problems associated with the field of protistan selective feeding (e.g. linking food selection into food webs and modeling). We do not present all views on any one topic, nor do we cover all topics; instead, we offer opinions and suggest avenues for continued study. Overall, this paper should stimulate further discourse on the subject and provide a roadmap for the future.**

KEY WORDS: Amoeba · Ciliate · Flagellate · Grazing · Ingestion · Phagotrophic · Protozoa

—Resale or republication not permitted without written consent of the publisher—

INTRODUCTION

For the purpose of this discourse, we operationally consider all unicellular eukaryotes that ingest (**phagocytise**) organic matter as part or all of their source of energy as 'phagotrophic protists'. In particular, we

focus on key non-parasitic (i.e. free-living) taxa, with an emphasis on species that are not strictly associated with substrates and are mainly pelagic, although some of our insights may be transferable to other lifestyles. The phagotrophic protists include a wide range of taxa generally within the size range of 2 to 200 µm;

however, some amoeboid forms such as radiolaria and foraminifera can attain **diameters of up to 25 cm** (e.g. DeLaca et al. 2002, Laureillard et al. 2004). Phagotrophic protists include strictly heterotrophic taxa as well as mixotrophic taxa that combine phagotrophy and phototrophy by sequestering plastids derived from their prey (kleptoplastidy) or by harbouring complete algal endosymbionts (see Stoecker 1998). The great abundance of phagotrophic protists in aquatic environments, whether it be in soil interstices, groundwaters, biofilms, ponds, lakes, the open ocean, or a myriad of other aquatic ecotones, makes them fundamental to the transfer of matter and energy within their respective food webs. These eukaryotic microbes exhibit a variety of feeding strategies. This allows them to ingest a wide range of prey types, such as phytoplankton, bacteria, and other heterotrophs, including protists, whole metazoa, and their products (Sherr & Sherr 1997, Hansen & Calado 1999). Recognising the grazing impact of such protists is, therefore, essential for the evaluation of **their contribution to ecosystem processes**, and this clearly includes appreciating prey selectivity.

Over the last few decades there has been a concerted effort by many individuals and groups to understand the selective grazing behaviour of protists. Inevitably, many approaches and perspectives have been pursued, not all of which have been compatible. Fortunately, and appropriately, events such as the 10th Symposium on Aquatic Microbial Ecology (SAME 10) provide a mechanism for discourse and the synthesis of approaches, both practical and conceptual. This article, which we expressly state is not a review, is the successful product of such a discourse. It is the work of individuals, specifically assembled for their breadth of backgrounds, approaches, views, and expertise. We do not present all possible views on any one topic, nor do we cover all topics associated with selective feeding. However, we do offer opinions on several related topics and show avenues that we consider, at present, to provide sensible future directions of study on this key subject.

We have included key or appropriate references for each topic. Hence, while our list of citations may occasionally appear unbalanced, our referencing is specifically designed to place focus on those poorly studied areas that we consider important. The **initiated** reader

will recognise the great wealth of literature on these subjects and will hopefully excuse our omissions. The **uninitiated** reader is encouraged to pursue the topics below, using this synthesis as a node in the vast web of knowledge on the subject. In contrast to an exhaustive survey, we have attempted to place our ideas into a conceptual framework of protist feeding (Fig. 1). We anticipate that this will provide focus for future work to be conducted by ourselves and others.

BACKGROUND AND DIRECTION

It is now well established that prey populations can be strongly influenced by protistan grazers. Protists can control or influence distinct attributes of prey populations, ranging from the size of the prey standing stock to its taxonomic composition and to the morphology and activity of prey (Hahn & Höfle 2001, Jakobsen & Tang 2002, Jürgens & Matz 2002, Sherr & Sherr 2002, Pernthaler 2005, Long et al. 2007, Jürgens & Massana 2008). In studies of protist feeding, it is common to determine a single parameter, the 'grazing rate', using approaches such as the dilution technique (Landry & Hassett 1982) and observation of the ingestion of fluorescently labelled prey (Sherr et al. 1987), among others (for reviews see Landry 1994, Sherr & Sherr 1997). However, while the determination of grazing rates is invaluable, such measurements do not improve our understanding of *why* a prey type is ingested at a particular rate, or indeed why it might be rejected. To make simple predictions of how an ecosystem may respond to protistan grazing, we require an understanding of selectivity. Furthermore, as discussed **below** (see section 'Placing the observations in a larger context'), information on selective grazing is needed to produce mechanistic mathematical models that simulate the flux of nutrients within microbial food webs (Davidson et al. 1995a, Flynn 2006). This area of work is fundamental.

Our combined expertise leads naturally to the following structure. First, to allow us to communicate ideas and approaches, we develop a common framework for the processes associated with selective feeding. We then separate approaches to selective feeding behaviours into two categories: (1) those examining whole or-

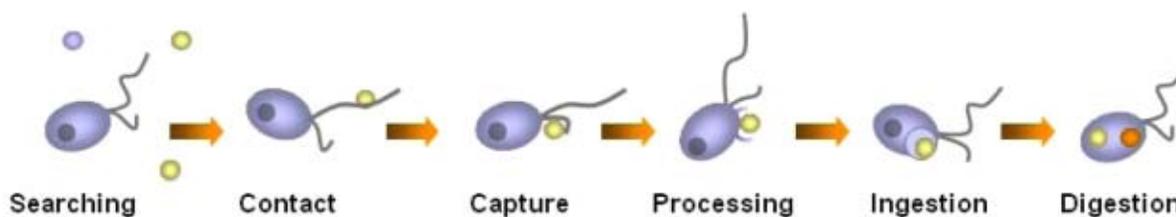


Fig. 1. Mechanistic steps in protistan prey capture that will potentially vary due prey to selectivity

ganisms at the community, population, and individual levels, and (2) those examining physiology and molecular attributes. Within each of these categories, we provide background and then suggest avenues for progress, using our conceptual framework as a focus.

DEVELOPING AN APPRECIATION FOR THE MECHANISMS OF PROTISTAN FEEDING

Phagotrophic protists have adopted a variety of methods to acquire food particles (Fenchel 1986, 1987; Jürgens & Massana 2008), allowing their classification as filter feeders (e.g. ciliates and flagellates that produce feeding currents), diffusion feeders (e.g. heliozoa that radiate axopods with which prey collide), and raptorial-interception feeders (e.g. ciliates, flagellates, and naked amoebae that actively engulf prey). Once intercepted or collected, prey are individually ingested or packaged into food vacuoles, or, in the case of protists such as naked amoebae (Page 1988, Butler & Rogerson 1997), foraminifera (Anderson et al. 1991, Murray 1991), radiolaria (Matsuoka 2007), and some heterotrophic dinoflagellates (Jacobson & Anderson 1996, Hansen & Calado 1999, Tillmann 2004), captured by whole cell engulfment using pseudopods that envelop prey, forming 'internal' or 'external' food vacuoles. Some species of dinoflagellates can also extract contents of their prey cells using a peduncle or feeding tube (Park et al. 2006, Jeong et al. 2007). Regardless of the specific feeding process, however, we can recognise several general mechanisms that combine to influence the selection of prey items by protists. These fundamental mechanisms provide us with an underlying conceptual framework.

Mechanistic steps involved in selective protistan feeding

Characteristics of prey cells or populations that potentially influence selective feeding by protists include the release of dissolved chemical cues, prey motility, prey biochemical composition or nutrient stoichiometry, cell surface characteristics, and finally prey size (e.g. Jürgens & Massana 2008). Prey size is perhaps the most fundamental of these characteristics and clearly influences ingestion and selection (Andersen et al. 1986, Fenchel 1986, Epstein & Shiaris 1992). The role of prey size can be further complicated by aggregation of prey particles, which may increase or decrease the probability of ingestion, such as in protistan feeding on colony forming *Phaeocystis* (Jakobsen & Tang 2002). However, unsuitable prey at the large and small extremes of the size range are not behav-

iorally deselected per se, as the prey are simply too big or too small to be available. In contrast, at intermediate prey:predator size ratios, prey size may be an important parameter in selection and capture, as the relative dimensions of prey and predator will influence contact probability, suitability for capture, and the food value of the prey. As substantial previous work has focused on prey size (e.g. Fenchel 1986, Jonsson 1986, Sanders 1988, Hansen 1992, Šimek & Chrzanowski 1992, Boenigk & Arndt 2002) our focus, which seeks to identify new insights related to feeding behaviour, will not re-examine these issues.

As in the case for metazoa, the act of grazing by protists is also composed of a number of separate but linked steps, each of which may be governed by one or many chemical, physical, or biological parameters. The number of steps could, in theory, be virtually infinite, but developing a series of discrete measurable points provides a practical, conceptual framework to base research on. To this end, we have extended the characterisation of heterotrophic flagellate feeding steps of Pfandl et al. (2004) to generate a schematic representation of protist food acquisition, incorporating six discrete steps: searching, contact, capture, processing, ingestion, and digestion (Fig. 1).

Searching. Searching for prey by motile predators is influenced by swimming speed and by changes in direction and frequency of turning, as this will alter the volume of water encountered. This behaviour may be affected by the distribution of prey (Fenchel & Blackburn 1999) or predators (Berryman 1992), or by chemical cues (Buskey & Stoecker 1988, 1989). Although chemotaxis and mechanoreception were first recognised in ciliates more than 100 yr ago (Jennings 1906), and protists are commonly observed to exploit patches of high prey density *in situ* (Taylor & Berger 1980, Fenchel & Jonsson 1988, Menden-Deuer & Grunbaum 2006, Paffenhöfer et al. 2007), understanding the role of chemical-mediated prey location in prey selection, involving attraction to dissolved cues, remains in its infancy. Factors important in chemosensory attraction include proteins, amino acids, and other dissolved inorganic or organic nutrients (Rassoulzadegan 1982, Flynn & Davidson 1993, Ferrier-Pagès et al. 1998, Davidson et al. 2005). Alternatively, other prey metabolites may deter grazing, including dimethylsulfide (Wolfe et al. 1997, Strom et al. 2003), dissolved free amino acids (Strom et al. 2007), and algal toxins (Hansen 1989, Kamiyama 1997, Tillmann 2003, Caron et al. 2004). Conceptually, chemosensory attraction, particularly to areas of elevated prey density, will reduce future searching time by the protist and increase the potential for predator-prey contact.

Contact. Contact probability between predator and prey will increase with increasing predator size (Flynn et

al. 1996). However, this may be partly offset by reductions in swimming speed with increasing size (Crawford 1992). Moreover, prey cells are often not passive particles, and their motility will influence contact probability.

Capture. Capture (or prey handling) may be unsuccessful and reduce ingestion rates (Matz & Jürgens 2005, Jakobsen et al. 2006). Some prey types can also exhibit behavioural defensive strategies, such as exopolymer formation and aggregation, that minimize contact (Pajdak-Stós et al. 2001). Finally, prey stickiness (Kiørboe & Titelman 1998) and electrostatic or hydrodynamic factors are important at the micrometer scale; e.g. hydrophobicity may influence contact probability (Buskey 1997, Monger et al. 1999, Matz & Jürgens 2001, Matz et al. 2002, Matz & Jürgens 2005), as will the forces generated by the highly viscous, low Reynolds number environment in which protists exist (Pettitt et al. 2002).

Flynn et al. (1996) have proposed that it is possible to calculate the theoretical contact probability between predator and different prey in multi-species assemblages and use this as an index of selection or rejection of prey. However, the application of such an approach is made more difficult by the variability in successful prey capture, which, like searching or ingestion, may be influenced by chemical (receptor-ligand interaction) or mechanical factors (Seravin & Orlovskaja 1977, Hausmann 2002, Wildschutte et al. 2004, Jakobsen et al. 2006).

Processing. Processing (or handling) of food, which can involve receptor-mediated recognition of particles (Wootton et al. 2007), can be one of the most active steps in overall food selection (Boenigk 2005, Berge et al. 2008).

Ingestion. Ingestion *sensu strictu* is limited by the morphological features of the predator, but unsuitable prey can be rejected (Stoecker et al. 1995, Boenigk & Arndt 2000). To (partially) overcome such restrictions, a predator may have the capacity to enlarge its oral region (Kopp & Tollrian 2003a, 2003b) or be adapted to **digest cells extracellularly**. However, in the case of radiolarians, feeding behaviour and diet are clearly related to skeletal morphology, and multi-segmented spumellarians ingest larger-sized prey compared to solitary spumellarians (Matsuoka 2007). Spinose species of planktonic foraminifera can handle and ingest actively swimming metazoa, whereas non-spinose species may not be able to capture and hold active metazoa (Anderson et al. 1991). The inability of tube-feeding dinoflagellates to penetrate rigid cell coverings may explain their reduced feeding on diatoms and thecate dinoflagellates (Berge et al. 2008). In summary, morphology and structure play a major role in ingestion.

Digestion. Digestion appears to be actively regulated, and unsuitable (possibly indigestible) material can be prematurely ejected by some protists, such as

flagellates (Flynn & Davidson 1993, Hansen & Calado 1999, Boenigk et al. 2002). For some ciliates, in contrast, indigestible material remains within the food vacuoles for its lifespan (Fok et al. 1982), even though the lifespan of vacuoles containing high amounts of indigestible materials may be **shorter than that of vacuoles containing digestible prey** (Boenigk & Novarino 2004). However, the majority of ingested prey is digested, although differential digestion occurs in protists: for example, gram-negative bacteria are generally digested more rapidly than gram-positive cells (Gonzalez et al. 1990, Weekers et al. 1993, Ronn et al. 2002). **As discussed below** (see section 'Examining behaviours at the population and single cell levels'), **although digestion is not strictly part of food selectivity, for experimental reasons it may alter our perception of selective feeding and must therefore be considered.**

Synthesis

Selective grazing by protists can be represented by six steps (Fig. 1), each of which can be inferred from theory. Developments in microscopy and chemistry have also elucidated their existence, as briefly presented above. However, the isolation and parameterisation of the mechanisms that underpin selective grazing and its role within microbial food webs remain major challenges. The design of experiments that can quantify the response of, for example, prey capture and processing to external stimuli remains problematic with the experimental tools currently at our disposal. With this in mind, we present and discuss some of the avenues of study that need attention.

EXAMINING BEHAVIOURS AT THE POPULATION AND SINGLE CELL LEVELS

Two major approaches have been used to investigate protist feeding behaviours at the organism level: population–community studies and single cell observations. These distinct approaches have their respective strengths and weaknesses, but there are common areas for development. In this section, following the terminology and concepts outlined above, we summarize the main directions that laboratory and field studies have followed over the last several years and then provide some suggestions for the direction of future work.

Population studies in the laboratory

Typically, most laboratory experiments have focused on population responses of easily cultured taxa, using

batch cultures of varying sizes (but see section 'Laboratory approaches towards individuals'). Searching has been explored using preference chambers and needle assays to demonstrate en masse movement of protists, either towards or away from stimuli such as live prey, predators, and chemical cues (Leick et al. 1994, Fenchel 2004, Martel 2006, Leick & Lindemose 2007). **An alternative method for the indirect determination of parameters such as searching rate and handling time (a combination of contact and capture) is to infer them from the results of experiments that examine functional responses (i.e. grazing rate vs. prey concentration). Response curves are fit to the data, and grazing parameters are determined from mechanistic functions (e.g. Fenchel 1984).** This indirect approach can be applied to multiple prey species to assess capture success, as has been done by Verity (1991). However, such studies are few, partially because of their complexity but also because of the difficulty of identifying prey types in mixtures.

The most common laboratory approaches to assess grazing behaviour have used a variety of natural and surrogate prey (discussed in more detail in **'Field approaches towards estimating population–community responses**) and have measured either prey removal/depletion or prey uptake, both of which determine ingestion rates. Prey removal is typically measured either directly (e.g. microscopy, electronic particle counting; Flynn & Davidson 1993) or indirectly (e.g. **using prey fluorescence as a proxy for prey abundance; Montagnes & Lessard, 1999**). Through such experiments, it is possible to recognise that protists possess prey-dependent ingestion rates (e.g. Eccleston-Parry & Leadbeater 1994, Parry 2004), indicating variation in either contact or capture. However, ingestion rates represent the end-point of the entire feeding process (Fig. 1); alone, they do not allow recognition of the stages at which feeding behaviour changes. Ingestion rates therefore fail to evaluate the individual processes involved in protist feeding, and like all laboratory work they do not represent the natural environment and may mask or fail to include external factors that alter selectivity (e.g. chemical cues, turbulence regime, light intensity and composition; **see section 'Examining behaviours at the molecular and physiological levels'**).

Field approaches towards estimating population–community responses

In field experiments, a natural community, or a defined size-fraction of a community, is typically contained within a chamber that is then incubated *in situ*. These chambers may be non-permeable (e.g. bottles, plastic bags; Sherr & Sherr 1993) or permeable (dialy-

sis bags, diffusion chambers; Ferrier-Pagès & Ras-soulzadegan 1994, Weisse 1997). In both cases, natural cues that may alter selectivity are included to a lesser or greater extent. As with laboratory studies, both prey depletion and prey uptake approaches have been applied to examine ingestion and prey selectivity by natural assemblages, and like laboratory work, the findings are generally limited to estimates of ingestion, often obviating the potential to examine the specific steps (Fig. 1) associated with selectivity. In addition, the selectivity observed during depletion experiments obviously represents the sum of specific selectivity behaviours of all components of the community.

Some experiments examine the reduction in natural prey (e.g. the dilution approach; Landry & Hassett 1982), where prey depletion is normally observed as a bulk measurement (e.g. chlorophyll *a*; Stelfox-Widdicombe et al. 2000). In theory, both predators and prey might be directly identified. Prey selectivity could then be speculated on. However, such experiments would be difficult to perform with sufficient resolution to determine specific behaviours, as it is exceedingly difficult to assess specific responses of predators and prey in natural samples, and the discrete processes (Fig. 1) associated with the end result—ingestion—cannot be determined.

Other field experiments have measured grazing through the uptake of inert particles, such as heat-killed fluorescently-labelled prey (FLP), produced from either monocultures or a mixed prey community (Epstein & Shiaris 1992, Sherr & Sherr 1993, Šimek et al. 2000, Cleven 2004). These experiments also mostly fail to examine prey selectivity, as the resolution provided by staining specific prey types is insufficient to resolve preferences (see section 'Identifying prey').

In the case of larger-sized phagotrophic protists, such as foraminifera, studies examining fatty acid biomarker (Suhr et al. 2003) and cell carbon isotopic composition (Nomaki et al. 2006) of individual cells have demonstrated that certain taxa feed selectively. However, these studies do not provide information on why particular prey types are positively or negatively selected.

Laboratory approaches towards individuals

The observation of individual protistan behaviours has a long history (Ehrenberg 1838), but it is only relatively recently that observational techniques have allowed detailed quantitative assessments of prey selectivity (e.g. Holen & Boraas 1991, Boenigk et al. 2001b, Pfandl et al. 2004). Video observations have been used to directly measure individual feeding process stages, such as contact, capture, processing, ingestion, and digestion, particularly in sessile flagel-

lates (Boenigk et al. 2001a,b, Pfandl et al. 2004, Boenigk 2005), drifting or substrate-attached protists (Hausmann 2002), and planktonic tintinnids, which can be trapped by immobilising their lorica (Taniguchi & Takeada 1988, Stoecker et al. 1995). However, these studies are rare and exceedingly difficult to conduct on most motile species (but see Strom & Buskey 1993, Berge et al. 2008). Furthermore, few of these studies have been performed using different live prey organisms (Wu et al. 2004, Jezbera et al. 2005).

An exciting new direction for observations of individuals is the ability to track non-sessile cells. In principle, the observation of feeding by individual free-swimming protists has been successfully demonstrated: the feeding current (searching) of swimming protists has been analysed for the flagellates *Paraphysomonas* and *Pteridomonas* (Christensen-Dalsgaard & Fenchel 2003), and the feeding process and food selection (contact and capture) have been investigated for *Cyclidium glaucoma* by restricting the individual observation time to short intervals (Pfandl 2003). Furthermore, video microscopy, with computer-aided motion analysis, has indicated that protist searching behaviour can be both chemotactic (**stimulus-oriented, directed movement**) and chemokinetic (stimulus-induced, non-directed movement) (Leick & Lindemose 2007, Strom et al. 2007), as well as being governed by fluid mechanics (Jakobsen et al. 2006). **Video microscopy can also be used to observe feeding mechanisms involved in the capture of prey types.** For instance, in the case of 2 mixotrophic dinoflagellates, *Gonyaulax polygramma* ingests smaller-sized prey by engulfment through its apical horn, while employing its sulcal area for larger-sized prey (Jeong et al. 2005), while *Karodinium armiger* uses tube-feeding for larger or thecate prey and engulfment of prey or an incomplete extension of the feeding tube for smaller prey (Berge et al. 2008). Developments in optical and computer-driven technology associated with the direct observation of unimpeded protists should provide exciting avenues for future study.

Finally, although the use of fluid mechanical signals in prey detection by metazoa (e.g. Gilbert 1987, Kirk & Gilbert 1988) and fluid mechanical predator detection by protists (e.g. Jakobsen 2002) is well known, the role of fluid mechanical prey detection by heterotrophic protists is in its dawn. In a recent study, evidence was presented to show that the raptorial ciliate *Mesodinium pulex* used equatorial cirri (modified cilia) as functional fluid mechanical sensors in the same fashion as the setae on metazoan antennae. In this way, the ciliate discriminated between prey sizes and localised the direction of oncoming prey through fluid mechanical signals (Jakobsen et al. 2006). Clearly, there is a continued need to discern between chemical and mechanical cues in the selective feeding of protists.

Future directions

In studies of selective feeding, as in most field and laboratory studies, there is a classic dichotomy between the high precision and poor accuracy of laboratory estimates and the higher accuracy and relatively poor precision of field estimates. And, as is typical in most ecological research, it is through a coupling of both laboratory and field work that a closer approximation of reality will be found. We have provided an overview of some of the recent developments in our understanding of prey selectivity at the population-community and individual levels; from these we see the following key issues arising.

Recognising the effect of incubation times. In this section, we **mentioned** a number of methods used to incubate samples to determine ingestion or grazing rates. Prey-uptake experiments conducted in the field or laboratory may evaluate intra- and inter-specific variation within populations and communities, respectively. However, such prey-uptake experiments generally involve short-term incubations, so prey-induced changes (e.g. by morphological or chemical factors) in feeding behaviour (e.g. enzymatic induction mechanisms to detect or digest relatively 'recent prey') may not be detected. At present, prey-depletion experiments allow the evaluation of prey selection in population-community studies. Because prey-depletion experiments generally involve **long-term incubations**, prey-induced changes in feeding behaviour may occur, but may not be detected (e.g. switching behaviour). Recognising the limitations of these experiments and potentially developing new means to elucidate behaviours is clearly an avenue for future work.

Accounting for the effects of digestion. Although few studies have focused on digestion (the final step in our process, Fig. 1), it may require careful assessment for studies of selectivity. Following ingestion, prey will start to be digested and prey cells will become less visible and detectable in the protist food vacuoles over time. This in turn may lead to underestimates of calculated ingestion rates for highly digestible prey and the impression that the least digestible prey have been selected for, because only they are still visible in the food vacuoles. 'Short' incubation periods have been advocated to prevent such complications, but these periods will depend on the type of predator and prey, as digestion will still occur at different rates. Egestion of indigestible or hardly digestible prey may occur within minutes after ingestion, reducing the incubation time for unbiased food uptake experiments to very short intervals (Boenigk et al. 2001b, 2002). With so little information regarding the digestive stage of the protist feeding process (e.g. Fok et al. 1982, Dolan & Šimek 1997, 1999; Boenigk et al. 2001b, 2002;

Matz et al. 2004, Jezbera et al. 2005), it is currently difficult to design prey uptake experiments that account for this parameter effectively; again, we see this as a valuable avenue for continued study.

Identifying prey. Protists exhibit preferences associated with surrogate and natural prey. Although some work has been conducted in this direction (e.g. Montagnes & Lessard 1999), it is clear that this is also an avenue for further study, through both laboratory and field experiments, as outlined. In many instances, surrogate prey such as plastic beads and heat-killed prey (Fenchel 1986, Sherr & Sherr 1993) are discriminated against (Pfister & Arndt 1998, Boenigk et al. 2002, Pickup et al. 2007), and their use will bias selectivity experiments; consequently, they are not an ideal tool. However, experiments examining the selection of different live prey items are less common, because present means for the identification of prey types are limited and time-consuming (e.g. microscopy). The study of selective feeding on live prey with distinct morphological or fluorescent signatures (e.g. heterotrophic flagellates, various distinct algae) is possible (Verity 1991, Flynn et al. 1996). However, these features are not sufficient to resolve all species, and for small prey of similar shape the problem is even more severe (Wu et al. 2004).

To resolve this issue, techniques such as density gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) promise to be useful tools to monitor changes in prey community profiles (Ronn et al. 2002) or to detect prey species within the protist food vacuoles (Jezbera et al. 2005, 2006; Šimek et al. 2007). Developments in flow cytometry may also allow the rapid discrimination between prey groups (Vázquez-Domínguez et al. 2005), and through cell sorting in combination with molecular or chemical tracers they may allow the physical separation of prey and predators. The few studies that have employed such techniques provide evidence for prey selectivity or suggest the potential to do so. We see this as a sensible avenue of technological exploration.

Improving video surveillance. As indicated above, investigations that study selective feeding by individual protists are largely restricted to sessile or immobilised protists. Selective feeding in motile individuals, which is more relevant in freshwater and marine pelagic systems, has rarely been investigated at the single cell level, due to methodological limitations (but see Pfandl 2003). Individual observations are, however, crucial for the assessment of the basic mechanisms of food selection. A major issue is to overcome the current methodological limitations and to extend video observations to motile species. With recent developments in micro-processor-controlled automatic imaging systems and software technologies, we consider the continued ap-

plication of methods presently applied to observing behaviours of metazooplankton and protists (Kjørboe et al. 1996, 2004; Jakobsen et al. 2006, Strom et al. 2007) to be an essential future activity.

Determining the relevance of fluid mechanical signalling. Understanding the role prey behaviour plays in protist feeding requires broad experimental studies of swimming behaviour of prey (e.g. bacteria, flagellates), coupled with predator–prey encounter studies. We suggest that, using recently developed methods and following the example of others (e.g. Jakobsen & Hansen 1997, Jakobsen 2002, Jakobsen et al. 2006), continued emphasis should be placed on distinguishing mechanical signals from other stimuli for selective feeding. In addition, the evaluation of mechanisms involved in the sensory transduction of mechanical stimuli should be addressed.

Examining ecologically relevant species and conditions. Regardless of whether experiments were performed on individual cells or populations, most laboratory studies have, pragmatically, used easily cultured predators and prey, and many studies use high prey abundance relative to *in situ* levels. Weed species are ideal for examining variability between individuals or between populations, as well as for the study of trends in prey selectivity and major mechanisms underlying the process (Nanny 1980). However, this approach does not necessarily lend itself to predicting trends in natural environments. Furthermore, protists may exhibit specific patterns of prey selectivity in laboratory experiments when they are acclimated to saturating levels of optimal prey that may not reflect *in situ* conditions. It may seem axiomatic, but there is a continued need to experiment with those species that are more difficult to culture, which are also often more typical predator and prey species under near natural conditions. Continued efforts must, therefore, be made to develop means to culture these species, and funding agencies should recognise the need to develop these fundamental methods.

Coupling lab and field work. Finally, there is a continued need to critically assess and verify conceptually correct conclusions based on laboratory cultures with field measurements. We strongly support the comparison of laboratory and field studies, ideally on non-weed species (see section 'Examining ecologically relevant species and conditions'), using common methodologies. To this end, we also suggest that laboratory work should attempt to better mimic natural abiotic (e.g. turbulence, temperature, light intensity and spectral composition) and biotic conditions that might control selective feeding behaviour; for instance, future laboratory studies might examine selective feeding in the presence of mixed prey, using new methods for prey identification (see section 'Identifying prey').

EXAMINING BEHAVIOURS AT THE MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL LEVELS

Experiments examining protist behaviours at the physiological level have mainly focused on changes in feeding selectivity associated with predator nutritional state (Jürgens & DeMott 1995, Christaki et al. 1998, Boenigk et al. 2002). We concentrate on the results of these experiments and pay particular attention to both molecular mechanisms and prey physiological effects on selective feeding behaviour. We start by introducing molecular mechanisms potentially involved in selective feeding, and highlight the difficulty of studying these mechanisms in isolation.

The molecular detection of prey by protists can occur in the course of 4 of our 6 steps (Fig. 1): during searching in response to dissolved chemical cues and involving surface recognition of prey during capture, processing, and ingestion. We discuss primarily receptor-mediated processes involved with these 4 steps, although it is worth noting that sensing of dissolved chemical stimuli can also involve alternative mechanisms. For example, rather than binding to cell surface receptors, the attractant ammonium chloride diffuses as ammonium across the cell membrane of the ciliate *Paramecium*, which results in altered swimming behaviour (Davis et al. 1998).

Feeding experiments using predatory ciliates demonstrate the involvement of molecular mechanisms in predator-prey interactions: predatory ciliates locate (search for) their ciliate prey by responding to dissolved proteinaceous compounds released by the latter (Morelli & Verni 1996). Prey ciliates can, in turn, detect predator-released substances that stimulate them to transform into predator-resistant phenotypes by deploying antipredator structures such as spines, keels, or ridges (Wicklow 1997, Kuhlmann et al. 1999, Jakobsen & Tang 2002), thus reducing risk of capture.

Although both carnivorous (Morelli & Verni 1996) and herbivorous (Strom & Buskey 1993) protists show behavioural responses to chemosensory signals released by their prey, it remains difficult to determine how this type of chemoreception is used to select between different prey species because other prey variables may influence prey contact and capture. For example, Buskey (1997) demonstrated that a pallium-feeding dinoflagellate exhibits a distinct preference for diatoms over dinoflagellates when offered a mixed assemblage. His experiments provide indirect evidence that chemosensory perception influences the feeding selectivity for this predator, with the dinoflagellate exhibiting a behavioural response (searching) to chemosensory signals associated with the phytoplankton prey. The study also demon-

strated, however, that other factors in addition to chemosensory behaviour play an important role in feeding selectivity, with prey motility acting as a key selection parameter in successful capture: Buskey (1997) observed that the dinoflagellate frequently lost contact with the highly motile dinoflagellate prey before capture occurred, but this was not observed with the non-motile diatoms. Thus, we still require methods to dissect the individual feeding processes (Fig. 1).

Quantifying the extent to which cell surface recognition (capture and processing) is used to select between different prey species also remains problematic. Although the ability of protists to discriminate between particles based on surface biochemical composition has been demonstrated using beads coated with different compounds (Matz et al. 2002, Wootton et al. 2007), these experiments fail to indicate the direct use of these mechanisms in prey selection.

Experimental approaches and interpretations

Unlike community studies, experiments investigating how predator and prey physiology influences selective feeding behaviour have focused on protist cultures rather than natural assemblages, allowing better assessment of the mechanisms. These studies can be separated into two main categories, relating to predator or to prey physiology, depending on the perspective of the encounter.

Changes in selective feeding relating to predator physiology. The degree to which predator satiation and prey concentration affect selective feeding can vary considerably between different predator species. For the bacterivorous interception-feeding flagellates studied by Jürgens & DeMott (1995) and Boenigk et al. (2001a), increased selectivity occurred after acclimation to higher bacterial concentrations ($\sim 10^7$ cells ml^{-1}). At these high prey abundances, typically greater than those found in natural pelagic environments, several flagellate species actively selected for bacteria over latex beads; however, discrimination was not observed at lower concentrations. In contrast, Christaki et al. (1998) observed that two ciliate species exhibited a higher degree of selectivity at limiting food concentrations. Under these conditions, both ciliates displayed greater particle discrimination when fed beads with different surface properties, although the degree and direction of selectivity differed between species. Clearly, there is interaction between factors such as prey concentration and selectivity. In addition, protists display taxon-specific responses. To evaluate the latter, it is necessary to examine at which step selectivity occurs.

The mechanisms behind changes in feeding selectivity with predator nutritional state are poorly understood, but could be linked with changes in prey recognition at the capture or processing stages (Boenigk et al. 2002). Based on the limited work on the biochemical mechanisms for prey recognition by free-living protists, carbohydrate–protein interactions appear to play an important role. In certain amoebae, for example, galactose/N-actetyl-galactosamine-binding and mannose-binding lectins are involved in the attachment (capture) and uptake (processing and ingestion) of prey (Allen & Dawidowicz 1990, Venkataraman et al. 1997). Furthermore, the dinoflagellate *Oxyrrhis marina* can use a Ca²⁺-dependent mannose-binding lectin to recognise (capture) and phagocytise (process and ingest) prey (Wootton et al. 2007). Now that these receptors have been identified, the next logical avenue is to determine their specific role in selective feeding and investigate changes in receptor expression with predator physiological state.

Changes in selective feeding relating to prey physiology. The C:N:P ratio is often used to indicate nutritional stress in phytoplankton and bacteria. Some protists may discriminate between prey of different nutritional state and elemental ratio; for example, flagellates may ingest N-replete (low C:N ratio) phytoplankton prey at a greater rate than N-deplete cells (Verity 1991, Flynn et al. 1996, John & Davidson 2001). Flagellates may also discriminate between bacterial prey based on different C:P and N:P ratios, with low C:P bacteria being **ingested at higher rates** (Shannon et al. 2007).

Again, the mechanisms behind such selective feeding are poorly understood. Although molecular mechanisms may be involved, there is no direct experimental evidence to demonstrate this at present. For example, cell surface N-actetyl-glucosamine expression of a photosynthetic dinoflagellate changes with N-status of the cell (Kremp & Anderson 2004). Because cell surface sugar moieties appear to act as ligands for predatory protist lectins (Wootton et al. 2007), the variable expression of cell surface carbohydrate residues by the prey may affect cell surface recognition (capture and processing) by the protist predator. This has, however, yet to be studied experimentally using live prey. The release of signal molecules, such as amino acids, may also be expected to change with the nutritional status of phytoplankton cells (Granum et al. 2002), because amino acids act as attractants for many protists, including flagellates and ciliates (e.g. Sibbald et al. 1987). However, there is presently no direct evidence demonstrating that chemoreception (searching) is responsible for changes in selective feeding in relation to **prey nutrient stoichiometry**.

Other prey variables that potentially affect this type of selective feeding behaviour have been mentioned **above** (see section 'Developing an appreciation for the mechanisms of protistan feeding') and include the release of defence metabolites, changes in prey size, motility, charge, and, hydrophobicity (Matz et al. 2002, Pohnert et al. 2007). How these factors vary with prey physiological state, and hence affect selective feeding, clearly requires further investigation to better understand observed selective feeding behaviour.

Future directions

It is evident that a better understanding of the underlying biochemical mechanisms determining selective feeding behaviour is required. Within the last 2 decades, substantial progress has been made in identifying molecular aspects of cell recognition and prey detection in model protist species. However, we still have a limited understanding of the relevance of these mechanisms in a broader ecological context. To address this, we suggest the following avenues for future work.

Understanding the mechanisms behind the detection of dissolved chemical cues. Biochemical, molecular, and genomic studies have enabled the identification of many molecular components that participate in the regulation of chemotaxis, e.g. for the social amoeba *Dictyostelium* (Parent & Devreotes 1999, Chung et al. 2001, Jin & Hereld 2006) and for the model ciliate *Paramecium* (Van Houten et al. 2000, Bell et al. 2007). A similar approach needs to be pursued for a broader range of environmentally relevant protists, focusing on the determination of the ecological and biogeochemical relevance of chemosensory behaviour (e.g. Hartz et al. 2008). We see this cross-disciplinary avenue of research as an opportunity for future collaboration of researchers in a variety of fields.

Unravelling the mechanisms involved in cell surface recognition. Initial work has been undertaken to improve our understanding of cell surface biochemical prey recognition by protists. Several potential phagocytic receptors and prey ligands to which they bind have now been identified for protists (Allen & Dawidowicz 1990, Venkataraman et al. 1997, Sakaguchi et al. 2001, Wootton et al. 2007). Further work should involve the identification and purification of additional receptors, and subsequent characterization of their role in selective feeding. As genomes of an increasing number of protists are being sequenced, proteomic analysis of phagosomes and cell surface proteins should prove useful in revealing potential prey recognition receptors. This technique has already enabled an increased understanding of the molecular mechanisms behind phagocytosis in the model protists

Tetrahymena, *Entamoeba*, and *Dictyostelium* (Rezabek et al. 1997, Okada et al. 2005, Jacobs et al. 2006). Again, we see the next step as applying and adapting techniques to more ecologically relevant taxa, first in the laboratory and then, once appropriate methods are established, in the field.

Determining the relevance of these mechanisms in selective feeding. Identification and characterisation of receptors and ligands involved in the response to dissolved chemical cues and in cell surface recognition will improve our ability to study molecular aspects of feeding in isolation (Fig. 1). We may find that, for many protists, molecular mechanisms mainly act to increase feeding efficiency on live prey in general and do not play a major role in determining selection between different prey species. For highly specialized protist predators, however, biochemical prey recognition is likely to drive feeding behaviour and prey selectivity. For instance, dinoflagellates often exhibit a high degree of prey specificity (Hansen & Calado 1999, Tillmann 2004). For example, the mixotroph *Fragilidium subglobosum* feeds exclusively on species from the genus *Ceratium*, preferring *Ceratium tripos* to *Ceratium furca* or *Ceratium fusus* (Skovgaard 1996, Hansen & Nielsen 1997), and the mixotrophs *Ceratium* and *Dinophysis* feed predominantly on ciliates (Jacobson & Andersen 1994, Smalley et al. 1999). The mechanisms behind these extreme examples of selectivity are presently unknown. Planktonic host–parasite interactions are also expected to involve biochemical cell recognition, with one strain of the endoparasitic dinoflagellate *Amoebophrya* sp. only being capable of infecting species of the genus *Alexandrium* when presented with a range of potential dinoflagellate host species (Kim 2006). Without further knowledge of the mechanisms involved in prey recognition, we lack a fundamental understanding of how protist predators feed and hence will experience difficulties in applying the findings of isolated laboratory and field experiments to natural assemblages as a whole. It is clear that the environmental implications of this research area require continued consideration.

PLACING THE OBSERVATIONS IN A LARGER CONTEXT

The past several decades of research on microbial food webs and, specifically, on protist selective feeding have dramatically changed our perception of microbial feeding interactions. Protists are increasingly recognised as highly specialised consumers. Having unravelled so many mysteries of selective feeding by protists, we are now beginning to place the pieces into context. In this final section, we have identified several broad avenues towards this ultimate goal.

Towards a general picture

First, we must identify general patterns and dominant peculiarities related to feeding behaviours. However, in contrast to our recognition of the great diversity of protists (Vaulot et al. 2002, Baldauf 2003), current knowledge of different feeding behaviours remains largely based on limited field and laboratory experiments, focusing on either functional groups (Šimek et al. 2000) or few laboratory weed species (e.g. Fenchel 1984, Boenigk & Arndt 2000). The relevance of the discovered selection mechanisms must be critically evaluated using prey organisms that are important in the field (Wu et al. 2004). Again, there is an ultimate need for isolating and culturing many more protist strains as a basis for in-depth investigations of specific behaviours and selection mechanisms. We encourage culture collections, researchers, and funding agencies to recognise this need.

Linking food selection with the natural environment

In situ feeding behaviour in phagotrophic protists can be regulated both by their internal environment (e.g. feeding ultrastructures, chemoreception capacities, physiological state, feeding history) and the external environment. The external environment includes variables dependent on the availability and characteristics of prey (e.g. abundance, size, mobility, biochemical composition, physiological state, surface characteristics, grazing resistance properties) and variables independent of prey. Among the latter, temperature (Sherr et al. 1988, Tobiasen 1990), light intensity (Stoecker & Guillard 1982, Hansen & Nielsen 1997, Strom 2001), ultraviolet radiation (Hessen et al. 1997, Ochs & Eddy 1998), nutrient concentrations (Ucko et al. 1994, Legrand et al. 1998, Granéli & Johansson 2003), turbulence (Shimeta et al. 1995, Peters et al. 1996, Dolan et al. 2003), suspended non-grazable particles (Hansen et al. 1991, Boenigk & Novarino 2004), and bioactive compounds and particularly toxic compounds (Hoffman & Atlas 1987, Al-Rasheid & Sleight 1994) can regulate feeding activity in phagotrophic protists, but their role in selective feeding has rarely been specifically investigated. Most of these abiotic external variables can either directly affect the feeding behaviour of phagotrophic protists, or indirectly influence them through changes upon their prey. These external variables can potentially impact all 6 discrete feeding phases of phagotrophic protists (Fig 1), and, in case their impacts are prey-dependent, feeding selectivity will also be altered. If we plan to extrapolate the findings of laboratory and field studies on protist selective feeding to the natural aquatic environment, then we must attempt to better mimic the variables that con-

trol selective feeding behaviour. Therefore, although our assessment has focused primarily on the organisms, we remind the reader not to forget the external environment.

Linking food selection with food web effects

Once the key components and controls have been adequately identified, the next big issue will be to place food selection behaviours (individual and general) into the context of food web interactions. *In situ*, the protistan grazer community and related aspects of its prey selectivity are obviously shaped both by inherent bottom-up factors and predation pressure on protists themselves. Furthermore, once we recognise the mechanisms associated with selectivity, we will be better prepared to examine how abiotic factors (turbulence, light, temperature, pH) may alter behaviours. The interplay of these factors can regulate community dynamics and selectivity of protists *in situ* (e.g. Šimek et al. 2006). Ultimately, these aspects must not be forgotten in either field studies or model simulations of ecosystem dynamics.

Historically, mathematical ecosystem models have paid relatively little attention to protist grazing, never mind selectivity (Davidson 1996), but authors such as Flynn (2006) argue strongly for the inclusion of mechanistic processes such as protist selective grazing in such models. A small suite of studies have attempted to use models to examine particular aspects of selective grazing with a focus on microbial cell size distribution and predator–prey dynamics (Kiefer & Berwald 1992, Strom & Loukos 1998). Such attempts need to be extended, specifically considering the molecular and behavioural basis of food selection as generally outlined above.

An operational model of selective protist grazing based on our schematic representation in Fig. 1 would contain a very large number of parameters, which would require considerable advances in experimental technique, as discussed above (see sections 'Examining behaviours at the population and single cell levels' and 'Examining behaviours at the molecular and physiological levels'). An initial challenge to modelling will, therefore, be to conduct sensitivity analyses of simple models of selective grazing, based on structures similar to those outlined above (Fig. 1), to assess the parameters most critical to model performance. This in turn will guide future experimental efforts. Therefore, we encourage and applaud the continued interdisciplinary collaborations of modellers and experimental scientists who integrate potentially important subtleties such as feeding behaviour into the larger ecosystem context.

From behaviour to element flow

Ultimately, many ecosystem studies focus on the flow of biomass, typically represented by carbon, nitrogen, or phosphorus. In this paper, we have primarily dealt with prey selection based on taxa. Even more complex, however, are the links between protist food selection and element transfer in food webs. For instance, differential digestion, element conversion, and metabolic pathways will further modify the feeding interactions. With respect to nutrition and element flow, these factors must ultimately be considered as part of the selection process (Boenigk et al. 2002, Mitra & Flynn 2005, Davidson et al. 2007).

Some modelling work has addressed these issues of element flow with specific relevance to selectivity. For example, Stolte et al. (2007) modelled the effect of allochthonous dissolved organic matter on grazing on poorly edible phytoplankton, and Davidson et al. (1995a, 1995b) used the C:N ratio of prey and predator as indices of the potential for selectivity. Furthermore, recent theoretical work has developed models that incorporate aspects of protistan selective grazing; e.g. Mitra et al. (2003) and Mitra & Flynn (2005) developed models that incorporate factors such as variable maximum ingestion rate, assimilation efficiency, and 'stoichiometric modulations'. We consider the extension of such approaches to be a logical avenue for future progress in ecosystem food web ecology. However, we emphasise two caveats: the modelling must not be conducted in isolation; it requires sound parameterisation by laboratory work and continued 'ground-truthing' through field studies.

Experimental design

Underlying laboratory and field studies as well as model applications of concepts and parameters, we must remember that there is a need for good experimental design and data analysis. Although not explicitly dealt with in this paper, we know, from our collective experiences, that an unacceptable portion of the work on selective feeding (some published and much unpublished) is based on an inadequate foundation (i.e. poor experimental design and inappropriate numerical-statistical analysis). Here, we have encouraged several avenues for experimentation and observation on protistan feeding behaviours, in places suggesting state-of-the-art technologies, many of which will produce copious data. We also encourage continued careful design of experiments, e.g. considering pseudoreplication (Hurlbert 1984), the number of replicates (Roa 1992), and even whether or not to replicate at all (Montagnes & Berges 2004).

From mechanisms towards selection

In conclusion, we emphasise that there is a need to identify the key processes that are applicable across systems; i.e. the comparison of free-living protist food selection with that of metazoa and parasitic protists. Identifying similarities and dissimilarities and the fundamental mechanisms behind these patterns will certainly reveal key underlying processes and critical differences. We have not dwelt on the massive literature on selective feeding that exists beyond the protists (e.g. Brooks & Dodson 1965), but this must always be considered, and the uninitiated reader is encouraged to do so. However, once general selection mechanisms (e.g. Fig. 1) are identified, quantified, and considered in a larger context, the next challenge will be to analyse their impact on *in situ* feeding interactions (Jezbera et al. 2006). Continued interaction and dialogue between researchers studying selective feeding in the laboratory and field is essential, and we thank SAME 10 for providing the opportunity for such a discourse and encourage its continuation, both informally and formally, through other meetings.

Acknowledgements. We thank the organizing committee of SAME 10 (10th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Faro, Portugal, September 2007), particularly its coordinator H. Galvão and the local organizing committee. We thank E. Wootton, J. Thurman, C. Dixon, and H. Jakobsen for their constructive comments. We also thank P. del Giorgio for his encouragement and guidance in assembling this document. The following funding agencies provided support for our participation in this work: J.B. was partially funded by the FWF grant P 19706; K.D. was partially supported by the SAMS/NERC Oceans 2025 program; M.M. was supported by the projects PAPIIT IN207206 and CONACYT 52387; D.J.S.M was partially supported by the British Council; K.Š. was partially supported by the GACR under research grant 206/08/0015; J.D.P. was supported by the Leverhulme Trust research grant F/00 185/S and the Faculty of Science & Technology Travel Fund, Lancaster University; E.C.R. was partially supported by NERC grant NER/M/S/2003/00052.

LITERATURE CITED

- Allen PG, Dawidowicz EA (1990) Phagocytosis in *Acanthamoeba*. 1. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. *J Cell Physiol* 145: 508–513
- Al-Rasheid KAS, Sleight MA (1994) The effects of heavy metals on the feeding rate of *Euplotes mutabilis* (Tuffrau, 1960). *Eur J Protistol* 30:270–279
- Andersen OK, Goldman JC, Caron DA, Dennett MR (1986) Nutrient cycling in a microflagellate food-chain: III. Phosphorus dynamics. *Mar Ecol Prog Ser* 31:47–55
- Andersen OR, Lee JJ, Faber WW Jr (1991) Collection, maintenance and culture methods for the study of living foraminifera. In: Lee JJ, Anderson OR (eds) *Biology of Foraminifera*. Academic Press, London, p 335–358
- Baldauf SL (2003) The deep roots of eukaryotes. *Science* 300:1703–1706
- Bell WE, Preston RR, Yano J, Van Houten JL (2007) Genetic dissection of attractant-induced conductances in *Paramecium*. *J Exp Biol* 210:357–365
- Berge T, Hansen PJ, Moestrup Ø (2008) Feeding mechanisms prey specificity and growth in light and dark of the plastidic dinoflagellate *Karlodinium armiger*. *Aquat Microb Ecol* 50:279–288
- Berryman AA (1992) The origins and evolution of predator-prey theory. *Ecology* 73:1530–1535
- Boenigk J (2005) Some remarks on strain specificity and general patterns in the ecology of *Spumella* (Chrysophyceae). *Nova Hedwigia* 128:167–178
- Boenigk J, Arndt H (2000) Particle handling during interception feeding by four species of heterotrophic nanoflagellates. *J Eukaryot Microbiol* 47:350–358
- Boenigk J, Arndt H (2002) Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Ant Leeuwenhoek* 81:465–480
- Boenigk J, Novarino G (2004) Effect of suspended clay on the feeding and growth of bacterivorous flagellates and ciliates. *Aquat Microb Ecol* 34:181–192
- Boenigk J, Matz C, Jürgens K, Arndt H (2001a) Influence of preculturing conditions and food quality on the ingestion and digestion processes of three species of heterotrophic nanoflagellate. *Microb Ecol* 42:168–176
- Boenigk J, Matz C, Jürgens K, Arndt H (2001b) Confusing selective feeding with differential digestion in bacterivorous nanoflagellates. *J Eukaryot Microbiol* 48:425–432
- Boenigk J, Matz C, Jürgens K, Arndt H (2002) Food concentration-dependent regulation of food selectivity of interception-feeding bacterivorous nanoflagellates. *Aquat Microb Ecol* 27:195–202
- Brooks JL, Dodson SI (1965) Predation, body size and composition of plankton. *Science* 150:28–35
- Buskey EJ (1997) Behavioral components of feeding selectivity of the heterotrophic dinoflagellate *Protopruderis pellucidum*. *Mar Ecol Prog Ser* 153:77–89
- Buskey EJ, Stoecker DK (1988) Locomotory patterns of the planktonic ciliate *Favella* sp.: adaptations for remaining within food patches. *Bull Mar Sci* 43:783–796
- Buskey EJ, Stoecker DK (1989) Behavioral responses to the marine tintinnid *Favella* sp. to phytoplankton: influence of chemical, mechanical and photic stimuli. *J Exp Mar Biol Ecol* 132:1–16
- Butler H, Rogerson A (1997) Consumption rates of six species of marine benthic naked amoebae (*Gymnoamoeba*) from sediments in the Clyde sea area. *J Mar Biol Assoc UK* 77:989–997
- Caron DA, Gobler CJ, Lonsdale DJ, Cerrato RM and others (2004) Microbial herbivory on the brown tide alga, *Aureococcus anophagefferens*: results from natural ecosystems, mesocosms and laboratory experiments. *Harmful Algae* 3:439–457
- Christaki U, Dolan JR, Pelegri S, Rassoulzadegan F (1998) Consumption of picoplankton-size particles by marine ciliates: effects of physiological state of the ciliate and particle quality. *Limnol Oceanogr* 43:458–464
- Christensen-Dalsgaard KK, Fenchel T (2003) Increased filtration efficiency of attached compared to free-swimming flagellates. *Aquat Microb Ecol* 33:77–86
- Chung CY, Funamoto S, Firtel RA (2001) Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci* 26:557–566
- Cleven EJ (2004) Pelagic ciliates in a large mesotrophic lake: seasonal succession and taxon-specific bacterivory in Lake Constance. *Int Rev Gesamten Hydrobiol* 89:289–304

- Crawford DW (1992) Metabolic cost of motility in planktonic protists—theoretical considerations on size scaling and swimming speed. *Microb Ecol* 24:1–10
- Davidson K (1996) **Modelling microbial food webs**. *Mar Ecol Prog Ser* 145:279–296
- Davidson K, Cunningham A, Flynn KJ (1995a) Predator–prey interactions between *Isochrysis galbana* and *Oxyrrhis marina*. III. Mathematical modelling of predation and nutrient regeneration. *J Plankton Res* 17:465–492
- Davidson K, Flynn KJ, Cunningham A (1995b) A first attempt of model factors affecting the ingestion of prey by the dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. *Cytology* 37:969–977
- Davidson K, Roberts EC, Wilson AM, Mitchell E (2005) The role of prey nutritional status in governing protozoan nitrogen regeneration efficiency. *Protist* 156:45–62
- Davidson K, Gilpin LC, Hart M, Fouillard E and others (2007) The influence of the balance of inorganic and organic nitrogen on microbial food web dynamics. *Limnol Oceanogr* 52:2147–2163
- Davis DP, Fiekers JF, Van Houten JL (1998) Intracellular pH and chemoresponse to NH_4^+ in *Paramecium*. *Cell Motil Cytoskeleton* 40:107–118
- DeLaca TE, Bernhard JM, Reilly AA, Bowser SS (2002) *Notodendrodes hyalinosphaira* (sp. nov.): structure and autoecology of an allogromiid-like agglutinated foraminifer. *J Foraminifer Res* 32:177–187
- Dolan JR, Šimek K (1997) Processing of ingested matter in *Strombidium sulcatum*, a marine ciliate (Oligotrichida). *Limnol Oceanogr* 42:393–397
- Dolan JR, Šimek K (1999) Diel periodicity in *Synechococcus* populations and grazing by heterotrophic nanoflagellates: analysis of food vacuole contents. *Limnol Oceanogr* 41:1169–1179
- Dolan JR, Sall N, Metcalfe A, Gasser B (2003) Effects of turbulence on the feeding and growth of a marine oligotrich ciliate. *Aquat Microb Ecol* 31:183–192
- Eccleston-Parry JD, Leadbeater BSC (1994) A comparison of the growth kinetics of six marine heterotrophic nanoflagellates fed with one bacterial species. *Mar Ecol Prog Ser* 105:167–177
- Ehrenberg CG (1838) Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. Voss, Leipzig
- Epstein SS, Shiaris MP (1992) Size selective grazing of coastal bacterioplankton by natural assemblages of pigmented flagellates, colourless flagellates and ciliates. *Microb Ecol* 23:211–225
- Fenchel T (1984) Suspended marine bacteria as a food source. In: Fasham MJ (ed) Flow of material and energy in marine ecosystems. Plenum Press, New York, p 301–315
- Fenchel T (1986) Protozoan filter feeding. *Prog Protistol* 1: 65–113
- Fenchel T (1987) The ecology of protozoa. Springer-Verlag, Berlin
- Fenchel T (2004) Orientation in two dimensions: chemosensory motile behaviour of *Euplotes vannus*. *Eur J Protistol* 40:49–55
- Fenchel T, Blackburn N (1999) Motile chemosensory behaviour of phagotrophic protists: mechanisms for and efficiency in congregating at food patches. *Protist* 150: 325–336
- Fenchel T, Jonsson PR (1988) The functional biology of *Strombidium sulcatum*, a marine oligotrich ciliate (Ciliophora, Oligotrichina). *Mar Ecol Prog Ser* 48:1–15
- Ferrier-Pagès C, Rassoulzadegan F (1994) Seasonal impact of the microzooplankton on pico- and nanoplankton growth rates in the northwest Mediterranean Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 108:283–294
- Ferrier-Pagès C, Karner M, Rassoulzadegan F (1998) Release of dissolved amino acids by flagellates and ciliates grazing on bacteria. *Oceanol Acta* 21:485–494
- Flynn KJ (2006) Reply to Horizons Article 'Plankton functional type modelling: running before we can walk' Anderson (2005): II. Putting trophic functionality into plankton functional types. *J Plankton Res* 28:873–875
- Flynn KJ, Davidson K (1993) Predator–prey interactions between *Isochrysis galbana* and *Oxyrrhis marina* II. Release of non-protein amines and faeces during predation of *Isochrysis*. *J Plankton Res* 15:893–905
- Flynn KJ, Davidson K, Cunningham A (1996) Prey selection and rejection by a microflagellate; implications for the study and operation of microbial food webs. *J Exp Mar Biol Ecol* 196:357–372
- Fok AK, Lee Y, Allen RD (1982) The correlation of digestive pH and size with digestive cycle in *Paramecium caudatum*. *J Protozool* 24:502–507
- Gilbert JJ (1987) The *Polyarthra* escape from response: defence against interference from *Daphnia*. *Hydrobiologia* 147:235–238
- Gonzalez JM, Iriberry J, Egea L, Barcina I (1990) Differential rates of digestion of bacteria by freshwater and marine phagotrophic protozoa. *Appl Environ Microbiol* 56: 1851–1857
- Granéli E, Johansson N (2003) Effects of the toxic haptophyte *Prymnesium parvum* on the survival and feeding of a ciliate: the influence of different nutrient conditions. *Mar Ecol Prog Ser* 254:49–56
- Granum E, Kirkvold S, Mykkestad SM (2002) Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Mar Ecol Prog Ser* 242: 83–94
- Hahn MW, Höfle MG (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 35:113–121
- Hansen PJ (1989) The red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarense*: effect on behaviour and growth of a tintinnid ciliate. *Mar Ecol Prog Ser* 53:105–116
- Hansen PJ (1992) Prey size selection, feeding rates and growth dynamics of heterotrophic dinoflagellates with special emphasis on *Gyrodinium spirale*. *Mar Biol* 114: 327–334
- Hansen PJ, Calado AJ (1999) Phagotrophic mechanisms and prey selection in free-living dinoflagellates. *J Eukaryot Microbiol* 46:382–383
- Hansen PJ, Nielsen TG (1997) Mixotrophic feeding of *Fragilidium subglobosum* (Dinophyceae) on three species of *Ceratium*: effects of prey concentration, prey species and light intensity. *Mar Ecol Prog Ser* 147:187–196
- Hansen B, Hansen PJ, Nielsen TG (1991) Effects of large non-grazable particles on clearance and swimming behaviour of zooplankton. *J Exp Mar Biol Ecol* 152:257–269
- Hartz AJ, Sherr BF, Sherr EB (2008) Using inhibitors to investigate the involvement of cell signaling in predation by marine phagotrophic protists. *J Eukaryot Microbiol* 55:18–21
- Hausmann K (2002) Food acquisition, food ingestion and food digestion by protists. *Jpn J Protozool* 35:85–95
- Hessen DO, De Lange HJ, Van Donk E (1997) UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshw Biol* 38:513–524
- Hoffman RL, Atlas RM (1987) Measurement of the effects of cadmium stress on protozoan grazing of bacteria (bacterivory) in activated sludge by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* 53:2440–2444
- Holen DA, Boraas E (1991) The feeding behavior of *Spumella* sp. as a function of particle size: implications for bacterial

- size in pelagic systems. *Hydrobiologia* 220:73–88
- Hurlbert SH (1984) Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecol Monogr* 54:187–211
- Jacobs ME, DeSouza LV, Samaranyake H, Pearlman RE, Siu KW, Klobutcher LA (2006) The *Tetrahymena thermophila* phagosome proteome. *Euk Cell* 5:1990–2000
- Jacobson DM, Anderson DM (1994) The discovery of mixotrophy in photosynthetic species of *Dinophysis* (Dinophyceae): light and electron microscopical observations of food vacuoles in *Dinophysis acuminata*, *D. norvegica* and two heterotrophic dinophysoid dinoflagellates. *Phycologia* 33:97–110
- Jacobson DM, Anderson DM (1996) Widespread phagocytosis of ciliates and other protists by mixotrophic and heterotrophic thecate dinoflagellates. *J Phycol* 32:279–285
- Jakobsen HH (2002) Escape of protists in predator-generated feeding currents. *Aquat Microb Ecol* 26:271–281
- Jakobsen HH, Hansen PJ (1997) Prey size selection, grazing and growth response of the small heterotrophic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. and the ciliate *Balanion comatum*—a comparative study. *Mar Ecol Prog Ser* 158:75–86
- Jakobsen HH, Tang KW (2002) Effects of protozoan grazing on colony formation in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the potential costs and benefits. *Aquat Microb Ecol* 27:261–273
- Jakobsen HH, Everett LM, Strom SL (2006) Hydromechanical signaling between the ciliate *Mesodinium pulex* and motile protist prey. *Aquat Microb Ecol* 44:197–206
- Jennings HS (1906) Behaviour of lower organisms. Columbia University Press, New York, p 41–70
- Jeong HJ, Yoo YD, Seong KA, Kim JH and others (2005) Feeding by the mixotrophic red-tide dinoflagellate *Gonyaulax polygramma*: mechanisms, prey species, effects of prey concentration, and grazing impact. *Aquat Microb Ecol* 38:249–257
- Jeong HJ, Ha J, Yoo YD, Park JY and others (2007) Feeding by the *Pfiesteria*-like heterotrophic dinoflagellate *Luciella masanensis*. *J Eukaryot Microbiol* 54:231–241
- Ježbera J, Horňák K, Šimek K (2005) Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of Fluorescence In Situ Hybridization. *FEMS Microbiol Ecol* 52:351–363
- Ježbera J, Horňák K, Šimek K (2006) Prey selectivity of bacterivorous protists in different size fractions of reservoir water amended with nutrients. *Environ Microbiol* 8:1330–1339
- Jin T, Hereld D (2006) Moving toward understanding eukaryotic chemotaxis. *Eur J Cell Biol* 85:905–913
- John EH, Davidson K (2001) Prey selectivity and the influence of prey carbon:nitrogen ratio on microflagellate grazing. *J Exp Mar Biol Ecol* 260:93–111
- Jonsson PR (1986) Particle-size selection, feeding rates and growth dynamics of marine planktonic oligotrichous ciliates (Ciliophora: Oligotrichina). *Mar Ecol Prog Ser* 33:265–277
- Jürgens K, DeMott WR (1995) Behavioral flexibility in prey selection by bacterivorous nanoflagellates. *Limnol Oceanogr* 40:1503–1507
- Jürgens K, Massana R (2008) Protist grazing on marine bacterioplankton. In: Kirchman DL (ed) *Microbial ecology of the oceans*, 2nd edn. Wiley-Liss, p 383–441
- Jürgens K, Matz C (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Ant Leeuwenhoek* 81:413–434
- Kamiyama T (1997) Growth and grazing responses of tintinnid ciliates feeding on the toxic dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Mar Biol* 128:509–515
- Kiefer DA, Berwald J (1992) A random encounter model for the microbial planktonic community. *Limnol Oceanogr* 37:457–467
- Kim S (2006) Patterns in host range for two strains of *Amoebophrya* (Dinophyta) infecting thecate dinoflagellates: *Amoebophrya* spp. ex *Alexandrium affine* and ex *Gonyaulax polygramma*. *J Phycol* 42:1170–1173
- Kjørboe T, Titelman J (1998) Feeding, prey selection and prey encounter mechanisms in the heterotrophic dinoflagellate *Noctiluca scintillans*. *J Plankton Res* 20:1615–1636
- Kjørboe T, Saiz E, Viitasalo M (1996) Prey switching behaviour in the planktonic copepod *Acartia tonsa*. *Mar Ecol Prog Ser* 143:65–75
- Kjørboe T, Grossart HP, Ploug H, Tang KW, Auer B (2004) Particle-associated flagellates: swimming patterns, colonization rates, and grazing on attached bacteria. *Aquat Microb Ecol* 35:141–152
- Kirk KL, Gilbert JJ (1988) Escape behavior of *Polyarthra* in response to artificial flow stimuli. *Bull Mar Sci* 43:551–560
- Kopp M, Tollrian R (2003a) Trophic size polyphenism in *Lembadion bullinum*: costs and benefits of an inducible offense. *Ecology* 84:641–651
- Kopp M, Tollrian R (2003b) Reciprocal phenotypic plasticity in a predator-prey system: inducible offences against inducible defences? *Ecol Lett* 6:742–748
- Kremp A, Anderson DM (2004) Lectin binding patterns of *Scrippsiella lachrymosa* (Dinophyceae) in relation to cyst formation and nutrient conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 307:165–181
- Kuhlmann HW, Kusch J, Heckmann K (1999) Predator-induced defenses in ciliated protozoa. In: Tollrian R, Harvell C (eds) *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press, Princeton, NJ, p 142–159
- Landry MR (1994) Methods and controls for measuring the grazing impact of planktonic protists. *Mar Microb Food Webs* 8:37–57
- Landry MR, Hassett RP (1982) Estimating the grazing impact of marine micro-zooplankton. *Mar Biol* 67:283–288
- Laureillard J, Méjanelle L, Sibuet M (2004) Use of lipids to study the trophic ecology of deep-sea xenophyophores. *Mar Ecol Prog Ser* 270:129–140
- Legrand C, Granéli E, Carlsson P (1998) Induced phagotrophy in the photosynthetic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Aquat Microb Ecol* 15:65–75
- Leick V, Lindemose S (2007) Chemokinesis by *Tetrahymena* in response to bacterial oligopeptides. *J Eukaryot Microbiol* 54:271–274
- Leick V, Koppelhus U, Rosenberg J (1994) Cilia-mediated oriented chemokinesis in *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* 41:546–553
- Long JD, Smalley GW, Barsby T, Anderson JT, Hay ME (2007) Chemical cues induce consumer-specific defenses in a bloom-forming marine phytoplankton. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10512–10517
- Martel CM (2006) Prey location, recognition, and ingestion by the phagotrophic marine dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. *J Exp Mar Biol Ecol* 335:210–220
- Matsuoka A (2007) Living radiolarian feeding mechanisms: new light on past marine ecosystems. *Swiss J Geosci* 100:273–279
- Matz C, Jürgens K (2001) Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria on feeding rates of heterotrophic nanoflagellates. *Appl Environ Microbiol* 67:814–820
- Matz C, Jürgens K (2005) High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71:921–929

- Matz C, Boenigk J, Arndt H, Jürgens K (2002) Role of bacterial phenotypic traits in selective feeding of the heterotrophic nanoflagellate *Spumella* sp. *Aquat Microb Ecol* 27:137–148
- Matz C, Deines P, Boenigk J, Arndt H, Eberl L, Kjelleberg S, Jürgens K (2004) Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl Environ Microbiol* 70:1593–1599
- Menden-Deuer S, Grunbaum D (2006) Individual foraging behaviors and population distributions of a planktonic predator aggregating to phytoplankton thin layers. *Limnol Oceanogr* 51:109–116
- Mitra A, Flynn KJ (2005) Predator–prey interactions: is ‘ecological stoichiometry’ sufficient when good food goes bad? *J Plankton Res* 27:393–399
- Mitra A, Davidson K, Flynn KJ (2003) The influence of changes in predation rates on marine microbial predator/prey interaction: a modelling study. *Acta Oecol* 24: S359–S367
- Monger BC, Landry MR, Brown SL (1999) Feeding selection of heterotrophic marine nanoflagellates based on the surface hydrophobicity of their picoplankton prey. *Limnol Oceanogr* 44:1917–1927
- Montagnes DJS, Berges JA (2004) Determining parameters of the numerical response. *Microb Ecol* 48:139–144
- Montagnes DJS, Lessard EJ (1999) Population dynamics of the marine planktonic ciliate *Strombidinopsis multiauris*: its potential to control phytoplankton blooms. *Aquat Microb Ecol* 20:167–181
- Morelli A, Verni N (1996) Predator–prey interactions: effects of the substances released by the prey *Euplotes crassus* (Protozoa, Ciliata) on the predator *Litonotus lamella* (Protozoa, Ciliata). *Microbios* 87:185–198
- Murray JW (1991) Ecology and distribution of planktonic foraminifera. In: Lee JJ, Anderson OR (eds) *Biology of foraminifera*. Academic Press, London, p 255–284
- Nanny DL (1980) *Experimental ciliophorology: an introduction to genetic and developmental analysis in ciliates*. John Wiley & Sons, New York
- Nomaki HN, Heinz P, Nakatsuka T, Shimanaga M and others (2006) Different ingestion patterns of ¹³C-labeled bacteria and algae by deep-sea benthic foraminifera. *Mar Ecol Prog Ser* 310:95–108
- Ochs CA, Eddy LP (1998) Effects of UV-A (320 to 399 nm) on grazing pressure of a marine heterotrophic nanoflagellate on strains of the unicellular cyanobacteria *Synechococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* 64:287–293
- Okada M, Huston CD, Mann BJ, Petri WA, Kita K, Nozaki T (2005) Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* 4:827–831
- Paffenhöfer GA, Sherr BF, Sherr EB (2007) From small scales to the big picture: persistence mechanisms of planktonic grazers in the oligotrophic ocean. *Mar Ecol Evol Persp* 28:243–253
- Page FC (1988) A new key to freshwater and soil Gymnamoebae, with instructions for culture. *Freshwater Biological Association, Ambleside*
- Pajdak-Stós A, Fialkowska E, Fyda J (2001) *Phormidium autumnale* (Cyanobacteria) defense against three ciliate grazer species. *Aquat Microb Ecol* 23:237–244
- Parent CA, Devreotes PN (1999) A cell’s sense of direction. *Science* 284:765–770
- Park MG, Kim S, Kim HS, Myung G, Kang YG, Yih W (2006) First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Aquat Microb Ecol* 45:101–106
- Parry JD (2004) Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv Appl Microbiol* 54:167–196
- Pernthaler J (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol* 3:537–546
- Peters F, Choi JW, Gross T (1996) *Paraphysomonas imperforata* (Protista, Chryomonadida) under different turbulence levels: feeding, physiology and energetics. *Mar Ecol Prog Ser* 134:235–245
- Pettitt ME, Orme BAA, Blake JR, Leadbeater BSC (2002) The hydrodynamics of filter feeding choanoflagellates. *Eur J Protistol* 38:313–332
- Pfandl K (2003) Characterization of size selectivity by filter and interception feeding protists (*Cyclidium glaucoma*, *Ochromonas* sp., *Spumella* sp.) using epifluorescence- and video microscopy. Diploma thesis, University of Innsbruck
- Pfandl K, Posch T, Boenigk J (2004) Unexpected effects of prey dimensions and morphologies on the size selective feeding by two bacterivorous flagellates (*Ochromonas* sp. and *Spumella* sp.). *J Eukaryot Microbiol* 51:626–633
- Pfister G, Arndt H (1998) Food selectivity and feeding behaviour in omnivorous filter-feeding ciliates: a case study for *Stylonychia*. *Eur J Protistol* 34:446–457
- Pickup ZL, Pickup R, Parry JD (2007) Growth of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* on live, heat-killed and DTAF-stained bacterial prey. *FEMS Microbiol Ecol* 61:264–272
- Pohnert G, Steinke M, Tollrian R (2007) Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends Ecol Evol* 22:198–204
- Rassoulzadegan F (1982) Feeding in marine planktonic protozoa. *Ann Inst Oceanogr Paris (Nouv Ser)* 58:191–205 (Suppl S)
- Rezabek BL, Rodriguez-Paris JM, Cardelli JA, Chia CP (1997) Phagosomal proteins of *Dictyostelium discoideum*. *J Eukaryot Microbiol* 44:284–292
- Roa R (1992) Design and analysis of multiple-choice feeding-preference experiments. *Oecologia* 89:509–515
- Ronn R, McCraig AE, Griffiths BS, Prosser JI (2002) Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol* 68:6094–6105
- Sakaguchi M, Murakami H, Suzaki T (2001) Involvement of a 40-kDa glycoprotein in food recognition, prey capture, and induction of phagocytosis in the protozoan *Actinophrys sol*. *Protist* 152:33–41
- Sanders RW (1988) Feeding by *Cyclidium* sp. (Ciliophora, Scuticociliatida) on particles of different sizes and surface-properties. *Bull Mar Sci* 43:446–457
- Seravin LN, Orlovskaja EE (1977) Feeding-behavior of unicellular animals. 1. Main role of chemoreception in food choice of carnivorous protozoa. *Acta Protozool* 16:309–332
- Shannon SP, Chrzanowski TH, Grover JP (2007) Prey food quality affects flagellate ingestion rates. *Microb Ecol* 53:66–73
- Sherr BF, Sherr EB, Fallon RD (1987) Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl Environ Microbiol* 53:958–965
- Sherr BF, Sherr EB, Rassoulzadegan F (1988) Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: temperature dependence. *Appl Environ Microbiol* 54:1091–1095
- Sherr EB, Sherr BF (1993) Protistan grazing rates via uptake of fluorescently labeled prey. In: Kemp P, Sherr BF, Sherr EB, Cole J (eds) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, p 695–701
- Sherr EB, Sherr BF (1997) Phagotrophy in aquatic microbial food webs. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (eds) *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington, DC, p 309–316

- Sherr EB, Sherr BF (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Ant Leeuwenhoek* 81:293–308
- Shimeta J, Jumars PA, Lessard EJ (1995) Influences of turbulence on suspension feeding by planktonic protozoa: experiments in laminar shear fields. *Limnol Oceanogr* 40:845–859
- Sibbald MJ, Albright LJ, Sibbald PR (1987) Chemosensory responses of a heterotrophic microflagellate to bacteria and several nitrogen compounds. *Mar Ecol Prog Ser* 36:201–204
- Šimek K, Chrzanowski TH (1992) Direct and indirect evidence of the size selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Appl Environ Microbiol* 58:3715–3720
- Šimek K, Jürgens K, Nedoma J, Comerma M, Armengol J (2000) Ecological role and bacterial grazing of *Halteria* spp.: small freshwater oligotrichs as dominant pelagic ciliate bacterivores. *Aquat Microb Ecol* 22:43–56
- Šimek K, Horňák K, Jezbera J, Nedoma J and others (2006) Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ Microbiol* 8:1613–1624
- Šimek K, Weinbauer MG, Horňák K, Jezbera J, Nedoma J, Dolan JR (2007) Grazer and virus-induced mortality of bacterioplankton accelerates development of *Flectobacillus* populations in a freshwater community. *Environ Microbiol* 9:789–800
- Skovgaard A (1996) Engulfment of *Ceratium* spp. (Dinophyceae) by the thecate photosynthetic dinoflagellate *Fragilidium subglobosum*. *Phycologia* 35:490–499
- Smalley GW, Coats DW, Adam EJ (1999) A new method using fluorescent microspheres to determine grazing on ciliates by the mixotrophic dinoflagellate *Ceratium furca*. *Aquat Microb Ecol* 17:167–179
- Stelfox-Widdicombe CE, Edwards ES, Burkill PH, Sleigh MA (2000) Microzooplankton grazing activity in the temperate and sub-tropical NE Atlantic: summer 1996. *Mar Ecol Prog Ser* 208:1–12
- Stoecker DK (1998) Conceptual models of mixotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implications. *Eur J Protistol* 34:281–290
- Stoecker DK, Guillard RRL (1982) Effects of temperature and light on the feeding rate of *Favella* sp. (Ciliated Protozoa, Suborder Tintinnina). *Ann Inst Océanogr Paris* 58(S):309–318
- Stoecker DK, Gallager SM, Langdon CJ, Davis LH (1995) Particle capture by *Favella* sp. (Ciliata, Tintinnina). *J Plankton Res* 17:1105–1124
- Stolte W, Lindstrom T, Granéli E (2007) Enhancement of poorly edible phytoplankton by allochthonous dissolved organic material: a modelling study. *Aquat Microb Ecol* 46:263–272
- Strom SL (2001) Light-aided digestion, grazing and growth in herbivorous protists. *Aquat Microb Ecol* 23:253–261
- Strom SL, Buskey EJ (1993) Feeding, growth, and behaviour of the thecate heterotrophic dinoflagellate *Oblea rotunda*. *Limnol Oceanogr* 38:965–977
- Strom SL, Loukos H (1998) Selective feeding by protozoa: model and experimental behaviors and their consequences for population stability. *J Plankton Res* 20: 831–846
- Strom S, Wolfe G, Slajer A, Lambert S, Clough J (2003) Chemical defense in the microplankton. II: Inhibition of protist feeding by beta-dimethylsulfoniopropionate (DMSP). *Limnol Oceanogr* 48:230–237
- Strom SL, Wolfe GV, Bright KJ (2007) Responses of marine planktonic protists to amino acids: feeding inhibition and swimming behavior in the ciliate *Favella* sp. *Aquat Microb Ecol* 47:107–121
- Suhr SB, Pond DW, Gooday AJ, Smith CR (2003) Selective feeding by benthic foraminifera on phytodetritus on the western Antarctic Peninsula shelf: evidence from fatty acid biomarker analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 262:153–162
- Taniguchi A, Takeada Y (1988) Feeding rate and behavior of the tintinnid ciliate *Favella tarikaensis* observed with a high speed VTR system. *Mar Microb Food Webs* 3:21–34
- Taylor WB, Berger J (1980) Micro-spatial heterogeneity in the distribution of ciliates in a small pond. *Microb Ecol* 6:27–34
- Tillmann U (2003) Kill and eat your predator: a winning strategy of the planktonic flagellate *Prymnesium parvum*. *Aquat Microb Ecol* 32:73–84
- Tillmann U (2004) Interactions between planktonic microalgae and protozoan grazers. *J Eukaryot Microbiol* 51: 156–168
- Tobiesen A (1990) Temperature dependent filtration rates and size selection in some heterotrophic microflagellates and one dinoflagellate. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol* 34:293–304
- Ucko M, Geresh S, Simon-Berkovitch B, Arad (Malis) S (1994) Predation by a dinoflagellate on a red microalga with a cell wall modified by sulphate and nitrate starvation. *Mar Ecol Prog Ser* 104:293–298
- Van Houten JL, Yang WQ, Bergeron A (2000) Chemosensory signal transduction in *Paramecium*. *J Nutr* 130:946S–949S
- Vaulot D, Romari K, Not F (2002) Are autotrophs less diverse than heterotrophs in marine picoplankton? *Trends Microbiol* 10:266–267
- Vázquez-Domínguez E, Casamayor EO, Català P, Lebaron P (2005) Different marine heterotrophic nanoflagellates affect differentially the composition of enriched bacterial communities. *Microb Ecol* 49:474–485
- Venkataraman C, Haack BJ, Bondada S, AbuKwaik Y (1997) Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J Exp Med* 186:537–547
- Verity PG (1991) Measurement and simulation of prey uptake by marine planktonic ciliates fed plastidic and aplastidic nanoplankton. *Limnol Oceanogr* 36:729–750
- Weekers PHH, Bodelier PLE, Wijen JPH, Vogels GD (1993) Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Appl Environ Microbiol* 59:2317–2319
- Weisse T (1997) Growth and production of heterotrophic nanoflagellates in a meso-eutrophic lake. *J Plankton Res* 19:703–722
- Wicklow BJ (1997) Signal-induced defensive phenotype changes in ciliates protists: morphological and ecological implications for predator and prey. *J Eukaryot Microbiol* 44:176–188
- Wildschutte H, Wolfe DM, Tamewitz A, Lawrence JG (2004) Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in Salmonella. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10644–10649
- Wolfe GV, Steinke M, Kirst GO (1997) Grazing-activated chemical response in a unicellular marine alga. *Nature* 387:894–897
- Wootton EC, Zubkov MV, Jones DH, Martel CM, Thornton CA, Roberts EC (2007) Biochemical prey recognition by planktonic protozoa. *Environ Microbiol* 9:216–222
- Wu QL, Boenigk J, Hahn MW (2004) Successful predation of filamentous bacteria by a nanoflagellate challenges current models of flagellate bacterivory. *Appl Environ Microbiol* 70:332–339

Short-term temperature change may impact freshwater carbon flux: a microbial perspective

DAVID J. S. MONTAGNES*, GARETH MORGAN*, JANE E. BISSINGER*, DAVID ATKINSON* and THOMAS WEISSE†

*School of Biological Sciences, BioSciences Building, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, UK, †Institute for Limnology of the Austrian Academy of Sciences, Mondseestr. 9, A-5310 Mondsee, Austria

Abstract

Small freshwater bodies are abundant and economically and ecologically important on a global scale. Within these, protozoa play an important role in structuring planktonic food webs and sequestering CO₂. We hypothesized that short-term (~20 days) fluctuations, of 2–10 °C, will significantly alter carbon flux associated with predator–prey interactions within the microbial planktonic food web. We examined the model ciliate, *Urotricha farcta*, which is abundant and common; it was fed the autotrophic flagellate *Cryptomonas* sp., which is also common. Laboratory experiments were conducted over relevant ranges: 8–24 °C; 0–2 × 10⁵ prey mL⁻¹. Mechanistic-phenomenological multiple regressions were developed and fit to the data to obtain relationships for (1) growth rate and volume changes of the flagellate vs. temperature and (2) growth rates, grazing, and cell volume change of the ciliate vs. temperature and prey concentration. Responses revealed interaction between temperature and prey levels on all ciliate parameters, indicating it is inappropriate to apply simple temperature corrections (e.g. *Q*₁₀) to such functions. The potential impact of such temperature changes on carbon flux was illustrated using a simple ciliate–flagellate predator–prey model, with and without the top grazer, *Daphnia*, added. The model indicated that predator–prey pulses occurred over 20 days, with the ciliate controlling the prey population. For ciliates and prey, carbon production peaked at 20 °C and rapidly decreased above and below this maximum; differences between minimum and maximum were approximately fourfold, for both prey and ciliate, with low levels at 25–30 °C and 10–15 °C. Including literature data to parameterize, the influence of the grazer *Daphnia* did not alter the prediction that the ciliate may control short-term flagellate pulses and temperature will influence these in a nonintuitive fashion.

Q1 Keywords: ■, ■, ■

Received 5 March 2008; revised version received 21 May 2008 and accepted 22 May 2008

Introduction

Because of their high productivity, freshwaters, globally and locally, can play a significant role in processing and sequestering atmospheric carbon (e.g. Schindler, 1978; O’Sullivan & Reynolds, 2003). Specifically, in these systems, the pelagic food web influences carbon flux by fixing and releasing water column CO₂ and mediating carbon losses through sedimentation and respiration (Flanagan *et al.*, 2006). Such freshwaters represent ~3% of the terrestrial surface (Downing *et al.*, 2006),

with much higher contributions in some regions (e.g. northern temperate North America and Europe), and it is noteworthy that >7.2 million of these water bodies are small, having a surface of 0.01–0.1 km² (Reynolds, 2003). As many of these will have substantial economic and social importance and are an intimate link to wetland and terrestrial ecosystems (Moss, 1998; O’Sullivan & Reynolds, 2003), there is strong impetus to study them.

Climate change will raise the average temperature of small water bodies, following predicted long-term increases (3–6 °C over the next century; Houghton, 2005), but of more immediate impact is the predicted increase in intensity and frequency of short-term variations, due

Correspondence: David J. S. Montagnes, e-mail: dmontag@liv.ac.uk

© 2008 The Authors
Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd

	G C B	1 7 0 0	B	Dispatch: 1.9.08	Journal: GCB	CE:
	Journal Name	Manuscript No.		Author Received:	No. of pages: 16	PE: xx

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

to global warming (Houghton, 2005). Furthermore, short-term warming events caused by other global processes such as the North Atlantic Oscillation will alter the temperature of small water bodies (e.g. Gerten & Adrian, 2000). Thus, large lakes are likely to change slowly, but for small water bodies and the productive shallow regions of larger lakes, temperatures will respond rapidly to air temperature (Carpenter *et al.*, 1992), and episodic changes in water temperature by $>5^{\circ}\text{C}$ over 1–2 weeks may be more common (see McKee *et al.*, 2000 for an example of the present prevalence of $>5^{\circ}\text{C}$ pulses in temperate small water bodies). In response to this prediction, we have hypothesized that short-term fluctuations, on the order of 2–10 $^{\circ}\text{C}$, will substantially influence population dynamics and carbon flux in a major component of the biota of small water bodies: predator–prey interactions within the microbial planktonic food web.

Freshwater ecosystem studies have tended to focus on the classical food web: the link between primary production and zooplankton, such as *Daphnia* (Jürgens, 1994). There is, however, a growing recognition that the microbial food web, often dominated by protozooplankton grazers, plays a significant role in these systems (e.g. Riemann & Christoffersen, 1993; Jürgens, 1994; Weisse, 2003); through it much of the organic matter produced by phytoplankton passes to flagellates and ciliates (Azam *et al.*, 1983; Porter *et al.*, 1988), with ciliates having a key role in shaping food web structure (Zingel *et al.*, 2007). Unlike most metazooplankton, ciliates have inherently rapid growth rates, often exceeding those of their prey (Weisse, 2006). There is good evidence that many of the planktonic ciliates respond rapidly to increases in prey abundance (e.g. Montagnes, 1996), and short-term pulses of a few similar species (or virtually monospecific pulses) can occur, when prey become abundant (e.g. Müller *et al.*, 1991; Wilson, 2002, see 'Discussion'). Such rapid increases may occur when prey populations are stimulated to grow (e.g. by brief increases in temperature). This component of the microbial food web may then be linked to the classical food web through zooplankton grazers such as *Daphnia* (Jürgens, 1994), as localized increases in protozoa may act as discrete regions of improved nutritional resource.

As growth of the protistan component of food webs will respond more rapidly than the metazoan components to temperature change, it seems prudent to consider localized protistan predator–prey dynamics when assessing temperature-induced changes in aquatic carbon flux, especially if these temperature effects are extreme and sufficiently short-term to not propagate up the food web. In general, we know temperature has a number of pronounced effects on protists. Their cell size (and presumably carbon content; see Menden-

Deuer & Lessard, 2000) decreases with increasing temperature by $\sim 2.5\%$ of their size at 15°C for an increase of 1°C (i.e. cell carbon content may decrease by 25% over 10°C ; Atkinson *et al.*, 2003). Temperature and prey concentrations also have unexpected, interactive effects on the growth, production, and population dynamics of protozoa and their prey (Weisse *et al.*, 2002; Kimmance *et al.*, 2006), placing into question the typical application of Q_{10} as a parameter to independently predict thermal sensitivities (Montagnes & Lessard, 1999; Montagnes *et al.*, 2003; Kimmance *et al.*, 2006). Here, we extend these works by taking an inductive approach and establish a series of carefully determined responses for a single highly relevant species that is a 'typical' freshwater protozoan (Foissner *et al.*, 1999). Then to illustrate the potential importance of these monospecific pulses, following the example of others (e.g. Davidson, 1996; Shertzer *et al.*, 2002; Fulton *et al.*, 2003), we apply our responses to an exploration of predator–prey dynamics, using a focused, minimized model. Clearly, the impact of these changes may eventually propagate through the food web and alter population and community dynamics and carbon flux. However, constructing a full food web model is not our intent, instead we apply a predator–prey model to emphasize, at a general level, that including these dynamics will significantly alter estimates of carbon flux; then we discuss the use and limitations of our responses as a predictive tool. Such integration of laboratory work and fundamental population modelling is uncommon in a single study; here we illustrate how it can be an important, iterative step before developing more complex food web models.

Specifically, in the laboratory we examined responses of the model ciliate, *Urotricha*, which occurs throughout the year, and is abundant, in oligotrophic to hypertrophic temperate, boreal, and subtropical ponds, lakes, and rivers (Foissner *et al.*, 1999; Weisse *et al.*, 2001). The ciliate was raised on the flagellate *Cryptomonas* sp., which is also common in a multitude of freshwater environments (Sommer, 1986; Dokulil, 1988; Pedrós-Alió *et al.*, 1995) and is used as a standard food in experiments with ciliates (Müller & Geller, 1993; Weisse & Montagnes, 1998; Müller & Schlegel, 1999; Montagnes & Weisse, 2000). Using these laboratory data we first develop and evaluate responses of how temperature and prey concentration influence the grazing, growth, and cell volume of the ciliate and then we use these responses to indicate how temperature may alter short-term (20 days) carbon flux in a ciliate–flagellate predator–prey model. Finally, recognizing that both *Urotricha* and *Cryptomonas* fit into the classical food web, and may be exposed to top-down control by metazooplankton (Weisse, 2003, 2006), we use literature parameters to explore the influence of adding the grazer

Daphnia to our model. Therefore, we have focused on an energetically important model system to provide insights by highlighting the temperature sensitivity of predator–prey dynamics within the microbial food web.

Materials and methods

Study organisms

The prostomatid ciliate *Urotricha farcta* (~25 μm) was isolated from the mesotrophic Lake Schöhsee, Germany (Weisse & Montagnes, 1998). The prey flagellate *Cryptomonas* sp. strain 26.80 (~10 μm) was obtained from the Culture Collection of Algae in Göttingen (Germany). Both the ciliate and prey were maintained in modified Woods Hole medium (MWC medium, Guillard & Lorenzen, 1972) at $15 \pm 1^\circ\text{C}$, throughout all experiments. Cultures were not axenic, but *U. farcta* does not feed on bacteria if suitable flagellates are abundant (Weisse *et al.*, 2001). For all experiments, both ciliate and flagellate cultures were harvested in exponential phase.

Phytoplankton (prey) response to temperature

To determine how temperature affected the prey-specific growth rate and cell volume, batch cultures were maintained at 12 temperatures (see Fig. 1) at a continuous irradiance of $\sim 55 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; cultures were suspended in double glazed, cooled or heated water baths that maintained temperatures $\pm 1^\circ\text{C}$. Before experiments, cultures were acclimated to the experimental conditions for eight generations. Then specific growth rate (μ_p , day^{-1}) was determined during exponential growth phase from measurements made over 3–5 days, from the slope of \ln abundance vs. time; note population decline at low temperatures was assumed to be a *per capita* rate (i.e. in these cases $\mu_p < 0$; see Montagnes, 1996). Abundance was determined once per day from Lugol's fixed samples (2% v/v), enumerated in a Sedgewick–Rafter chamber. Cell volume was determined from length and width measurements of 30 live, exponential-phase cells, assuming a prolate spheroid shape. Prey cell volumes were converted to carbon (C) following $C \text{ (pg)} = 0.216V^{0.939}$, where V is cell live-volume (μm^3) (Menden-Deuer & Lessard, 2000).

Ciliate response to prey and temperature

Ciliate stock cultures were maintained at 15°C . Over 5–7 days, ciliates and prey were step-wise (up to 3°C day^{-1}) acclimated to experimental prey levels and six temperatures (see Fig. 2) at $70 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$;

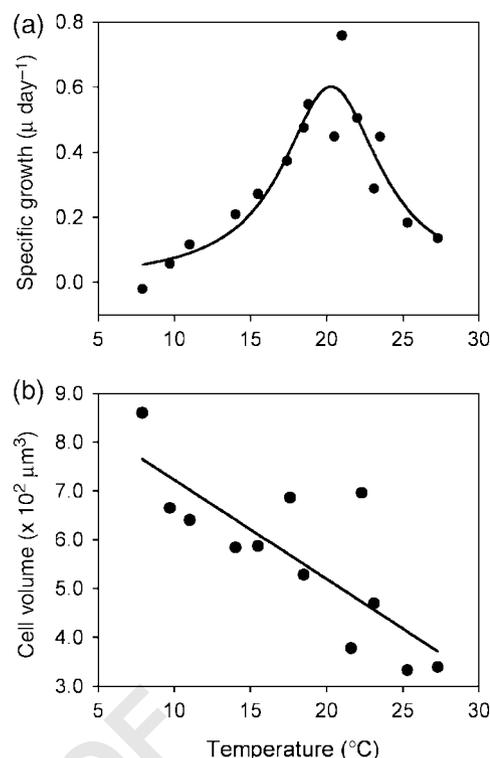
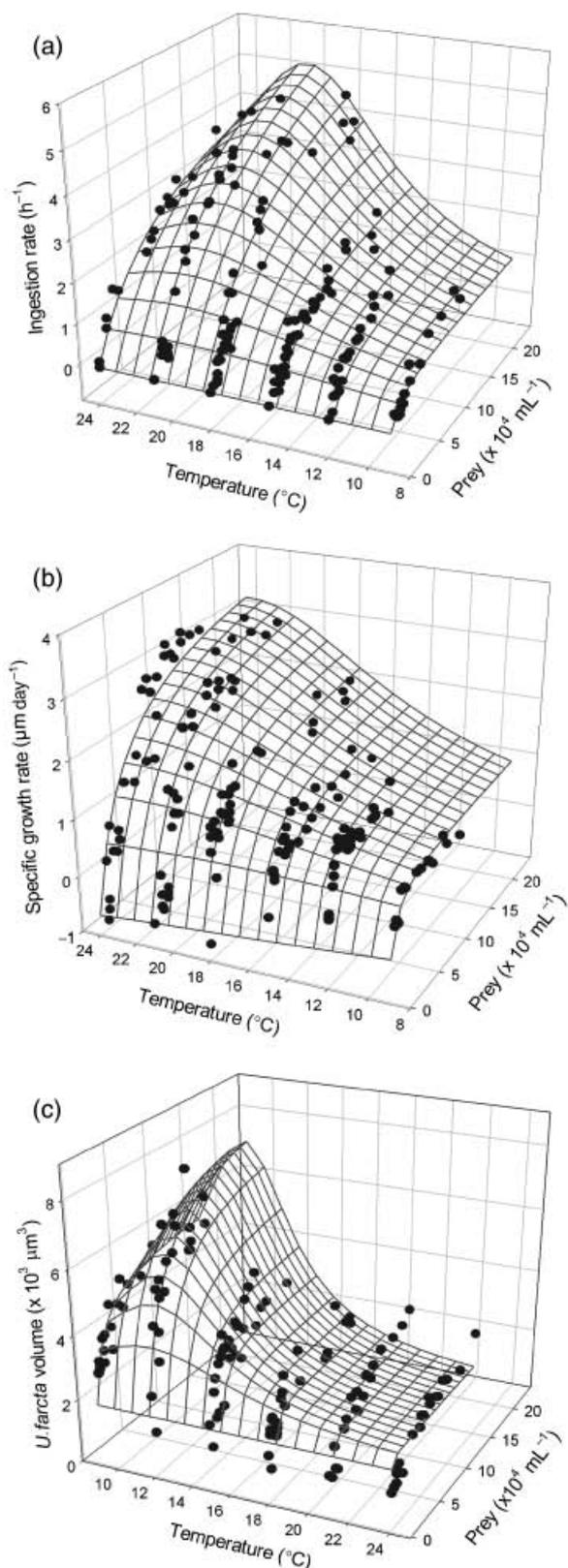


Fig. 1 The effect of temperature on specific growth rate (a) and cell volume (b) of the flagellate *Cryptomonas* sp. Points represent growth rate or cell volume measurements. The line is the fit of Eqn (4) (a) and a straight line (b) to the data; see Table 1 for the parameters of these fits and estimates of their error.

these experiments were run in incubators that maintained temperatures $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Prey levels were monitored with an electronic particle counter during the acclimation period, and ciliates were regularly fed to maintain food levels. Prey levels were maintained in exponential phase under the same temperature conditions as the ciliates.

After acclimation, ciliates were inoculated into flasks containing acclimated prey at concentrations ranging from 1.0×10^4 to $2.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ at $70 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Initial concentrations of ciliates ranged from 3.0×10^2 to $7.4 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ but in most experiments were initiated at 5.0×10^2 – $1.0 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$. Controls for prey growth, without ciliates, were run at prey and light levels identical to the ciliate–prey treatments. All cultures were maintained for 24 h at each temperature. After 12 and 24 h, prey numbers were adjusted with temperature-acclimated prey or medium alone if they deviated from the target levels by $>20\%$. The experimental incubation began immediately after this re-adjustment of prey concentrations and lasted 24 h. Each treatment was run with three to five replicates.



Samples were taken at 6–12 h intervals and fixed: for flow cytometric analyses samples were fixed with formalin (2% v/v); for microscopic analyses samples were fixed with acid Lugol's (as above). Prey and ciliate numbers were determined by flow cytometry according to our published protocols (Lindström *et al.*, 2002; Weisse *et al.*, 2002) or counted microscopically (as above).

Ciliate volumes were determined from length and width measurements, assuming a prolate spheroid shape, on >50 exponential phase ciliates obtained at the end of the experiment, from each treatment. Ciliate size measurements were made on Lugol's fixed material, which underestimates ciliate live volume by ~30% (Jerome *et al.*, 1993), and this was corrected for. Ciliate volumes were converted to carbon units using the conversion of Menden-Deuer & Lessard (2000); see above.

Ciliate grazing rate (prey ciliate⁻¹ h⁻¹) was determined from changes in growth rate of prey observed in controls, without ciliates, minus prey growth rate measured in the experimental containers with predators present, following methods outlined in Weisse *et al.* (2001).

Developing response equations

For modelling purposes, we established functions that could be used to predict predator ingestion rate, specific growth rate, and cell volume in response to varying temperature and prey concentrations. We also established responses for prey-specific growth rate and volume changes to temperature alone. These responses are presented here and further evaluated in the 'Discussion'.

Predator (ciliate) ingestion rate (I_c , prey predator⁻¹ h⁻¹) was assumed to vary with prey concentration (P , mL⁻¹), following the mechanistic, Holling Type II equation [Holling, 1959, Eqn (1)], where a and b are constants. Predator-specific growth rate (μ_c , day⁻¹) was assumed to follow a similar rectangular hyperbolic response, but with a nonzero intercept (P' , mL⁻¹), determined by the predator's basal metabolic rate (Montagnes, 1996), where c and d are constants [Eqn (2)]. Predator cell volume (V , μm³) was also assumed to

Fig. 2 The combined effect of temperature and prey (*Cryptomonas* sp.) abundance on *Urotricha farcta*: (a) ingestion, (b) specific growth, and (c) cell volume; note the temperature axis on the last panel (c) is reversed to adequately display the shape of this response. The grids are the fits of Eqns (5)–(7) to the data (see text for details); see Table 2 for the parameters of these fits and estimates of their error.

follow a rectangular hyperbolic response, but with a positive value at zero prey, assuming a minimal cell size [V' , Montagnes & Lessard, 1999, Eqn (3)], where e and f are constants. Temperature (T , °C)-dependent responses (R) for predator and prey growth rate (μ_c and μ_p , respectively), predator ingestion rate (I_c), and predator volume (V) were assumed to increase exponentially to a maximum, plateau, and then decrease with changing temperatures, following a phenomenological model [Flinn, 1991, Eqn (4)], where g , h , and i are constants (see Appendix A). Flinn & Hagstrum (2002) and Menon *et al.* (2002) combined a Type II functional response with their temperature response, and we have followed this approach for ingestion, growth, and volume responses [Eqns (5)–(7)], where lower case, italicized letters represent constants, and α [Eqn (6)] has a value of unity and dimensions of T^{-1} . Prey volume was assumed to decrease linearly with temperature, following predictions of Atkinson *et al.* (2003).

$$I_c = \frac{aP}{1 + bP} \quad (1)$$

$$\mu_c = \frac{c(P - P')}{1 + d(P - P')} \quad (2)$$

$$V = \frac{eP}{1 + fP} + V' \quad (3)$$

$$R = \frac{1}{1 + (g - hT + iT^2)} \quad (4)$$

$$I_c = \frac{jP}{[1 + (k - lT + mT^2)]P} \quad (5)$$

$$\mu_c = \frac{n(P - T\alpha P')}{[1 + (o - qT + rT^2)](P - T\alpha P')} \quad (6)$$

$$V = \frac{uP}{[1 + (v - wT + xT^2)]P} + V'. \quad (7)$$

Ciliate growth, ingestion, and volume responses were related to the treatment temperature and average prey concentration (P); note, average P over incubations was determined following methods described by Frost (1972). The above equations [Eqns (5)–(7)] were, respectively, fit to the temperature-influenced numerical, functional, and volume response data using the Marquardt–Levenberg algorithm (SIGMAPLOT, SPSS Inc., Chicago, IL, USA); this algorithm is appropriate for describing such biological datasets (Berges *et al.*, 1994). Adjusted R^2

values for the responses and standard errors of the estimates were determined, using SIGMAPLOT, as indications of their goodness of fit.

Modelling

To illustrate the extent to which temperature change may impact carbon flux in this predator–prey system, a model was constructed using our experimental flagellate (prey) and ciliate responses (see ‘Results’) and responses for *Daphnia* from the literature (see below). In this system, flagellates grew exponentially (with no carrying capacity as maximal prey levels were always predator controlled) and were preyed upon strictly by ciliates or by both ciliates and *Daphnia* (predators); ciliate growth rate was prey dependent, and ciliate mortality was regulated either strictly by starvation below threshold levels or also by top-down control by the grazer (*Daphnia*); the following couplet of differential equations [Eqns (8) and (9)] describe the model:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p P - I_c C - I_{dp} D \quad (8)$$

$$\frac{dC}{dt} = \mu_c C - I_{dc} D, \quad (9)$$

where P is the flagellate abundance; μ_p is the temperature-dependent specific growth rate of the flagellate; I_c and μ_c are the temperature and the prey-dependent grazing and growth rates, respectively, of the ciliate; C is the ciliate abundance; I_{dp} and I_{dc} are the temperature and prey-dependent grazing rates of *Daphnia* on flagellates and ciliates, respectively; and D is *Daphnia* abundance. Flagellate and ciliate numbers were then converted to volumes using our predictive equations (see ‘Results’) and then to carbon, following the conversion of Menden-Deuer & Lessard (2000) (see above).

Daphnia grazing pressure was based on assuming: (1) a constant abundance (0.05 mL^{-1}) of generic, *Daphnia* ($\sim 0.8 \text{ mm}$ long) being maintained over the simulations (Gilbert, 1988; Gliwicz, 2003); (2) specific filtration rates on the ciliate and prey being the same (Jürgens, 1994); and (3) the influence of temperature on filtration rate (F , $\text{mL}^{-1} \text{ individual day}^{-1}$) followed Eqn (10), derived by Mourelatos & Lacroix (1990):

$$\log F = 2.07 \log L + 0.126T - 0.0024T^2 - 0.628, \quad (10)$$

where L is *Daphnia* length and T is temperature (Fig. 5f).

To assess the impact of the temperature-induced responses on ciliate–prey pulses, a 20-day simulation was used to represent the maximum period over which a single warming event might influence a small water body, without the influence of other abiotic (e.g. nutrient change) or biotic (e.g. *Daphnia* population growth)

factors substantially altering the predator–prey system. Furthermore, this period was sufficiently long to express one predator–prey cycle, given initial conditions of 4×10^3 prey and 10 predators mL^{-1} (the starting condition of all simulations of population dynamics); these initial abundances represent typical levels that occur in nature (Weisse *et al.*, 1990). Note, a range of initial concentrations of ciliate and prey, similar to those found in nature, produce cycles over 5–20 days (data not shown); we chose the above single set of initial levels as realistic examples, which is in concordance with the aims of our analysis. However, to illustrate the robustness of our analysis, we also assessed and present the impact of varying both initial flagellate ($200\text{--}8 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$) and ciliate ($1\text{--}100 \text{ mL}^{-1}$) abundances on the respective total production over the 20-day simulation. All simulations were run for temperatures ranging from 8 to 30 °C, a range over which the prey and ciliate might be found (e.g. Foissner *et al.*, 1999).

Results

Phytoplankton (prey) response to temperature

Specific growth rate of *Cryptomonas* sp. increased from its lower temperature limit (cells did not survive at <8 °C; data not shown) to a maximum at ~ 20 °C and then subsequently decreased (Fig. 1a). A response was fit to the specific growth data following Eqn (4), where in this case R is prey-specific growth rate (μ_p , day^{-1}) (Table 1). Prey volume decreased linearly with temperature (Fig. 1b, Table 1).

Ciliate response to prey and temperature

Ciliate ingestion rate increased with increasing prey concentration; it also increased with increasing temperature to a maximum at ~ 22 °C and then decreased (Fig. 2a). A response was fit to the ingestion data

Table 1 Parameters, error estimates (1 standard error, SE), adjusted R^2 for the specific growth (μ_p , day^{-1}) [Eqn (4)], and volume (V , μm^3) responses ($V = yT + z$) for *Cryptomonas* sp. to temperature (T , °C)

Parameters	Value	Units	SE	Adjusted R^2
Specific growth rate				
g	46.0	day	11.4	0.96
h	4.46	day C^{-1}	1.13	
i	0.11	day C^{-2}	0.28	
Volume				
y	−20.3	$\mu\text{m}^3 \text{C}^{-1}$	4.87	0.60
z	926	μm^3	91.7	

following Eqn (5) (Table 2). Ciliate-specific growth rate increased with both increasing prey concentration and temperature (Fig. 2b). A response was fit to the growth data following Eqn (6) (Table 2). Ciliate volume increased with increasing prey concentration; it first increased with increasing temperature to a maximum at $\sim 10\text{--}12$ °C and then decreased (Fig. 2c). A response was fit to the volume data following Eqn (7) (Table 2).

The impact of temperature change on population dynamics and carbon flux

For the flagellate–ciliate simulations without top-down control by *Daphnia*, there was one prey and one predator peak over almost the entire range of temperatures examined (Fig. 3). An example, at 20 °C, illustrates the change in biomass of prey and predator, over time (Fig. 3a). A synthesis of the entire set of simulations is presented as predator and prey density plots, to indicate population dynamics over time, across the examined temperature range (Fig. 3b and c). Simulations indicated that the prey populations increased over several days, always peaked before that of the predator and then rapidly decreased, as they were grazed by the growing predator population. The predator population increased rapidly, once prey were abundant, and then decreased more gradually than that of the prey, as the former died due to starvation; this decrease became more rapid at higher temperatures, reflecting higher mortality rates at low prey concentrations and higher temperatures (Fig. 2b). Finally, at high and low temperatures, pulses were not pronounced and occurred near the end of the 20-day simulation, while at 20 °C the pulses reached the highest numbers (cf. Fig. 3a) and occurred early, between days 4 and 7 (Fig. 3a–c).

The biomass produced by the prey and predator (ciliate) (Fig. 3d and e) equates to the sequestered carbon from atmospheric CO_2 , through primary production of the prey and its transfer to the consumer, the predator. Production of both predator and prey was greatest when simulations were initiated with few predators and prey (Fig. 4); in these cases reduced grazing pressure initially allowed the prey population to rise, but then there was a subsequent bloom of the ciliates, resulting in high production of both (population cycle, data not shown). In all cases, carbon production peaked at or near 20 °C and rapidly decreased above and below this maximum (Figs 3 and 4); this consistency of the distribution of this measurement of production illustrate the robustness of the model output over a range of prey and ciliate levels (Fig. 4). Differences between minimum and maximum production were on the order of 5–10-fold, for both prey and predator (Fig. 3d and e).

Table 2 Parameters, error estimates (1 standard error, SE), adjusted R^2 for *Urotricha farcta* ingestion rate (I_C , prey predator⁻¹ h⁻¹) [Eqn (5)], specific growth rate (μ_C , day⁻¹) [Eqn (6)], and volume (V , μm^3) [Eqn (7)] response to changing prey (*Cryptomonas* sp.) and temperature

Parameters	Value	Units	SE	Adjusted R^2
Ingestion rate [Eqn (5)]				
j	6.04×10^{-5}	prey predator ⁻¹ h ⁻¹	4.06×10^{-6}	0.90
k	1.68×10^{-4}		2.13×10^{-5}	
l	1.55×10^{-5}	C ^{o-1}	2.05×10^{-6}	
m	3.77×10^{-7}	C ^{o-2}	5.10×10^{-8}	
Specific growth rate [Eqn (6)]				
n	8.04×10^{-5}	day ⁻¹	1.02×10^{-5}	0.71
P'	2.92×10^2	prey mL ⁻¹	6.20×10	
o	1.77×10^{-4}		4.65×10^{-5}	
q	1.31×10^{-5}	C ^{o-1}	4.27×10^{-6}	
r	2.76×10^{-7}	C ^{o-2}	1.03×10^{-7}	
Volume [Eqn (7)]				
u	2.89×10^{-1}	μm^3	5.37×10^{-2}	0.77
V'	1.92×10^3	μm^3	1.36×10^2	
v	7.01×10^{-4}		2.00×10^{-4}	
w	-1.14×10^{-4}	C ^{o-1}	2.42×10^{-5}	
x	4.89×10^{-6}	C ^{o-2}	1.01×10^{-6}	

When *Daphnia* were introduced to the system, there is a clear indication of its grazing impact, but ciliate-phytoplankton pulses still occur over a limited range of temperatures (Fig. 5a–c), following patterns described above, indicating that the direct microbial link can remain active, even when a higher level predator exists, at typical levels. Maximum flagellate and ciliate production (at ~20 °C) over the 20-day period was altered compared with when *Daphnia* was absent, but not to a great extent; however, there was a pronounced effects of temperature on production at the upper and lower limits of the range (cf Figs 3b, c and 5b, c). The amount of carbon transferred to *Daphnia*, by grazing, was also influenced by temperature (Fig. 5g and h), indicating that temperature change could have larger scale impacts on more complex food web dynamics.

Discussion

Temperature response functions

There is a continuing need to parameterize pelagic ecosystem models (Anderson, 2005), especially components of the microbial food web, which can be pivotal in terms of freshwater pelagic carbon flux (Weisse *et al.*, 1990; Straile, 1998; Zingel *et al.*, 2007). Food levels, grazing pressures, and growth rates have typically been considered to be the primary influencing factors in planktonic ecosystem dynamics, and the last 20 years have seen a focus on establishing functional and numerical responses for protozooplankton species (e.g. Jonsson, 1986; Montagnes, 1996; Jürgens & Šimek, 2000; Gismervik, 2005), using methods and approaches similar to ours. However, with the recognition that

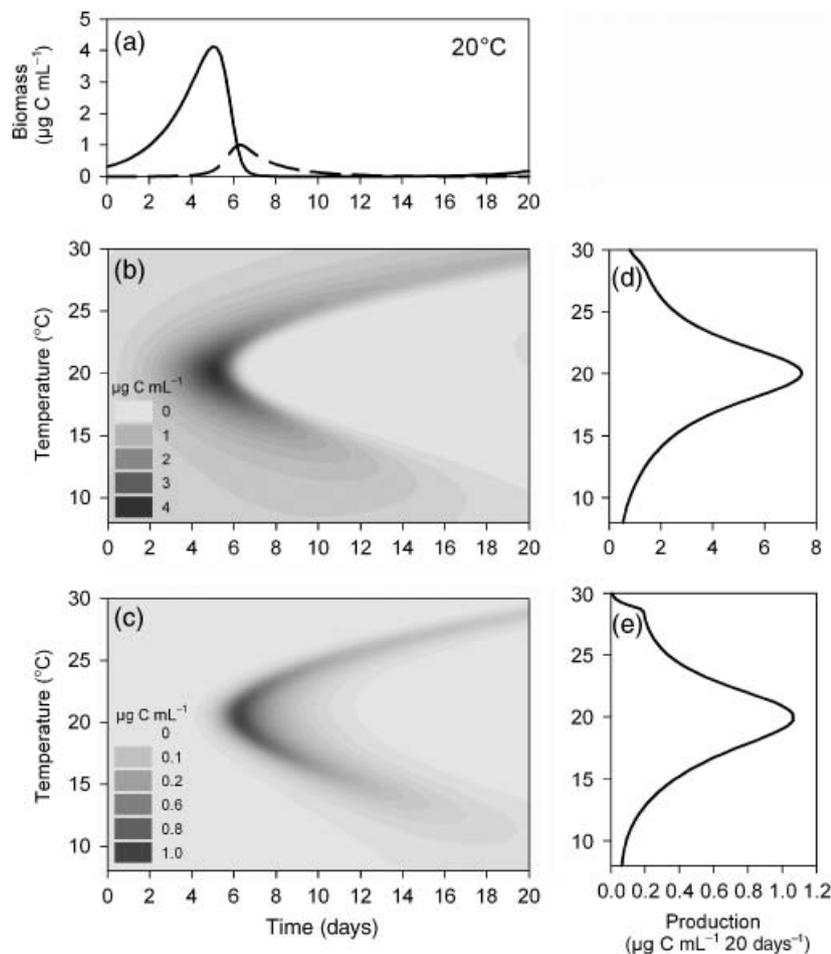


Fig. 3 Results from the model of predator (*Urotricha farcta*) and prey (*Cryptomonas* sp.) population dynamics over 20 days (see 'Materials and methods' for details of the model). Predator and prey are presented as $\mu\text{g C mL}^{-1}$. (a) An indication of the population dynamics over 20 days at one discrete temperature: 20°C; prey (solid line), predator (dashed line). (b, c) Density plots of prey and predator population dynamics, respectively, at temperatures ranging from 8 to 30°C, over 20 days. (d, e) An indication of the carbon produced by the prey and predator, respectively, over the 20 days; note this represents the total amount made, regardless of its fate.

climate change will both increase ambient temperature and change the intensity and frequency of warming events, there has been a commensurate effort to consider temperature responses in models of protozoan feeding and growth. Generally, the approach has been to impose a thermal function on existing protozoan rate processes (e.g. a simple or modified Q_{10} function; Blackford *et al.*, 2004), but this simplistic approach is likely inappropriate (e.g. Montagnes *et al.*, 2003; Kimmance *et al.*, 2006). The present study provides, to our knowledge, the first indication of how more complex, empirically derived temperature relationships can alter short-term carbon flux, influenced by predator–prey dynamics, within the freshwater microbial food web.

Our responses [Eqns (4)–(7), Tables 1 and 2] are based on a combination of mechanistic and phenomenological

equations. There is good indication that functional [Eqn (1)] and numerical [Eqn (2)] responses are at least semimechanistic (Holling, 1959; Fenchel, 1986). In contrast, the quadratic function [Eqn (4)] employed by Flinn (1991) is a phenomenological model. We have compared this model to a number of mechanistic and phenomenological models using information theory (Burnham & Anderson, 2002), and it has proven consistently to be one of the best to describe thermal responses (Appendix A). We recognize that more complex, mechanistic functions may explain temperature responses (e.g. Schoolfield *et al.*, 1981), but to provide simple, predictive functions for modelling, we have followed the approach of others (e.g. Flinn & Hagstrum, 2002; Kimmance *et al.*, 2006) to combine mechanistic and phenomenological functions, to yield parsimonious equations.

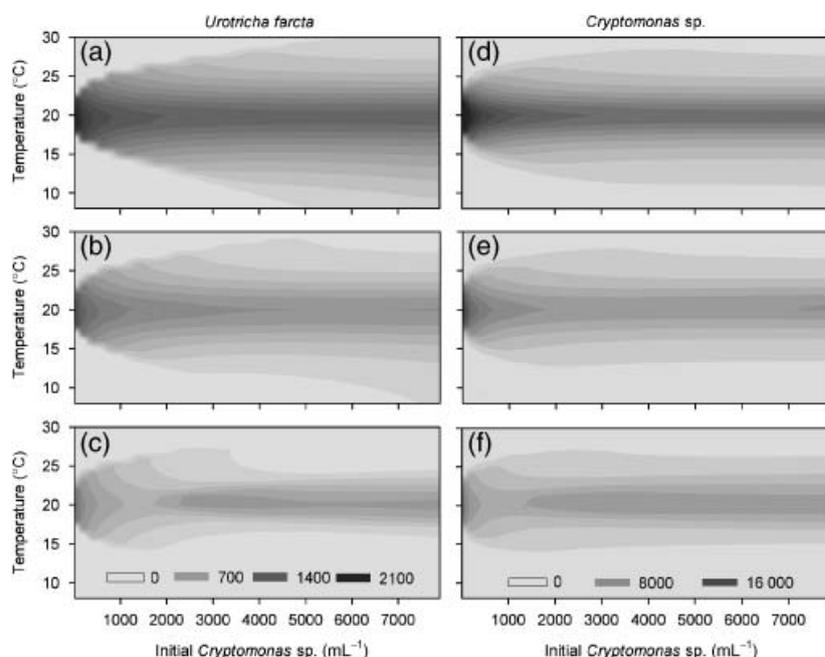


Fig. 4 The influence of initial ciliate and prey abundance on carbon production over a 20-day simulation, at temperatures ranging from 8 to 30 °C. (a–c) *Urotricha farcta* production; (d–f) *Cryptomonas* sp. production. Parts (a, d) were initiated with 1 *U. farcta* mL⁻¹; parts (b, e) were initiated with 10 *U. farcta* mL⁻¹; parts (c, f) were initiated with 100 *U. farcta* mL⁻¹. Values denoted by shading in bottom panels apply to all above panels and are in units of µg C mL⁻¹ 20 day⁻¹.

Our main alteration to the model of Flinn & Hagstrum (2002) was to impose a temperature dependency on the threshold concentration [P' ; Eqn (6)]; P' represents the prey concentration where sufficient food is available to allow the predator population to survive but not increase or decrease (Montagnes, 1996). The value of this parameter typically increases with temperature (Weisse *et al.*, 2002 and references within; Kimmance *et al.*, 2006), presumably as increased temperature raises metabolic needs. Including this modification provided a better fit to the data than responses that lacked the interaction (data not shown). We suggest that our response equations [Eqns (5)–(7)], if not their specific parameters (Tables 1 and 2), are a good method of assessing the protozoan contribution to carbon flux in models that examine thermal impacts; we illustrate this below.

How might temperature alter population dynamics and carbon flux?

Using a specific example, we indicate that temperature changes of 2–10 °C can impact protistan population dynamics and carbon flux (Figs 3–5). Assuming that ambient temperatures in temperate freshwaters is generally < 20 °C, the model suggests that a rise towards 20 °C would increase the magnitude and occurrence of

predator–prey pulses. Such increases in temperature on the order of 5 °C are not uncommon in small ~3000 L, temperate water bodies (see McKee *et al.*, 2000), but as indicated above, climate change is predicted to increase the prevalence and the severity of these fluctuations (Carpenter *et al.*, 1992). The ensuing increase in pulses of ciliates and prey may then alter food web dynamics on a larger scale. However, because of their brief nature and likely local occurrence, it is, and will be, difficult to observe short-term pulses in routine sampling programs, and this may be why they are rarely carefully considered.

Our model output is, however, comparable to *in vitro* incubations: using the same taxa as we have examined, Weisse *et al.* (2001) presented time series data for predator–prey abundances, at 15 and 20 °C, over ~20 days; their data exhibit distinct predator–prey pulses over 10–15 days, which occurred earlier at the warmer temperature, supporting our arguments for the importance of this short-term phenomenon and the influence of temperature on the dynamics. A second approach to assess if predator–prey pulses occur is to regularly monitor communities in microcosms (i.e. large tanks populated with seminatural assemblages, simulating *in situ* conditions; e.g. McKee *et al.*, 2000). Although there have been several such studies to examine the impact of global warming on freshwater pelagic

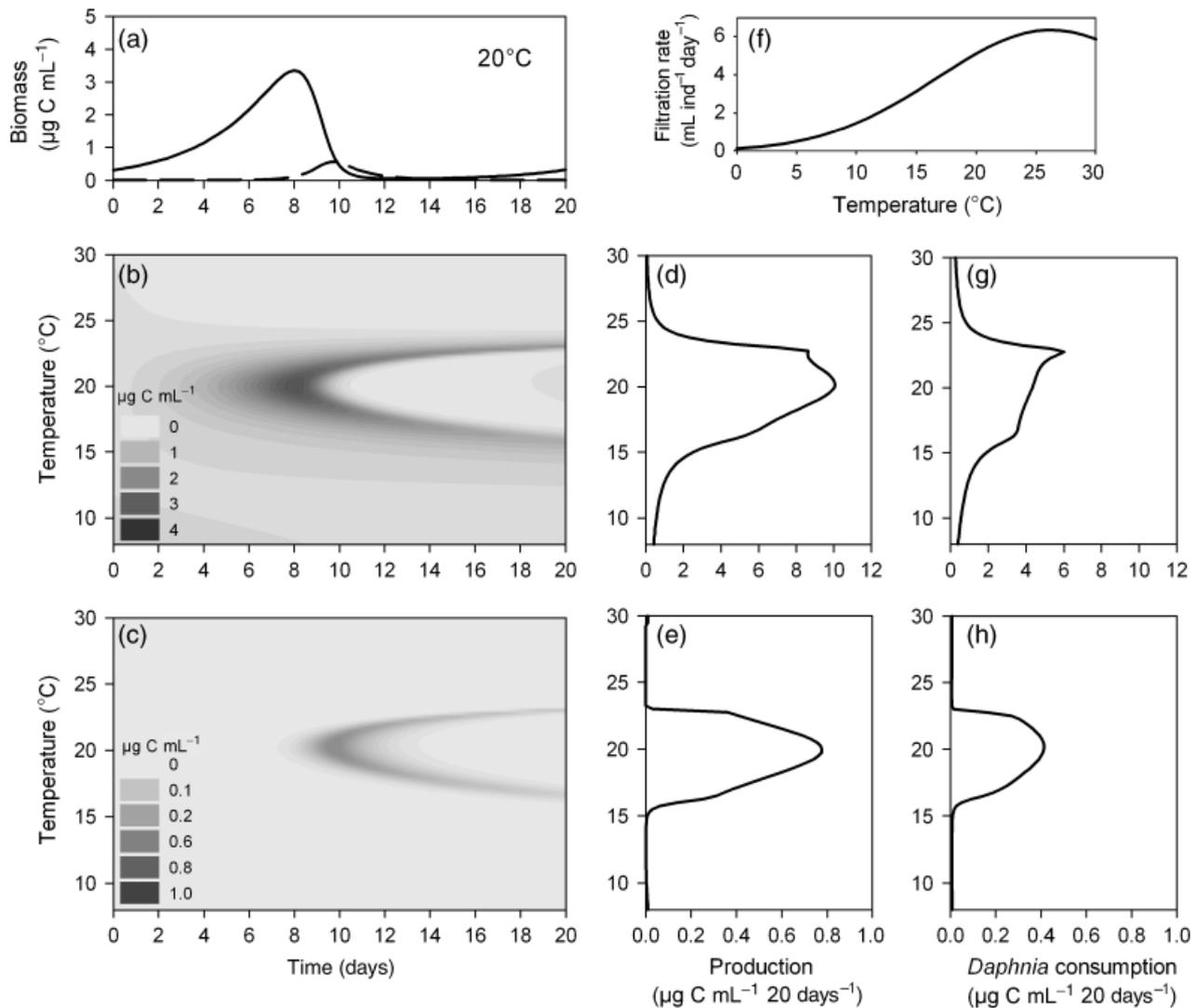


Fig. 5 Results from the model of predator (*Urotricha farcta*) and prey (*Cryptomonas* sp.) population dynamics over 20 days with the addition of *Daphnia* as a grazer (see 'Materials and methods' for details of the model). Predator and prey are presented as $\mu\text{g C mL}^{-1}$. (a) An indication of the population dynamics over 20 days at one discrete temperature: 20 °C; prey (solid line), predator (dashed line). (b, c) Density plots of prey and predator population dynamics, respectively, at temperatures ranging from 8 to 30 °C, over 20 days. (d, e) An indication of the carbon produced by the prey and predator, respectively, over the 20 days; note this represents the total amount made, regardless of its fate. (f) An illustration of the response of *Daphnia* filtration rate to changing temperature (see 'Materials and methods' for details of this response). (g, h) An indication of the prey and predator carbon, respectively, consumed by the upper level grazer, *Daphnia*, over the 20 days; note this represents the total amount grazed, regardless of its fate.

ecosystems (tanks maintained 3–5 °C above ambient levels; e.g. McKee *et al.*, 2002; Strecker *et al.*, 2004; Christoffersen *et al.*, 2006), to our knowledge only one has focused on protozooplankton, and specifically ciliates (Montagnes *et al.*, 2002; Wilson, 2002); in this study, there was an increased occurrence of ciliate species blooming when temperatures were raised 3 °C above ambient levels, and fish were included to remove crustacean grazers. Similarly, but less apparent, blooms of *Urotricha* spp. and other small ciliates occur in field observations (e.g. in Lake Constance in the summer

when crustaceans, such as *Daphnia*, are not abundant; Müller *et al.*, 1991). These laboratory, microcosm, and field data suggest that our modelled predator–prey pulses, although difficult to observe, may be common in nature and suggest that warming may increase such pulses, increasing carbon flux through populations within the microbial food web. However, it is also instructive to note that we predict, in our specific case, an increase in temperature (>20 °C) will reduce the magnitude and period of the predator–prey dynamics and carbon flux.

Rarely, however, do simple predator–prey models, such as ours, accurately predict *in situ* or *in vitro* population dynamics, and this is not necessarily their intention, rather it is to explore and test hypotheses (see Turchin, 2003). A combination of uncharacterized stochasticity, under-parameterization of responses, and omission of deterministic variables can be attributed to the cause of the mismatch (Turchin, 2003). However, it is well accepted that although such models are rarely explicitly predictive, they reveal qualitative effects (e.g. Shertzer *et al.*, 2002; Fulton *et al.*, 2003). Thus, we propose that our fundamental premise that small, episodic, temperature changes, induced by climate change, will upset food web dynamics in an unexpected manner is well supported by our model results, and our analysis of production (Fig. 4) reveals that our predictions are robustly supported over a range of predator and prey levels. Furthermore, the analysis suggests that our responses [Eqns (5)–(7)] should provide researchers with data to further parameterize temperature effects on ciliates in existing pelagic ecosystem models. Possibly of greater impact though is our illustration that predators and prey will often have different thermal sensitivities, and these produce unintuitive, nonlinear results (May, 1986). Recently, it has been argued that planktonic autotrophs are less sensitive to temperature than planktonic heterotrophs (Rose & Caron, 2007), but our data suggest that the change in dynamics above and below $\sim 20^{\circ}\text{C}$ are at least in part due to the rapid positive and negative autotrophic-prey response near 20°C (Fig. 1), suggesting that in this case the thermal sensitivity of *Cryptomonas* sp. is driving the strong patterns in the system. These findings emphasize the more general recognition that different temperature dependencies of autotrophy and heterotrophy may significantly decouple existing plankton dynamics on local and global scales (e.g. López-Urrutía *et al.*, 2006).

Application, integration, and extension of this work

There are some caveats to our conclusions that are worth noting. First, our temperature responses (Fig. 2) are for genera that are ubiquitous in temperate freshwaters, but *U. farcta* strains can have different thermal sensitivities, as do different species within the genus *Urotricha* (Weisse & Montagnes, 1998). This is not surprising, as regional adaptations of taxa to a variety of environmental variables, including temperature should be expected (e.g. Mitchell & Lampert, 2000) and was recently demonstrated for freshwater ciliates (Gächter & Weisse, 2006). Still, meta-analyses regarding protistan growth and volume responses to temperature (e.g. Atkinson *et al.*, 2003; Montagnes *et al.*, 2003; Bissinger *et al.*, 2008) suggest predictable similarities across taxa, and aggregation of

species into functional groups is advocated for large-scale ecosystem models (Fulton *et al.*, 2003). Thus, although the specifics of our model output might not be repeated, the trends of population pulses and carbon flow might be similar, regardless of the taxa; as a case in point, our own study on a marine, heterotrophic flagellate supports our arguments for the temperature sensitivity of population dynamics (Kimmance *et al.*, 2006). Second, like most ecophysiological responses, our discrete measurements (i.e. points on Figs 1 and 2) were determined under constant temperatures. In shallow freshwater environments, ambient temperature will not be constant, possibly fluctuating hourly or daily by several degrees, and fluctuating ambient temperatures (on a daily regime) can alter *Urotricha* growth rates (both up or down) compared with constant temperatures (Montagnes & Weisse, 2000); such transient behaviour requires further parameterization before it is incorporated into models. These concerns, however, do not invalidate our parsimonious approach towards examining trends (which reflects that of most ecosystem and many population models) or the potential applicability of the responses provided, but they do indicate that a further degree of sensitivity analysis, related to the temperature optima of taxa and their response to fluctuating temperatures, would be appropriate in more complex modelling efforts.

Given the limitations of the study, how then does the model predict general patterns of carbon uptake and sequestration? At 20°C , the phytoplankton prey produce $\sim 7\ \mu\text{g C mL}^{-1}$ over 20 days (Fig. 3). However, some of this production is transferred to the ciliate, little of it remains phytoplankton biomass, and by the end of the 20 days, in virtually all cases, the ciliate standing-stock biomass is negligible (i.e. almost all ciliates die), indicating that this biomass is not sequestered; similar responses occur when the upper-level grazer, *Daphnia*, is added. Likely, this small protozoan, which has no hard parts, if not grazed, would die, rupture, and become part of the dissolved organic carbon pool; the biomass would then cycle through the microbial loop (Azam *et al.*, 1983; Montagnes, 1996). Consequently, little to none of the carbon would be sequestered on a seasonal or longer scale (e.g. in sediment), as might be the case when crustacean predators are present (see Flanagan *et al.*, 2006). Recognizing, and incorporating, this potential source of recycling will undoubtedly alter estimates of carbon sequestering in freshwater models; that is, the impact of short-term protozoa–phytoplankton pulses could potentially substantially reduce estimates of freshwater carbon sequestration.

The first scenario we have modelled (Fig. 3) may occur in freshwaters, when upper level zooplankton consumers are not abundant (e.g. when *Daphnia* are

consumed by fish; McKee *et al.*, 2002). However, when the keystone grazer *Daphnia* is present, it effectively consumes ciliates and their prey (Jürgens, 1994). The model also reveals a clear impact of *Daphnia* grazing on the system, but pronounced ciliate–phytoplankton pulses still occur over a range of temperatures (Fig. 5b and c), suggesting that the direct microbial link may remain active. Support for this conclusion was recently provided by a long-term data analysis from the spring to the clear-water phase development in Lake Constance (Tirok & Gaedke, 2006): although ciliates remained the most important algal grazers in spring, *Daphnia* benefited from increased temperature by 1–2 °C, substantially enhancing their grazing on small, prey such as *Cryptomonas* spp.

In our model, production over the 20-day period is also altered when *Daphnia* are added, but there is a more pronounced effect of temperature on the change in production (cf Figs 3b, c and 5b, c). The amount of carbon produced that is transferred to *Daphnia* is also influenced by temperature, supporting arguments that temperature change could have larger scale impacts on food web dynamics (Orcutt & Porter, 1984). We do, however, emphasize that our inclusion of *Daphnia* is based on realistic but limited information. Both prey level and temperature have nonlinear effects on *Daphnia* growth and grazing parameters (Kibby, 1971; Orcutt & Porter, 1984; Mourelatos & Lacroix, 1990; McKee, 1995; Giebelhausen & Lampert, 2001), and studies exist on interactive impacts of food and temperature on *Daphnia* feeding attributes (e.g. Orcutt & Porter, 1984; Giebelhausen & Lampert, 2001). However, none of the published functional responses provide sufficient detail to appropriately parameterize models (i.e. produce functions similar to those illustrated in Fig. 2a–c). These past works have focused on a few discrete temperatures and prey concentrations, replicating to test for treatment effects. We have taken a different approach in this work and others (e.g. Montagnes *et al.*, 2001; Kimmance *et al.*, 2006): to rigorously establish nonlinear responses appropriate for application in models, focus must be placed on spreading measurements along the independent variable(s), rather than replicating discrete treatments (Montagnes & Berges, 2004); this approach provides key information on the shape of responses. Given the importance of *Daphnia* in freshwater food webs, we propose that future work focuses on carefully parameterizing such temperature–prey responses.

Acknowledgements

This research was partially supported by a travel grant from the Royal Society awarded to DJS and by a NERC studentship awarded to DJS and DA for JB.

References

- Anderson TR (2005) Plankton functional type modelling: running before we can walk? *Journal of Plankton Research*, **27**, 1073–1081.
- Atkinson D, Ciotti BJ, Montagnes DJS (2003) Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5 °C⁻¹. *Proceedings of the Royal Society B*, **270**, 2605–2611.
- Azam F, Fenchel T, Field JG *et al.* (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, **10**, 257–263.
- Berges JA, Montagnes DJS, Hurd CL *et al.* (1994) Fitting ecological and physiological data to rectangular hyperbolae: a comparison of methods using Monte Carlo simulations. *Marine Ecology Progress Series*, **114**, 175–183.
- Bissinger JE, Montagnes DJS, Sharples J, Atkinson D (2008) Predicting marine phytoplankton maximum growth rates from temperature: improving on the Eppley curve using quantile regression. *Limnology and Oceanography*, **53**, 487–493.
- Blackford JC, Allen JI, Gilbert FJ (2004) Ecosystem dynamics at six contrasting sites: a generic modelling study. *Journal of Marine Systems*, **52**, 191–215.
- Burnham KP, Anderson DR (2002) *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*. Springer, New York.
- Carpenter SR, Fisher SG, Grimm NB *et al.* (1992) Global change and freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **23**, 119–139.
- Christoffersen K, Andersen N, Søndergaard M *et al.* (2006) Implications of climate-enforced temperature increases on freshwater pico- and nanoplankton populations studied in artificial ponds during 16 months. *Hydrobiologia*, **560**, 259–266.
- Davidson K (1996) Modelling microbial food webs. *Marine Ecology Progress Series*, **145**, 279–296.
- Dokulil M (1988) Seasonal and spatial distribution of cryptophycean species in the deep, stratifying, alpine lake Mondsee and their role in the food web. *Hydrobiologia*, **161**, 185–201.
- Downing JA, Prairie Y, Cole JJ *et al.* (2006) The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnology and Oceanography*, **51**, 2388–2397.
- Fenchel T (1986) Protozoan filter feeding. In: *Progress in Protistology*, Vol. I (eds Corliss JO, Patterson DJ), pp. 65–113. Biopress, Bristol.
- Flanagan KM, McCauley E, Wrona F (2006) Freshwater food webs control carbon dioxide saturation through sedimentation. *Global Change Biology*, **12**, 644–651.
- Flinn PW (1991) Temperature-dependent functional response of the parasitoid *Cephalonomia waterstoni* (Gahan) (Hymenoptera: Bethyilidae) attacking rusty grain beetle larvae (Coleoptera: Cucujidae). *Environmental Entomology*, **20**, 872–876.
- Flinn PW, Hagstrum DW (2002) Temperature-mediated functional response of *Theocolax elegans* (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitizing *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. *Journal of Stored Product Research*, **38**, 185–190.
- Foissner W, Berger H, Schaumburg J (1999) *Identification and ecology of limnetic plankton ciliates*. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft 3/99. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft.

- Frost BW (1972) Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnology and Oceanography*, **17**, 805–815.
- Fulton EA, Smith ADM, Johnson CR (2003) Effect of complexity on marine ecosystem models. *Marine Ecology Progress Series*, **253**, 1–16.
- Gächter E, Weisse T (2006) Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. I. Temperature response. *Aquatic Microbial Ecology*, **45**, 291–300.
- Gerten D, Adrian R (2000) Climate-driven changes in spring plankton dynamics and the sensitivity of shallow polymictic lakes to the North Atlantic Oscillation. *Limnology and Oceanography*, **45**, 1058–1066.
- Giebelhausen B, Lampert W (2001) Temperature reaction norms of *Daphnia magna*: the effect of food concentration. *Freshwater Biology*, **46**, 281–289.
- Gilbert JJ (1988) Suppression of rotifer populations by *Daphnia*: a review of the evidence, the mechanisms, and the effects on zooplankton community structure. *Limnology and Oceanography*, **33**, 1286–1303.
- Gismervik I (2005) Numerical and functional responses of choro- and oligotrich planktonic ciliates. *Aquatic Microbial Ecology*, **40**, 163–173.
- Gliwicz ZM (2003) Zooplankton. In: *The Lakes Handbook – Limnology and Limnetic Ecology*, Vol. I (eds O'Sullivan PE, Reynolds CS), pp. 417–460. Blackwell Science Ltd, Malden, MA.
- Guillard RL, Lorenzen CJ (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide c. *Journal of Phycology*, **8**, 10–14.
- Holling CS (1959) The components of predation as revealed by a study of small mammal predation of the European pine sawfly. *Canadian Entomologist*, **91**, 293–320.
- Houghton J (2005) Global warming. *Reports on Progresses in Physics*, **68**, 1343–1403.
- Jerome CA, Montagnes DJS, Taylor FJR (1993) The effect of the quantitative protargol stain and Lugol's and Bouin's fixatives on cell size: a more accurate estimate of ciliate species biomass. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**, 254–259.
- Jonsson PR (1986) Particle size selection, feeding rates and growth dynamics of marine planktonic oligotrichous ciliates (Ciliophora: Oligotrichina). *Marine Ecology Progress Series*, **33**, 265–27.
- Jürgens K (1994) Impact of *Daphnia* on planktonic microbial food webs – a review. *Marine Microbial Food Webs*, **8**, 295–324.
- Jürgens K, Šimek K (2000) Functional response and particle size selection of *Halteria* cf. *grandinella*, a common freshwater oligotrichous ciliate. *Aquatic Microbial Ecology*, **22**, 57–68.
- Kibby HV (1971) Effect of temperature on the feeding behaviour of *Daphnia rosea*. *Limnology and Oceanography*, **16**, 580–581.
- Kimmance S, Atkinson D, Montagnes D (2006) Do temperature–food interactions matter? Responses of production and its components in the model heterotrophic flagellate *Oxyrrhis marina*. *Aquatic Microbial Ecology*, **42**, 63–73.
- Lindström ES, Weisse T, Stadler P (2002) Enumeration of small ciliates in culture by flow cytometry and nucleic acid staining. *Journal of Microbial Methods*, **49**, 173–182.
- López-Urrutia Á, Martin E, Harris RP *et al.* (2006) Scaling the metabolic balance of the oceans. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **103**, 8739–8744.
- May RM (1986) When two and two do not make four: nonlinear phenomena in ecology. *Proceedings of the Royal Society London B*, **228**, 241–266.
- McKee D (1995) Long-term temperature acclimation in *Daphnia magna*: effect on filtration rates. *Journal of Plankton Research*, **17**, 1095–1103.
- McKee D, Atkinson D, Collings S *et al.* (2000) Heated aquatic microcosms for climate change experiments. *Freshwater Forum*, **14**, 51–58.
- McKee D, Atkinson D, Collings S *et al.* (2002) Macro-zooplankter responses to simulated climate warming in experimental freshwater microcosms. *Freshwater Biology*, **47**, 1–14.
- Menden-Deuer S, Lessard EJ (2000) Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography*, **45**, 569–579.
- Menon A, Flinn PW, Dover BA (2002) Influence of temperature on the functional response of *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitoid of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Product Research*, **38**, 463–469.
- Mitchell SE, Lampert W (2000) Temperature adaptation in a geographically widespread zooplankter, *Daphnia magna*. *Journal of Evolutionary Biology*, **13**, 371–382.
- Montagnes DJS (1996) Growth responses of planktonic ciliates in the genera *Strobilidium* and *Strombidium*. *Marine Ecology Progress Series*, **130**, 241–254.
- Montagnes DJS, Berges JA (2004) Determining parameters of the numerical response. *Microbial Ecology*, **48**, 139–144.
- Montagnes DJS, Kimmance SA, Atkinson D (2003) Using Q_{10} : can growth rates increase linearly with temperature? *Aquatic Microbial Ecology*, **32**, 307–313.
- Montagnes DJS, Kimmance SA, Tsonunis G *et al.* (2001) Combined effect of temperature and food concentration on the grazing rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Marine Biology*, **139**, 975–979.
- Montagnes DJS, Kimmance SA, Wilson D (2002) *Effects of global and local temperature changes on free living, aquatic protists*. Conference Proceedings of the 14th International Conference on Comparative Physiology, Climate Changes: Effects on Plants, Animals, and Humans (eds Bolis CL, Keines R, Elia M *et al.*). Available on CD ROM (from the senior author).
- Montagnes DJS, Lessard EJ (1999) Population dynamics of the marine planktonic ciliate *Strombidinopsis multiauris*: its potential to control phytoplankton blooms. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**, 167–181.
- Montagnes DJS, Weisse T (2000) Fluctuating temperatures affect growth and production rates of planktonic ciliates. *Aquatic Microbial Ecology*, **21**, 97–102.
- Moss B (1998) *Ecology of Fresh Waters, Man and Medium, Past and Present* (pp. 572). Blackwell
- Mourelatos S, Lacroix G (1990) In situ filtering rates of cladocera: effect of body length, temperature, and food concentration. *Limnology and Oceanography*, **35**, 1101–1111.

- Müller H, Geller W (1993) Maximum growth rates of aquatic ciliated protozoa: the dependence on body size and temperature reconsidered. *Archiv für Hydrobiologie*, **126**, 315–327.
- Müller H, Schlegel A (1999) Responses of three freshwater planktonic ciliates with different feeding modes to cryptophyte and diatom prey. *Aquatic Microbial Ecology*, **17**, 49–60.
- Q13 Müller H, Schöne A, Pinto-Coelho RM *et al.* (1991) Seasonal succession of ciliates in Lake Constance. *Microbial Ecology*, **21**, 119–138.
- Orcutt JD, Porter KJ (1984) The synergistic effects of temperature and food concentration on life history parameters of *Daphnia*. *Oecologia*, **63**, 300–306.
- O'Sullivan PE, Reynolds CS (2003) *The Lakes Handbook – Limnology and Limnetic Ecology*, Vol. 1 and 2. Blackwell Science Ltd, Malden, MA.
- Q14 Pedrós-Alió C, Massana R, Latasa M *et al.* (1995) Predation by ciliates on a metalimnic *Cryptomonas* population: feeding rates, impact and effects of vertical migration. *Journal of Plankton Research*, **17**, 2131–2154.
- Q15 Porter KG, Paerl H, Hodson R *et al.* (1988) Microbial interactions in lake food webs. In: *Complex Interactions in Lake Communities* (ed. Carpenter SR), pp. 209–227. Springer-Verlag, New York.
- Reynolds CS (2003) Lakes, limnology and limnetic ecology: towards a new synthesis. In: *The Lakes Handbook – Limnology and Limnetic Ecology*, Vol. 1 (eds O'Sullivan PE, Reynolds CS), pp. 1–7. Blackwell Science Ltd, Malden, MA.
- Riemann B, Christoffersen K (1993) Microbial trophodynamics in temperate lakes. *Marine Microbial Food Webs*, **7**, 69–100.
- Rose JM, Caron DA (2007) Does low temperature constrain the growth rates of heterotrophic protists? Evidence and implications for algal blooms in cold waters. *Limnology and Oceanography*, **52**, 886–895.
- Schindler DW (1978) Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters. *Limnology and Oceanography*, **23**, 478–486.
- Schoolfield RM, Sharpe PJ, Magnuson CE (1981) Non-linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. *Journal of Theoretical Biology*, **88**, 719–731.
- Shertzer KW, Ellner SP, Fussmann GF, Hairston NG Jr (2002) Predator–prey cycles in an aquatic microcosm: testing hypotheses of mechanisms. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 802–815.
- Sommer U (1986) The periodicity of phytoplankton in Lake Constance (Bodensee) in comparison to other deep lakes in central Europe. *Hydrobiologia*, **138**, 1–7.
- Straila D (1998) Biomass allocation and carbon flow in the pelagic food web of Lake Constance. *Archiv für Hydrobiologie, Special Issues Advances in Limnology*, **53**, 545–563.
- Strecker AL, Cobb TP, Vinebrooke RD (2004) Effects of experimental greenhouse warming on phytoplankton and zooplankton communities in fishless alpine ponds. *Limnology and Oceanography*, **49**, 1182–1190.
- Tirok K, Gaedke U (2006) Spring weather determines the relative importance of ciliates, rotifers and crustaceans for the initiation of the clear-water phase in a large, deep lake. *Journal of Plankton Research*, **28**, 361–373.
- Turchin P (2003) *Complex Population Dynamics: A Theoretical Empirical Synthesis*. Princeton.
- Weisse T (2003) Pelagic microbes – Protozoa and the microbial food web. In: *The Lakes Handbook – Limnology and Limnetic Ecology*, Vol. 1 (eds O'Sullivan PE, Reynolds CS), pp. 417–460. Blackwell Science Ltd, Malden, MA.
- Weisse T (2006) Freshwater ciliates as ecophysiological model organisms – lessons from *Daphnia*, major achievements, and future perspectives. *Archiv für Hydrobiologie*, **167**, 371–402.
- Weisse T, Karstens N, Meyer VCL *et al.* (2001) Niche separation in common prostome freshwater ciliates: the effect of food and temperature. *Aquatic Microbial Ecology*, **26**, 167–179.
- Weisse T, Montagnes DJS (1998) Effect of temperature on inter- and intraspecific isolates of *Urotricha* (Protozoa, Ciliophora). *Aquatic Microbial Ecology*, **15**, 285–291.
- Weisse T, Müller H, Pinto-Coelho RM *et al.* (1990) Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake. *Limnology and Oceanography*, **35**, 781–794.
- Weisse T, Stadler P, Lindström ES *et al.* (2002) Interactive effect of temperature and food concentration on growth rate: a test case using the small freshwater ciliate *Urotricha farcta*. *Limnology and Oceanography*, **47**, 1447–1455.
- Wilson D (2002) *The response of ciliates to simulated global warming, simulated agricultural run-off, and fish predation: a mesocosm experiment*. PhD thesis, University of Liverpool, 81 pp.
- Zingel P, Agasild H, Nöges T *et al.* (2007) Ciliates are the dominant grazers on pico- and nanoplankton in a shallow, naturally highly eutrophic lake. *Microbial Ecology*, **53**, 134–142.

Appendix A

Determining the most likely model to describe the growth rate of *Cryptomonas* sp. as a function of temperature: an information-theoretic approach

Seven candidate models were identified that might describe the response of *Cryptomonas* sp. growth rate to temperature (Fig. A1, Table A1). From these the most likely was selected using an information-theoretic approach (Burnham & Anderson, 2002). The major advantage of this approach, as compared with simple measures of fit, such as r^2 , is that it accounts for the model's complexity, that is the number of parameters (Angilletta, 2006). The first step in this procedure is to calculate the Akaike information criterion (AIC) for each candidate model. This provides an estimate of the relative distance between the fitted model and the unknown true mechanism; the most likely model is that with the lowest AIC, relative to those in the set of models (Burnham & Anderson, 2002).

In this study, the candidate models (Table A1) were the four best performing thermal responses assessed by Angilletta (2006) (i.e. Gaussian, quadratic, modified Gaussian, Weibull) and three models that describe

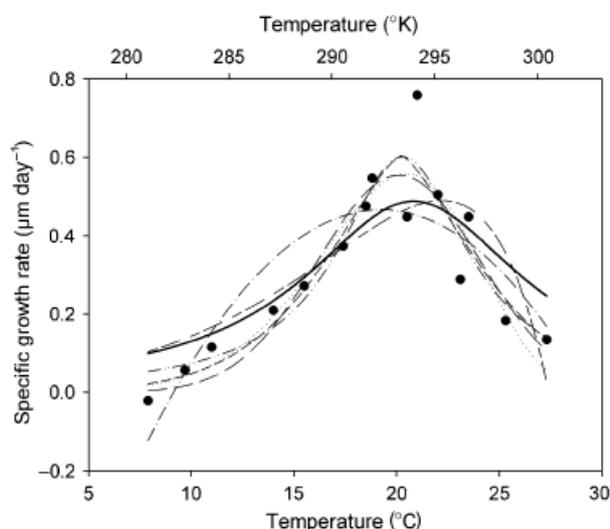


Fig. A1 Candidate models fit to *Cryptomonas* sp. growth data (see main text for details). Data points are growth rates (day^{-1}), and numbered lines are the following equations: (1) Gaussian, (2) quadratic, (3) modified Gaussian, (4) Weibull, (5) Schoolfield *et al.* (1981), (6) Hinshelwood (1947), and (7) Flinn (1991). Lines are formatted to facilitate following the path of each equation.

thermal rate responses of ectotherms (see Flinn, 1991; Hinshelwood, 1947; Schoolfield *et al.*, 1981). Of these models, only those presented by Schoolfield *et al.* (1981) and Hinshelwood (1947) have a mechanistic basis; the others are phenomenological.

Models were iteratively fit to response data using the Marquardt–Levenberg least squares algorithm (SIGMAPLOT), and parameters were determined. Then, using the residual sum of squares (RSS) from each fit, the maximized log-likelihood value (L) of the model [Eqn (A.1)] was determined (Burnham & Anderson, 2002); this was used to calculate the AIC_c (AIC corrected for small sample size) for each model [Eqn (A.2)]:

$$L = \log\left(\frac{\text{RSS}}{N}\right) - \frac{N}{2} \quad (\text{A.1})$$

$$AIC_c = -2L + 2K + \frac{2K(K+1)}{N-K-1} \quad (\text{A.2})$$

where N is the sample size and K is the number of parameters (including the error term). The Akaike weights [Eqn (A.4)] were calculated from the likelihood of each model [Eqn (A.3)], as a proportion of the total likelihoods of all the candidate models.

$$\ell(g_i|x) \propto e\left(-\frac{1}{2}\Delta_i\right) \quad (\text{A.3})$$

Table A1 The candidate models used to describe the relationship between *Cryptomonas* sp. growth (μ , day^{-1}) and temperature (T , $^{\circ}\text{C}$ or K , depending on the model); italicized letters are constants

Equation/source	Function	K	AIC	Δ_i	w_i
Flinn (1991)	$\mu = \frac{1}{1 + (a + bT + cT^2)}$	4	-65.40	0	0.61
Gaussian	$\mu = ae^{\left[-0.5\left(\frac{T-T_0}{b}\right)^2\right]}$	4	-63.43	1.97	0.23
Schoolfield <i>et al.</i> (1981)	$\mu_{(T)} = \frac{a\left(\frac{T}{293.15}\right)e^{\left[\frac{b}{R}\left(\frac{1}{293.15} - \frac{1}{T}\right)\right]}}{1 + e^{\left[\frac{c}{R}\left(\frac{1}{d} - \frac{1}{T}\right)\right]}}$	5	-61.40	4.01	0.08
Modified Gaussian	$\mu = ae^{\left[-0.5\left(\frac{T-T_0}{b}\right)^c\right]}$	5	-60.36	5.05	0.05
Weibull	$\mu = a\left(\frac{d-1}{d}\right)^{1-d/d}\left[\frac{T-b}{c} + \left(\frac{d-1}{d}\right)^{1/d}\right]^{d-1}e^{-\left[\left(\frac{T-b}{c} + \left(\frac{d-1}{d}\right)^{1/d}\right)^d + \frac{d-1}{d}\right]}$	5	-59.66	5.74	0.03
Quadratic	$\mu = \mu_0 + aT + bT^2$	4	-53.61	11.8	0.00
Hinshelwood (1947)	$\mu = ae^{\left[\frac{-c}{RT}\right]} - be^{\left[\frac{-d}{RT}\right]}$	5	-47.57	17.8	0.00

AIC is the Akaike information criterion, K is the number of parameters in the model (including the error term), Δ_i is the difference between a given model's AIC and that of the lowest AIC, and w_i is the Akaike weight that is the normalized likelihood that the model is the best one in the set. In the Schoolfield *et al.* (1981) model, a is the growth rate at temperature T (K), b is the enthalpy of the activation of the reaction that is catalyzed by the limiting enzyme, c is the change in enthalpy associated with high-temperature inactivation of the limiting enzyme, d is the temperature (K) at which the enzyme is half active, and R is the universal gas constant (i.e. the Boltzmann constant, 8.617343×10^{-5} when expressed in eV). In the Hinshelwood (1947) model, a and b are the pre-exponential factors, c and d are activation energies, and R is the universal gas constant (i.e. the Boltzmann constant).

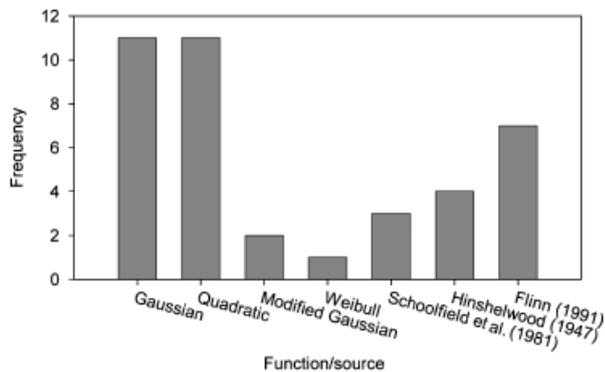


Fig. A2 The frequency that candidate functions were the best performing models when fit to 39 phytoplankton thermal response datasets.

$$w_i = \frac{e\left(-\frac{1}{2}\Delta_i\right)}{\sum_{r=1}^R e\left(-\frac{1}{2}\Delta_r\right)} \quad (\text{A.4})$$

where $\ell(g_i|x)$ is the likelihood of the model g_i , given the data x ; Δ_i is the difference between a given model's AIC and that of the lowest AIC; and R is the set of candidate models.

Thermal response curves typically exhibit a left-sided skewness that plateaus at the optimal temperature, and then declines (e.g. as described in Montagnes *et al.*, 2003). Furthermore, the skewed portion of the response generally follows an exponential relationship (e.g. Eppley, 1972; Bissinger *et al.*, 2008). From the candidate models fitted to the *Cryptomonas* sp. data (Table A1), the quadratic model was unable to describe this initial exponential response (Fig. A1), and was therefore rejected. Of the remaining functions, the phenomenological model of Flinn (1991) had both the lowest AIC_c and highest Akaike weight. Thus, it was the most likely

function of this set of models and was used to provide a predictive response in our modelling work.

A further assessment of this type of curve fitting on 39 phytoplankton thermal response datasets revealed that the Gaussian and quadratic functions were the most likely models (Fig. A2), with the Flinn (1991) function the third best performing model. However, as noted above, the quadratic function does not describe the exponential portion of the response; so for consistency we have used the Flinn (1991) function (Table A1) to structure all our temperature responses in this work on modelling the effects of temperature on protistan population dynamics.

Appendix references

- Angilletta MJ (2006) Estimating and comparing thermal performance curves. *Journal of Thermal Biology*, **31**, 541–545.
- Bissinger JE, Montagnes DJS, Sharples J, Atkinson D (2008) Predicting marine phytoplankton maximum growth rates from temperature: improving on the Eppley curve using quantile regression. *Limnology and Oceanography*, **53**, 487–493.
- Burnham KP, Anderson DM (2002) *Model Selection and Multi-model Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*, 2nd edn. Springer.
- Eppley RW (1972) Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fishery Bulletin*, **70**, 1063–1085.
- Flinn PW (1991) Temperature-dependent functional response of the parasitoid *Cephalonomia waterstoni* (Gahan) (Hymenoptera, Bethyilidae) attacking rusty grain beetle larvae (Coleoptera, Cucujidae). *Environmental Entomology*, **20**, 872–876.
- Hinshelwood CN (1947) *The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell*. Oxford University Press.
- Montagnes DJS, Kimmance SA, Atkinson D (2003) Using Q10: can growth rates increase linearly with temperature? *Aquatic Microbial Ecology*, **32**, 307–313.
- Schoolfield RM, Sharpe PJH, Magnuson CE (1981) Nonlinear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. *Journal of Theoretical Biology*, **88**, 719–731.

Diversity and Phylogenetic Affiliations of Morphologically Conspicuous Large Filamentous Bacteria Occurring in the Pelagic Zones of a Broad Spectrum of Freshwater Habitats

Michael Schauer* and Martin W. Hahn

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondsee, Austria

Received 20 August 2004/Accepted 25 October 2004

Filamentous bacteria with a conspicuous morphology were found in the majority of the bacterioplankton samples from a variety of freshwater habitats that were studied. These heterotrophic filaments typically account for <1 to 11% of the total number of bacteria. The biovolume of this morphotype can exceed 40% of the biovolume for all bacteria. Surprisingly, we found hardly any data on these morphologically conspicuous filaments in the literature. Mixed cultures containing these filamentous bacteria were established by cultivation and isolation experiments with samples from different freshwater lakes. Nearly full-length 16S rRNA gene sequences were obtained from several mixed cultures and environmental samples from habitats in Europe, Africa, China, Australia, and New Zealand. Phylogenetic analysis of the sequences showed that three groups form a single monophyletic cluster, the SOL cluster, in the family *Saprospiraceae*. We developed a set of six nested probes for fluorescence in situ hybridization. Of the six probes, one probe was specific for *Haliscomenobacter hydrossis*, three probes were specific for the three subclusters (each probe was specific for one subcluster), one probe was specific for the entire SOL cluster, and another probe targeted almost the entire *Saprospiraceae* family. Specific hybridization of environmental samples and enrichments showed that the members of the three subclusters exhibited the same filamentous morphology. So far, using the subcluster-specific probes, we have not been able to detect any bacteria with a differing morphology. We conclude that the SOL cluster bacteria are an integral part of bacterioplankton in many freshwater habitats. They potentially account for a large fraction of the total bacterial biomass but have been underrepresented in molecular diversity studies so far.

In the last 9 years, several studies provided insights into the phylogenetic composition of freshwater bacterioplankton communities (5, 6, 7, 8, 11, 13, 21, 23, 30, 31, 35, 37). Most of these studies investigated a single habitat or a few habitats, and only a few studies investigated a larger number of ecosystems (8, 37). Despite the limited number of comprehensive studies, a rough idea surfaced as to which groups of bacteria are typically present in freshwater bacterioplankton (37).

This study focused on a group of planktonic bacteria defined by their morphological characteristics. The conspicuous filamentous morphotype was observed in samples from many freshwater habitats, but we did not find detailed reports on the presence of these bacteria in freshwater in the literature, and not much is known about the phylogenetic affiliation of these striking filamentous bacteria. *Haliscomenobacter hydrossis* (32), a member of the *Saprospiraceae* family (which is found exclusively in wastewater treatment plants [34]), is known to exhibit a similar morphology.

The rationale of this work was to reveal the phylogenetic affiliation and ecological significance of this distinct group of filamentous bacteria. Therefore, molecular tools and culture approaches for the identification and cultivation of these prominent members of the bacterioplankton were developed. Due to the similarity in morphology, the initial steps of the

investigation presented here were directed against *H. hydrossis*. A large number of freshwater habitats were systematically investigated for the presence of the target bacteria. The systems investigated represent a broad range of habitats; habitats differing in size, geographic location, limnological status, etc., were studied. Substantial numbers of the conspicuous filamentous bacteria were detected in the majority of habitats investigated.

(This research was conducted by M. Schauer in partial fulfillment of the requirements for a Ph.D. degree of the University of Salzburg, Salzburg, Austria, 2005.)

MATERIALS AND METHODS

Study sites and sampling. We investigated samples from the pelagic zones of freshwater habitats in Europe, East Africa, China, Australia, and New Zealand. Samples from freshwater lakes and ponds were taken from a depth of 1 to 2 m with a 10-liter Schindler sampler and kept in 5-liter plastic bottles for less than 2 h until processed in the laboratory. Subsamples for total bacterial counts were fixed with formaldehyde (final concentration, 2%). For fluorescence in situ hybridization (FISH), samples of water (10 to 30 ml) were fixed with paraformaldehyde (final concentration, 2%) for 2 h at room temperature, passed through 0.2- μ m-pore-size polycarbonate filters (45 mm long; Millipore), dried, and frozen until further processing. To collect microbial biomass, samples of water (between 150 and 500 ml) were passed through 0.2- μ m-pore-size polycarbonate filters (45 mm long; Millipore). The filters were frozen at -70°C until the extraction of DNA (biomass filters).

Bacterial abundance and biovolume. Formaldehyde-fixed samples were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (final concentration, $6\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$) and enumerated by epifluorescence microscopy (Zeiss Axioplan; Zeiss, Jena, Germany). Between 300 and 700 DAPI-stained bacterial cells were counted at a magnification of $\times 1,250$. High-resolution images (752 by 548 pixels; 8-bit dynamic range) were saved with an analogue monochrome charge-coupled

* Corresponding author. Mailing address: Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria. Phone: 43 6232 3125 45. Fax: 43 6232 3578. E-mail: michael.schauer@oew.ac.at.

TABLE 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Length (nt) ^a	GC content (%)	T _m (°C) ^b	Specificity	Reference
1406F	TGY ACA CAC CGC CCG T	16	65.6	55.6	Bacteria	19
L189R	TAC TGA GAT CYT TMA RTT C	19	34.2	49.1	Bacteria	36
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	20	47.5	56.3	Bacteria	20
530FC	TCC GTG CCA GCA GCC GCG G	19	78.9	67.5	Bacteria	20 ^c
Hal1R	CTC TAA AAG GAG GTA TTC	18	38.9	49.1	<i>Saprospiraceae</i>	This study
Hal3R	AGC TAT GAG ACT TTG ACT	18	38.9	49.1	<i>Saprospiraceae</i>	This study
26F	AGG ATG AAC GCT AGC GGG	18	61.1	58.2	Bacteria	This study
HAL-1473R	CTT AGC CCC AGT TAC TGG TTT T	22	45.5	58.4	HAL subcluster	This study
LD2-1473R	CTT AGC CCC AGT CAC TAG TTT T	22	45.5	58.4	LD2 subcluster	This study
GKS-1473R	CTT AGC CCC AGT CAT TGG TTT T	22	45.5	58.4	GKS2-217 subcluster	This study
SAP-1490R	CGG CTA CCT TGT TAC GAC TTA G	22	50	60.3	Bacteria	20 ^c

^a nt, nucleotides.

^b T_m, melting temperature [T_m = 69.3 + 41 × [(nG + nC)/s] - (650/s), where nG is the number of G's in the sequence, nC is the number of C's in the sequence, and s is the length of the sequence].

^c Primers were modified to amplify preferentially target bacterial sequences.

device camera (Hitachi Denshi, Ltd., Tokyo, Japan) and processed with the image analysis system LUCIA G (Lucia 4.51; Laboratory Imaging, Ltd., Prague, Czech Republic). To determine bacterial cell volumes, the images of 50 filaments and 100 other bacteria per sample were analyzed with LUCIA G. Bacterial cell volumes were calculated by using the formula of Andersson et al. (3). Because of a lack of suitable conversion factors, we did not calculate bacterial biomass.

Cultivation and isolation experiments. In order to isolate and cultivate bacteria of the SOL cluster, a variety of cultivation and isolation experiments were performed. Filaments of the SOL morphotype were generally cultivated and isolated in sterile glassware at 15°C with continuous illumination without agitation. For base media, a complex organic NSY medium (3 g of organic substrate liter⁻¹) (for details, see reference 9), an *H. hydrossis*-specific medium (3.3 g of organic substrate liter⁻¹; DSM 134), and an inorganic IBM medium (10) enriched with different amounts of complex organic substrates (NSY medium) and sterile lake water (15) were tested. Briefly, sterile lake water was prepared by filtering the water through presterilized 0.22-μm-pore-size filtration towers (Steritop; Millipore) directly into sterile 1-liter Schott bottles. These bottles were heated in a microwave to a temperature slightly under the boiling point (heating 1 liter of lake water for 7 min 30 s at 1,000 W) to avoid precipitation of inorganic substances. Microwave treatment was performed twice with subsequent cooling phases to suppress bacterial growth effectively. Media were supplemented with vitamin B₁₂ and thiamine (final concentration, 10 μg liter⁻¹). Growth of the target bacteria was also tested with the following organic substrates added at a concentration of 100 mg liter⁻¹ to an inorganic IBM medium: sodium acetate, deoxycholic acid, pyruvic acid, *n*-caproic acid, caprylic acid, capric acid, D-glucose, D-galactose, potassium citrate, glycolic acid, glutamic acid, and Tween 80. The resistance of *H. hydrossis* strain DSM1100 antibiotics was tested in DSM 134 medium. Antibiotics were added at concentrations of 50 mg liter⁻¹ (for polymyxin thiosulfate, gentamicin sulfate, and neomycin) and 100 mg liter⁻¹ (for nalidixic acid, streptomycin sulfate, and ampicillin). Mixed cultures obtained from environmental samples by the methods mentioned above were diluted or subcultured in new flasks every 4 to 8 weeks. Substrates were added at low concentrations (100 to 200 mg liter⁻¹) in weekly to biweekly intervals. Bacterial growth was monitored by counting samples stained with DAPI with an epifluorescence microscope (Zeiss Axioplan).

DNA extraction. Nucleic acids were extracted either by a standard protocol (including incubation with lysozyme and proteinase K and subsequent extraction with phenol-chloroform-isoamyl alcohol [25:24:1, pH 8] and chloroform-isoamyl alcohol [24:1]) or alternatively with a much faster beadbeater extraction routine (FastDNA kit and FastPrep instrument FP120; QBioGene) following the manufacturer's recommendations. Qualitative comparison of extracts by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) did not yield significant differences.

Primer design and evaluation. Reverse primers HAL1R and HAL3R targeting the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) were designed after sequencing the internal transcribed spacers (ITSs) of *H. hydrossis*, *Saprospira grandis*, *Flexibacter elegans*, *Flexibacter sancti*, *Cytophaga hutchinsonii*, *Chitinophaga pinensis*, and *Flectobacillus major* with primers 1406F (19) and L189R (36). The newly developed, more-specific primers 26F, HAL-1473R, LD2-1473R, GKS-1473R, and SAP-1490R (primer sequences and specificities shown in Table 1), were designed on the basis of the first set of SOL cluster bacterial 16S rRNA gene

sequences. Optimization of PCRs for newly designed primers was performed in a Mastercycler gradient (Eppendorf).

PCR and sequencing. Bacterial 16S rRNA genes were amplified in a Primus 96^{plus} thermal cycler (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). The reaction mixtures (50 μl) contained 100 μM concentrations of each of the deoxynucleotide triphosphates, 0.3 μM concentrations of each of the primers, 3 mM MgCl₂, 1× PCR buffer, and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (QIAGEN). The universal bacterial primer 27F (20) and the two reverse primers (HAL1R and HAL3R) were used for the amplification of nearly full-length 16S rRNA gene sequences. The PCR program follows: (i) an initial denaturation step (2 min at 94°C); (ii) 30 cycles, with 1 cycle consisting of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 56°C), and extension (2 min at 72°C); and (iii) a final extension step (5 min at 72°C). Specific amplification of nearly full-length 16S rRNA gene sequences of subclusters HAL, GKS2-217, and LD2 in the *Saprospiraceae* family was performed with primers 26F and HAL-1473R, GKS-1473R, and LD2-1473R, respectively. The PCR program follows: (i) an initial denaturation (2 min at 94°C); (ii) 30 cycles, with 1 cycle consisting of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 62°C), and extension (2 min at 72°C); and (iii) a final extension step (5 min at 72°C). For a template, 1-μl samples of the total microbial DNA extracts or small pieces (~5 mm²) of biomass filters were used. Filter PCR was performed by the protocol of Kirchman et al. (17). Comparison of bacterial DNA amplified from PCRs with extracted template DNA and reactions with small pieces of 0.2-μm-pore-size polycarbonate filters from the same sample by DGGE (according to the protocol described in reference 24) did not yield any qualitative differences in the microbial fingerprints obtained. PCR products were sequenced by MWG Biotech. Primer 530FC (modified from the primer in reference 20) was used to sequence the middle section of the 16S rRNA gene. For details on the primers used in this survey, refer to Table 1. Two sequences (MS-Falk1-L and MS-oKlaff1-L) were retrieved from two clone libraries. For the construction of clone libraries, nearly full-length bacterial 16S rRNA gene sequences of a subset of the bacterial community were amplified by PCR using primers 26F and SAP-1490R (modified from the primers in reference 20). Cloning was performed with the QIAGEN PCR Cloning^{plus} kit following the manufacturer's recommendations. Plasmid DNA was extracted using the Nucleospin plasmid kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Phylogenetic analysis. The BLAST program (2) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) was used to search for related sequences with high similarity values. A comparative analysis of all newly obtained sequences and relatives found in the databases was done with the ARB software package (<http://www.arb-home.de>). Sequences imported into the ARB database were aligned with the Fast Aligner tool of ARB and checked manually for misaligned positions. Phylogenetic trees were constructed for stretches of 1,357 homologous nucleotides. Evolutionary distances were corrected using the algorithm of Jukes and Cantor (14). Partial sequences shorter than 1,357 nucleotides were added to the existing neighbor-joining tree by the ARB parsimony tool without changing the tree topology. Bootstrap values were calculated using the Mega V2.1 program (18) (<http://www.megasoftware.net>). The tree topologies of neighbor-joining trees were validated using maximum-parsimony and maximum-likelihood algorithms as alternative tree construction methods. Sequence similarities were calculated as uncorrected base identities between sequences on the basis of sequence alignments.

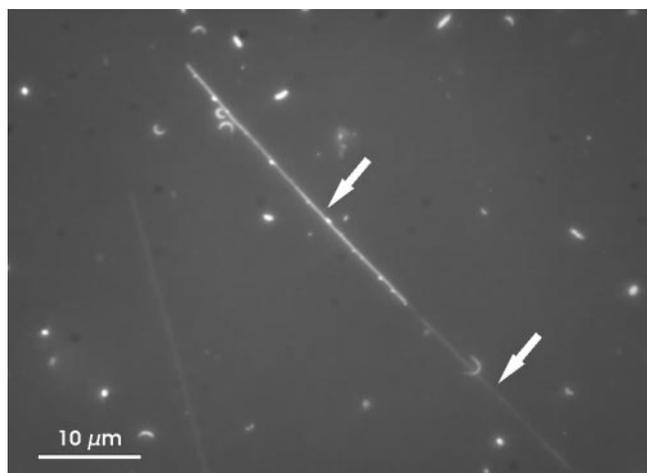


FIG. 1. Microscopic image of a DAPI-stained bacterioplankton sample from Lake Victoria (31 May 2001) presenting a filament of the SOL morphotype. These filaments always possess blunt ends, and flagella were never observed. These characteristics together with the unbowed rigid habit of the filaments allows for a reliable discrimination of members of the SOL morphotype against other filamentous bacteria by standard microscopic techniques. The upper arrow marks the filament with yellowish granule. The lower arrow marks a sheath covering the filament. A similar sheath is also known to cover the wild-type cells of *H. hydrossis*. Magnification, $\times 1,250$.

Probe design and FISH. A nested set of six oligonucleotide probes with different specificities for our target bacteria was designed using the ARB software package. The stringency of the hybridization conditions for the probes was adjusted by a series of solutions of formamide (0 to 60% formamide concentration). The conditions were adjusted with filters from several habitats for all newly designed probes. Signal intensities were evaluated by eye. Probes labeled with the indocarbocyanine dye Cy3 were purchased from Interactiva (Ulm, Germany). FISH was performed on polycarbonate filter sections by the protocol of Alfreider et al. (1). Counting bacteria on FISH filter sections was performed by epifluorescence microscopy (Zeiss Axioplan) at a magnification of $\times 1,250$.

Nucleotide sequence accession numbers. The nearly full-length 16S rRNA gene sequences obtained were deposited in the EMBL nucleotide sequence database under the accession numbers AJ784892 and AJ786318 to AJ786342.

RESULTS

Water samples from the pelagic zones of 102 different freshwater habitats located on three continents and in three different climatic zones were investigated. In 78 of the 102 habitats (76%), bacteria with a conspicuous morphology were found. These filamentous bacteria exhibit a very distinct morphology and are easily distinguished from the rest of the heterotrophic bacterioplankton. The large cells resemble thin, unbowed sticklike filaments. While the cell diameter is quite stable (between 0.25 and 0.35 μm), the length of the filaments is highly variable (8 to $>100 \mu\text{m}$). A sheath covering the filaments was sometimes visible in DAPI-stained preparations (Fig. 1). In some of the samples, these filaments featured small yellowish particles, which seemed to stick to the surfaces of the cells. Altogether, the described morphotype reminded us remarkably of an Austrian brand of pretzels, so we called this distinct morphology the SOL morphotype.

Bacteria with the conspicuous SOL morphotype were found in plankton samples from a broad range of habitats. Freshwater lakes and rivers inhabited by bacteria of the SOL morphotype were found in the following varied locations: large tropical

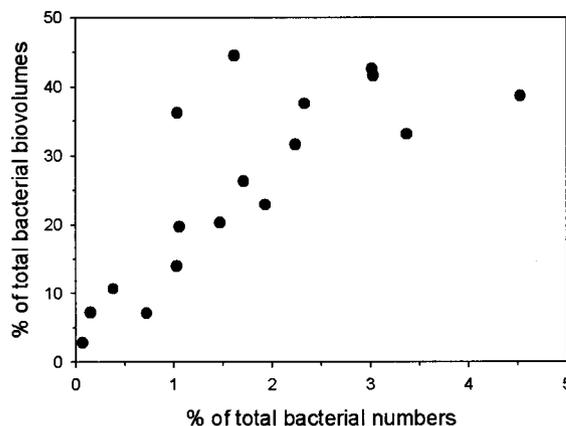


FIG. 2. Contribution of SOL morphotype bacteria to the number and biovolume of all bacteria in 17 samples from 16 different freshwater habitats. Selected samples represent a broad range of ecologically different habitat types.

lakes (e.g., Lake Victoria and Lake Tanganyika in East Africa), subtropical shallow eutrophic lakes and rivers (e.g., Lake Taihu, Changjiang river [Yangtze] in the People's Republic of China), large shallow lowland lakes (e.g., Lake Loosdrecht, The Netherlands), large oligotrophic prealpine lakes (e.g., Lake Attersee, Austria), and small deep ultraoligotrophic high mountain lakes (e.g., Lake Oberer Klaffersee and Lake Kapuzinersee in Austria). SOL morphotype bacteria were not detected in acidic habitats (pH 4.4 to 5.9; seven habitats) or in habitats with short water retention times (4 to 10 days; three habitats) or in nonpermanent freshwater bodies (small, shallow water bodies; two habitats). The other freshwater ecosystems (12 habitats) where it was not possible to detect these filamentous bacteria did not fit in any of those generalized types of habitats. Bacteria of the SOL morphotype were not detected in five acidified Bohemian forest lakes studied, which are known to be frequently dominated by filamentous bacteria (33). The absolute numbers of target bacteria ranged from several hundreds to 200,000 cells ml^{-1} . The relative contribution of the SOL morphotype to the total number of bacteria ranged from 0.1 to 10.8%, with a typical value of around 1% of the total bacterioplankton. Biovolume estimations for the SOL morphotype in several habitats ranged from 2.8 to 44.5% of the total bacterial biovolume (Fig. 2).

Cultivation and isolation experiments. In order to cultivate and isolate bacteria of the SOL morphotype, we attempted several different strategies. (i) Dilution cultures were established in the wells of cell culture plates and in sterile glass flasks. Sterile lake water, NSY medium (3 g of organic substrate liter $^{-1}$), and *Haliscomenobacter* medium (DSM 134; 3.3 g of organic substrate liter $^{-1}$) were used as the base media. The plates and flasks were incubated for several days to weeks and screened by epifluorescence microscopy. No pure isolates could be obtained from these dilution experiments. (ii) Live filaments were sorted with a MoFlo cell sorter (Cytomation, Fort Collins, Colo.) with the assistance of Stefan Andreatta. For details on the cytometer settings, see reference 4. SOL morphotype filaments were sorted with a low-salt sheath fluid in cell culture plates containing sterile filtered lake water or inorganic IBM medium enriched with small amounts of or-

TABLE 2. Environmental samples used for cultivation and enrichment experiments and details on the sequences retrieved

Geographic origin of sample	Total no. of bacteria (10 ⁶ ml ⁻¹) ^a	No. of SOL morphotype bacteria (10 ⁴ ml ⁻¹) ^a	Sequence	Affiliation (subcluster)	Accession no.	Length (nt) ^b
Lake Egelsee	1.59	0.19	MS-Egel1-L	LD2	AJ786318	940
Lake Egelsee	1.59	0.19	MS-Egel1-H	HAL	AJ786324	765
Jaegerteich pond	5.94	7.13	MS-Jaeger1-L	LD2	AJ786319	1,135
Lake Wolfgangsee	1.30	1.11	MS-Wolf1-H	HAL	AJ786322	1,414
Lake Wolfgangsee	ND ^c	2.00	MS-Wolf2-H	HAL	AJ786323	1,478

^a On the sampling day.

^b nt, nucleotides.

^c ND, not determined.

ganic substrates (25 or 50 μ l of NSY medium to 2 ml of IBM medium). One, 10, 100, and 1,000 cells were sorted into the different media in replicate wells. No growth of filaments was observed for any of the different treatments after incubation of the plates for 2 weeks at 15°C. (iii) In another experiment, a series of environmental samples and enrichment cultures were plated on agar plates containing NSY medium (3 g liter⁻¹), and *Haliscomenobacter* medium (DSM 134; 3.3 g liter⁻¹). After 1 week of incubation at 15°C, colonies were screened by epifluorescence microscopy. No colony formation of filamentous bacteria was detected.

While the attempt to establish pure cultures failed, it was possible to enrich and cultivate (long-term) the mixed cultures. The enrichment of SOL morphotype bacteria was accomplished partly by reducing the diversity and total number of bacteria in samples and partly by increasing the number of target bacteria through modified growing conditions. The most successful treatments were the addition of glutamic acid (concentration of 100 mg liter⁻¹) as an organic substrate to filtered (0.2- μ m-pore-size filters) and microwave-treated lake water and inhibition of other bacteria by treatment with nalidixic acid (final concentration, 100 mg liter⁻¹). Cultivation of bacteria of the SOL morphotype normally resulted in a substantial increase of the target bacteria (up to 42% of the total number of bacteria). With this type of treatment, we were able to obtain several mixed cultures of members of the HAL and LD2 subclusters (details on phylogenetic analysis given below) of the SOL cluster bacteria. Mixed cultures were subcultured every 4 to 8 weeks. Cultures were maintained for several weeks to more than 1 year. For more details on the samples used for the enrichment experiments, see Table 2.

Primer design and specific direct sequencing. The first specific primers developed, primers HAL1R and HAL3R (Table 1), were derived from 16S-23S ITS sequences of *H. hydrossis* and several related bacterial strains available in culture collections. The primer binding positions are at the very beginning of the ITS region and the first tRNA gene located in the ITS. These primers were designed with a broader phylogenetic specificity to recover sequences of *H. hydrossis* and close relatives in the family *Saprospiraceae*. These reverse primers were combined with the universal bacterial primer, primer 27F. First, nearly full-length sequences of the target bacteria allowed the development of more-specific primers 26F, SAP-1490R, HAL-1473R, LD2-1473R, and GKS-1473R. Primer 26F was designed to match all of the available sequences from members of the *Saprospiraceae* family but is not strictly specific for this group. Primer SAP-1490R was derived from universal

primer 1490R (20) to preferentially fit known *Saprospiraceae* sequences but also matches a broad spectrum of other bacterial 16S rRNA gene sequences. The combination of the 26F primer with subcluster-specific primers HAL-, LD2-, and GKS-1473R allowed a subcluster-specific amplification (details on phylogenetic analysis given below) of 16S rRNA gene sequences from a variety of environmental samples (Table 3) and mixed cultures. The sequences consisted of 765 to 1,478 nucleotides and contained 0 to 7 ambiguous positions (average, 1.17). Resequencing *H. hydrossis* strain DSM1100 with primers 27F and HAL1R yielded a slightly longer 16S rRNA gene sequence (1,509 nucleotides) with fewer ambiguous positions than a previously published sequence of the same strain (accession no. M58790).

Comparative analysis of 16S rRNA gene sequences. The alignment and phylogenetic analysis of the 25 16S rRNA gene sequences obtained and previously published sequences yielded three phylogenetic groups. Only the first group contains a described species, namely, *H. hydrossis*; therefore, it was named the HAL subcluster. The second group of sequences joined the LD2 cluster introduced by Zwart et al. (37). The rest of the retrieved sequences formed a phylogenetic group with a sequence obtained from Lake Gossenköllesee. We named this new group GKS2-217 according to the clone name introduced by Glöckner et al. (8). These three groups form a monophyletic cluster (the SOL cluster) affiliated with the family *Saprospiraceae* (*Bacteroidetes* phylum). Aside from the sequence of the only described species (*H. hydrossis*), all other previously published sequences that were found to be affiliated with the SOL cluster were retrieved only by culture-independent methods from freshwater habitats. Some shorter sequences that were also affiliated with the SOL cluster (Table 4) were omitted in the calculation of the phylogenetic tree (presented in Fig. 3), due to their limited length.

Trees constructed by alternative methods (maximum-parsimony and maximum-likelihood algorithms) validated the topology of the neighbor-joining tree shown in Fig. 3. The high bootstrap values for the SOL cluster and the HAL, LD2, and GKS2-217 subcluster levels support the topology shown in Fig. 3. The short sequence of the clone LiUU-11-221 was added to the tree by way of the ARB parsimony method. The exact position of this sequence inside the SOL cluster could not be determined. To validate the position of this clone in the SOL cluster, we truncated the sequences of our data set in order to include some shorter sequences in the tree-building process. This additional tree building (data not shown) supported the position of this clone in the SOL cluster with high bootstrap

TABLE 3. Details on habitats from which sequences were retrieved by direct sequencing without enriching SOL cluster bacteria

Sampling site	Trophic status	Country	Climatic zone	Total no. of bacteria (10^6 ml^{-1})	No. of SOL morphotype bacteria (10^4 ml^{-1})	SOL morphotype bacteria (% of total)	% of bacterial biovolume	Sequence	Affiliation (subcluster)	Accession no.
Lake Irrsee	Oligomesotrophic	Austria	Temperate	1.05	1.09	1.04	36.2	MS-Irr1-H	HAL	AJ786320
Lake Irrsee	Oligomesotrophic	Austria	Temperate	1.05	1.09	1.04	36.2	MS-Irr2-H	HAL	AJ786329
Lake Mondsee	Oligomesotrophic	Austria	Temperate	2.66	0.39	0.15	7.2	MS-Mond1-H	HAL	AJ786321
Lake Ahomsee	Oligotrophic	Austria	Temperate	0.62	1.39	2.24	31.6	MS-Ahom1-G	GKS2-217	AJ786325
Lake Kapuzinersee	Oligotrophic	Austria	Temperate	0.3	0.91	3.03	41.6	MS-Kapu1-G	GKS2-217	AJ786326
Lake Oberer Klaffersee	Oligotrophic	Austria	Temperate	0.55	1.66	3.02	42.6	MS-oKlaff1-G	GKS2-217	AJ786327
Lake unterer Sonntagskarsee	Oligotrophic	Austria	Temperate	0.18	0.59	3.28	33.1	MS-uSonn1-G	GKS2-217	AJ786328
Lake Wolfgangsee	Oligotrophic	Austria	Temperate	1.12	2.61	2.33	37.6	MS-Wolf1-L	LD2	AJ786330
Lake Toplitzsee	Oligotrophic	Austria	Temperate	1.39	1.43	1.03	14.0	MS-Topli1-L	LD2	AJ786332
Lake Schwarzensee	Oligotrophic	Austria	Temperate	1.05	0.4	0.38	10.7	MS-Schwa1-L	LD2	AJ786334
Lake Mondsee	Oligomesotrophic	Austria	Temperate	2.19	1.57	0.72	7.1	MS-Mond1-L	LD2	AJ786337
Lake Irrsee	Oligomesotrophic	Austria	Temperate	1.87	1.98	1.06	19.7	MS-Irr1-L	LD2	AJ786338
Lake Attersee	Oligotrophic	Austria	Temperate	1.12	5.07	4.53	38.7	MS-Atter1-L	LD2	AJ786340
Lake Falkertsee	Oligotrophic	Austria	Temperate	0.96	1.85	1.93	22.9	MS-Falk1-L	LD2	AJ786341
Lake Krottensee	Oligotrophic	Austria	Temperate	1.13	1.66	1.47	20.3	MS-Krott1-L	LD2	AJ786342
Lake Loosdrecht	Eutrophic	The Netherlands	Temperate	3.13	5.07	1.62	44.5	MS-Loos1-L	LD2	AJ786339
Pond in Dunedin	ND ^a	New Zealand	Temperate	ND	ND	ND	ND	MS-NZ1-L	LD2	AJ786335
Pond in Sydney	ND	Australia	Temperate	ND	ND	ND	ND	MS-Aus1-L	LD2	AJ786336
Lake Taihu	Hypertrophic	China ^b	Subtropical	ND	ND	ND	ND	MS-Taihu1-L	LD2	AJ786333
Lake Tanganjika	Oligotrophic	Zambia	Tropical	1.75	0.12	0.07	2.8	MS-Tang1-L	LD2	AJ786331

^a ND, not determined.^b People's Republic of China.

values for the SOL cluster in any case. The minimal sequence similarity values inside the subclusters are 98.7% for the HAL subcluster, 97.6% for the LD2 subcluster, and 99.7% for the GKS2-217 subcluster. The maximum similarities between subclusters are 92.7% for the HAL and LD2 subclusters, 95.5% for the HAL and GKS2-217 subclusters, and 92.1% for the LD2 and GKS2-217 subclusters. The overall minimum similarity value inside the SOL cluster is 88% (Table 5).

FISH. We used nested FISH probes to detect phylogenetic groups of various levels in lake water samples (Table 6). The new probe HHY-441 is specific for the *H. hydrossis* species. All other sequences inside the broader HAL subcluster contain one to two mismatches at the probe binding position. We used this probe in order to determine whether we could find filaments of *H. hydrossis* in lake water samples. Hybridization of samples from natural freshwater habitats did not yield any

positive signals with this very specific probe. This indicates the absence of *H. hydrossis* as found in wastewater treatment plants (34) in all of the natural freshwater ecosystems tested. Nevertheless, we were able to detect bacteria of the HAL subcluster in a broad range of habitats with the subcluster-specific probe HAL-844.

Probe CF-319a (22), which was designed for the broad *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* group shows one mismatch with all available SOL cluster 16S rRNA sequences. This results in weak to undetectable signals of SOL cluster filaments under stringent hybridization conditions. We designed a probe for the family *Saprospiraceae* (probe SAP-309), which targets all of the members of the SOL cluster as well as more than 80% of all other available sequences from members of the *Saprospiraceae* family. This probe detected all filaments of the SOL morphotype in each of our samples. The SOL-852 probe

TABLE 4. Sequences affiliated with the SOL cluster but not presented in the tree shown in Fig. 3 due to insufficient sequence length^a

Sequence name	Accession no.	Length (nt) ^b	Affiliation (subcluster)	Sample type	Reference
Clone BCM3S-7B	AY102912	719	HAL	Subtropical freshwater marsh	Unpublished
Clone csbio160175	AY187353	942	HAL	Drinking-water biofilm	28
Clone Urk0-01	AJ416169	709	LD2	The Netherlands, Lake IJssel	37
Clone Med0-02	AJ416157	699	LD2	The Netherlands, Lake IJssel	37
Clone DC5-0-5	AY145578	506	LD2	Germany, Weser estuary	Unpublished
Clone CR98-5-53	AF428783	600	LD2	China, Changjiang River (Yangtze)	29
Clone CR98-35-61	AF428943	600	LD2	China, Changjiang River (Yangtze)	29
Clone CR98-5-24	AF428754	600	LD2	China, Changjiang River (Yangtze)	29
Clone CRP99-04	AF428658	600	LD2	China, Lake Poyang	29
Clone LiUU-5-268	AY509298	763	LD2	Sweden, freshwater bacterioplankton	Unpublished
Clone LiUU-9-278	AY509321	800	LD2	Sweden, freshwater bacterioplankton	Unpublished
Clone LiUU-9-266	AY509369	798	LD2	Sweden, freshwater bacterioplankton	Unpublished
Clone LiUU-3-375	AY509275	800	LD2	Sweden, freshwater bacterioplankton	Unpublished

^a The affiliation of the sequences with the SOL cluster was proven by detailed phylogenetic analysis.^b nt, nucleotides.

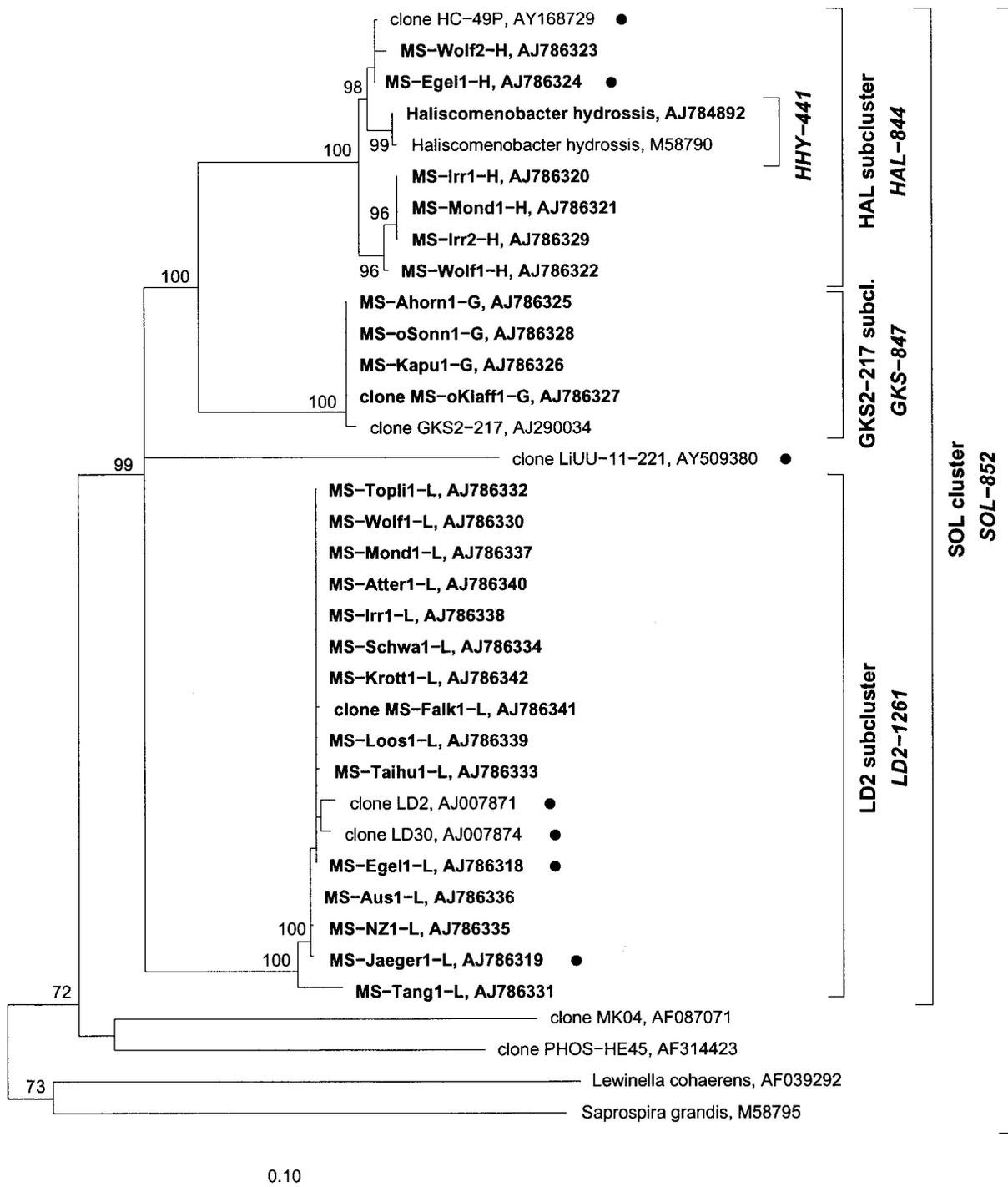


FIG. 3. Phylogenetic tree showing the affiliation of new bacteria of the *Saprospiraceae* family (in bold type) from mixed cultures and environmental samples. The neighbor-joining tree was calculated with almost full-length 16S rRNA gene sequences. Seven shorter sequences (765 to 1,165 nucleotides) (indicated by a small solid circle) were added by the ARB parsimony method without changing the tree topology. *H. hydrossis* sequence AJ784892 is the resequenced sequence. Bootstrap values (1,000 iterations) of >50% are given. Brackets indicate the specificity of FISH probes (probe names in italic type). Probe SAP-309 targets all SOL cluster bacteria and >80% of the remaining sequences within the *Saprospiraceae* family.

was designed to cover all SOL cluster sequences in our database, yet it also perfectly matched the sequence of the clone PHOS-HE19 (accession no. AF314428), which does not belong to the SOL cluster. Additionally, some members of the *Bacte-*

roidetes show only weak mismatches with this probe. This reduced specificity of the probe results in signals from bacteria with different morphologies (rods and cocci) in some environmental samples. However, we did not observe FISH signals of

TABLE 5. Similarity values within and between subclusters HAL, LD2, and GKS2-217

Subcluster	16S rRNA gene sequence similarity value ^a					
	HAL		LD2		GKS2-217	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
HAL	98.7	100				
LD2	90.1	92.7	97.6	100		
GKS2-217	93.8	95.5	89.9	92.1	99.7	100
LiUU-11-221 ^b	88	91.5	88.7	91.5	89.5	89.7

^a Minimum (Min) and maximum (Max) similarity values within and between subclusters.

^b Representative of a potential fourth subcluster inside the SOL cluster.

these rods and cocci with the SAP-309 probe (which covers all SOL cluster sequences), so we can exclude the possibility that members of these morphotypes belong to the SOL cluster. Probe SOL-852 detected all SOL filaments in any of the environmental samples investigated so far. The subcluster-specific probes HAL-844, LD2-1261, and GKS-847 (Fig. 4) did not yield any signals from cells other than the SOL morphotype.

DISCUSSION

Between several hundred to more than 100,000 individuals of the remarkable SOL morphotype per ml were found in most of the bacterioplankton samples that were analyzed. This morphotype typically accounted for around 1% of the total bacteria. The use of standard procedures for direct counts of microbial abundance (16) should lead to the detection of some of these striking organisms in almost every sample from a freshwater habitat inhabited by SOL bacteria. Given the observed abundance of SOL cluster bacteria and the fact that these filamentous bacteria produce quite bright and conspicuous signals when they were stained by standard procedures (26), one would think that these conspicuous filamentous bacteria would be mentioned in a number of articles in journals with a microbial and limnological focus. Surprisingly, the reverse is true. There are few mentions of these filamentous forms, and if they are mentioned or depicted, it looks rather accidental. Schmaljohann et al. (27) detected long straight filaments with diameters of 0.4 μm and lengths of up to 30 μm in Lake Kinneret in Israel. Alfreider and coworkers (1) pictured some of these filamentous members of bacterioplankton hybridized with eubacterial probe EUB338 on a figure presenting FISH data on Lake Gossenköllesee, a mountain lake high in the Austrian

Alps. Hofer et al. (12) worked on the same lake and demonstrated that filamentous viruses infect bacteria of the SOL morphotype. Recently, Pernthaler et al. (25) also demonstrated that members of the LD2 subcluster derived from Lake Schöhsee in Germany possess the conspicuous SOL morphology.

We demonstrate here that this distinct morphotype consists of a genetically quite diverse (Table 5) yet monophyletic group. In view of the high frequency of occurrence of members of the SOL cluster in a broad range of different freshwater habitats, as well as their remarkable contribution to the total bacterial biomass, this group of bacteria was clearly underrepresented in bacterial diversity studies performed by culture-independent methods. Apart from the sequence of the only described species (*H. hydrossis*), there was only a limited number of 16S rRNA gene sequences affiliated with the SOL cluster available up to now. The sequence of clone HC-49P (accession no. AY168729) was obtained from an arsenite-oxidizing biofilm (unpublished data). The short sequences of clones BCM3S-7B (accession no. AY102912) and csbio160175 (accession no. AY187353) were retrieved from a subtropical freshwater marsh (unpublished data) and a drinking water biofilm (28), respectively. The GKS2-217 clone comes from a clone library of the high mountain Lake Gossenköllesee (8). Zwart and coworkers (38) retrieved some sequences from Lake Loosdrecht (clone LD2 [accession no. AJ007871] and clone LD30 [accession no. AJ007874]) and Lake IJssel (clone Urk0-01 [accession no. AJ416169] and clone Med0-02 [accession no. AJ416157]) and designated these four sequences as the typical freshwater bacterial cluster LD2 (37). Sequencing of a DGGE band retrieved from a dilution culture of the Weser estuary in Germany yielded the short sequence of clone DC5-0-5 (unpublished data) (accession no. AY145578). Sekiguchi et al. (29) obtained short sequences from the Changjiang (Yangtze) river and Lake Poyang in the People's Republic of China (accession no. AF428658, AF428754, AF428783, and AF428943). Five sequences 763 to 1,038 nucleotides long were obtained from different lakes in Sweden by Eiler et al. (unpublished data) (accession no. AY509298, AY509321, AY509369, AY509275, and AY509380). The monophyletic SOL cluster was found by phylogenetic analysis of the 25 16S rRNA sequences retrieved from a variety of different habitats in this study together with some of the sequences already known. The three subclusters HAL, LD2, and GKS2-217 form this monophyletic SOL cluster. The hybridization of a broad spectrum of bacterioplankton samples with subcluster-specific probes

TABLE 6. Oligonucleotide probes used in this study

Probe	Sequence (5'→3')	GC content (%)	T _m (°C) ^a	Length (nt) ^b	Specificity	Formamide concn (%)	No. of unspecific matches ^c
SAP-309	TCT CAG TAC CCG TGT GGG	61.1	48.3	18	<i>Saprospiraceae</i>	25	8
SOL-852	ACG CTT TCG CTT GGA CAC	55.6	50.9	18	Soletticluster	30	20
HAL-844	CGC TTG GAC ACT CAC TCC	61.1	48.1	18	HAL subcluster	25	1
GKS-847	TTC GCT TGG ACA CAC AAT C	47.4	48.9	19	GKS2-217 subcluster	25	1
LD2-1261	GGC TCC GCT TCA CAG CTT	61.1	52.7	18	LD2 subcluster	30	3
HHY-441	CCA GAT TTC TTC CCA AGC	50	46.8	18	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	20	17

^a T_m, melting temperature (according to the manufacturer).

^b nt, nucleotides.

^c Number of known sequences matching (<1 weighted mismatch) the probes but not affiliated to the respective target groups.

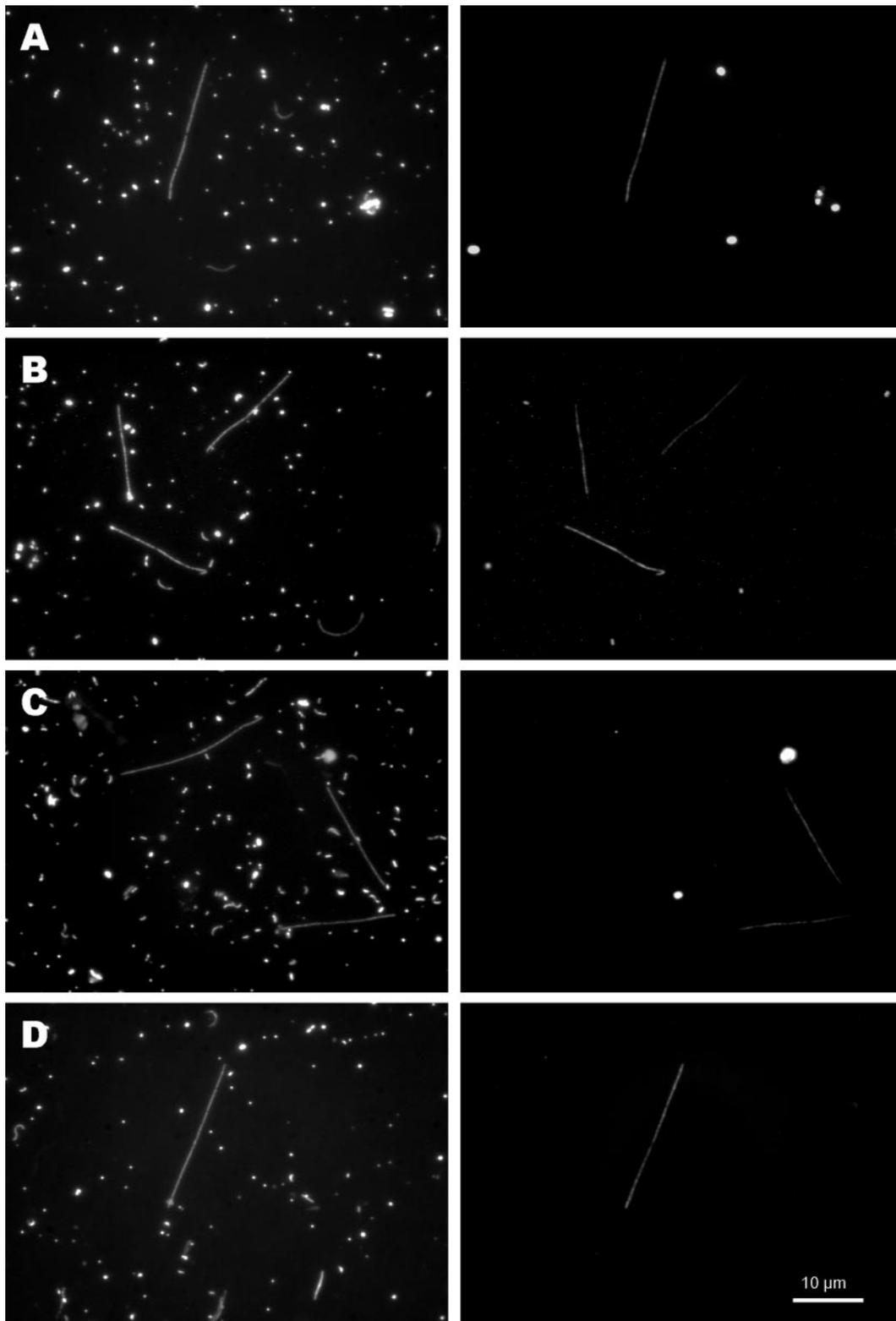


FIG. 4. Pairs of microscopic images of the same microscopic field with UV excitation (DAPI stained; left column) and green excitation (hybridized with Cy3-labeled oligonucleotide probes; right column). Probes SAP-309 (A), SOL-852 (B), HAL-844 (C), and LD2-1261 (D) were used. All coccoid signals on the right-hand images arise from phototrophic organisms (autofluorescent signals). All photomicrographs were taken at a magnification of $\times 1,250$. The scale bar is valid for all microscopic images.

proved that members of all three subclusters have the same conspicuous morphology.

However, in some environmental samples, a small fraction of typical SOL morphotype bacteria did not hybridize with any of the three subcluster-specific probes. This finding together with the phylogenetic position of the LiUU-11-221 clone in the neighbor-joining tree shown in Fig. 3 gives rise to the question of whether there are more than three subclusters belonging to the SOL cluster. Taking into account the high genetic diversity of this group and the scarce data on the bacterioplankton community of freshwater habitats in major parts of the world, one would not be surprised by the appearance of additional phylogenetic subclusters of bacteria also possessing the SOL morphology. Nevertheless, with probes SAP-309 and SOL-852, we were able to securely identify all SOL morphotype bacteria in all environmental samples investigated so far.

Members of the SOL cluster were found in a wide spectrum of different freshwater habitats. Samples were taken on three continents over temperate, subtropical, and tropical zones. The limnological characterization of the habitats ranged from ultraoligotrophic high mountain lakes (e.g., Lake Zwerfenbergsee, Austria) to hypertrophic parts of large shallow lakes (e.g., Mailing bay, Lake Taihu, People's Republic of China). Bodies of water where we were able to find SOL cluster bacteria ranged from sea level (e.g., Lake Loosdrecht, The Netherlands) to up to 2,309 m above sea level (e.g., Lake Oberer Klaffersee, Austria). The surface area of the habitats ranged from around 1 ha (e.g., Lake Egelsee, Austria) to 68,870 km² (Lake Victoria, East Africa). SOL cluster filaments were also found in small artificial ponds used for aquaculture (e.g., Jäger-teich pond, Austria). Considering the large number of different habitats where it was possible to identify these conspicuous filaments, we conclude that these SOL cluster bacteria form an integral part of the bacterioplankton in diverse freshwater habitats. This group potentially makes up a significant portion of the total number of bacteria. These facts, together with the filamentous morphology, lead to a significant share of the total bacterial biomass of this group in many freshwater habitats. However, we still do not know details about the ecology of this intriguing group of bacterioplankton. Nevertheless, this study established a phylogenetic basis for these monophyletic SOL cluster bacteria, with at least three subclusters with the same conspicuous morphology. On this basis, we will try to elucidate more details of the ecology of this interesting group of bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Austrian Science Fund (project P15655).

We thank Eva Schober, Rainer Kurmayer, Quinglong Wu, Johann Knoll, Gabriel Zwart, Paul Bodelier, Eva Lindström, Silke Langenheder, Günther Stadler, Doris Hummer, Robert Sinyinza, Jaroslav Vrba, and all of the IPGL participants for providing samples. Peter Stadler and Matthias Pöckl were of great help during sampling and provided technical assistance, as did Johanna Schmid. Stefan Andreatta helped us with the sorting of filaments in Innsbruck, Austria. We are grateful to Hannes Höllerer for building some of these small technical gadgets that make research much easier. Christian Kamenik was an excellent guide to some high mountain lakes in the Austrian Alps.

REFERENCES

- Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F.-O. Glöckner, A. Ville, and R. Psenner. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake using in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2138–2144.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Andersson, A., U. Larsson, and A. Hagström. 1986. Size-selective grazing by a microflagellate on pelagic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **33**:51–57.
- Andreatta, S. 2001. Cytometry of aquatic bacteria: analyses at the community and subgroup level. Ph.D. thesis. University of Innsbruck, Innsbruck, Austria.
- Bahr, M., J. E. Hobbie, and M. L. Sogin. 1996. Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR11 cluster. *Aquat. Microb. Ecol.* **11**:271–277.
- Crump, B. C., E. V. Armbrust, and J. A. Baross. 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3192–3204.
- Crump, B. C., G. W. Kling, M. Bahr, and J. E. Hobbie. 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2253–2268.
- Glöckner, F. O., E. Zeichikov, N. Belkova, L. Denisova, J. Pernthaler, A. Pernthaler, and R. Amann. 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5053–5065.
- Hahn, M. W., H. Lünsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Höfle, J. Boenigk, and P. Stadler. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1442–1451.
- Hahn, M. W., P. Stadler, Q. L. Wu, and M. Pöckl. 2004. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J. Microbiol. Methods* **57**:379–390.
- Hiorns, W. D., E. A. Methé, S. A. Nierzwickbauer, and J. P. Zehr. 1997. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2957–2960.
- Hofer, J. S., and R. Sommaruga. 2001. Seasonal dynamics of viruses in an alpine lake: importance of filamentous forms. *Aquat. Microb. Ecol.* **26**:1–11.
- Höfle, M. G., H. Haas, and K. Dominik. 1999. Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3164–3174.
- Jukes, T. H., and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21–132. *In* H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*, vol. 3. Academic Press, New York, N.Y.
- Keller, M. D., W. K. Bellows, and R. R. L. Guillard. 1988. Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **117**:279–283.
- Kirchman, D. L. 1993. Statistical analysis of direct counts of microbial abundance, p. 117–119. *In* P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole (ed.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, London, United Kingdom.
- Kirchman, D. L., L. Yu, B. M. Fuchs, and R. Amann. 2001. Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. *Aquat. Microb. Ecol.* **26**:13–22.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobson, and M. Nei. 2001. Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**:1244–1245.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6955–6958.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques*, p. 115–175. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- Lindström, E. S. 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microb. Ecol.* **40**:104–113.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K.-H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* **142**:1097–1106.
- Méthé, B. A., W. D. Hiorns, and J. P. Zehr. 1998. Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition—analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnol. Oceanogr.* **43**:368–374.
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer, and C. Wawer. 1997. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology, p. 1–27. *In* A. D. L. Akkermans, J. C. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*, vol. 3.4.4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Pernthaler, J., E. Zöllner, F. Warnecke, and K. Jürgens. 2004. Bloom of

- filamentous bacteria in a mesotrophic lake: identity and potential controlling mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6272–6281.
26. Porter, K. G., and Y. S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**:943–948.
 27. Schmaljohann, R., U. Pollinger, and T. Bermann. 1987. Natural populations of bacteria in Lake Kinneret: observations with scanning electron and epifluorescence microscopy. *Microb. Ecol.* **13**:1–12.
 28. Schmeisser, C., C. Stockigt, C. Raasch, J. Wingender, K. N. Timmis, D. F. Wenderoth, H. C. Flemming, H. Liesegang, R. A. Schmitz, K. E. Jaeger, and W. R. Streit. 2003. Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7298–7309.
 29. Sekiguchi, H., M. Watanabe, T. Nakahara, B. Xu, and H. Uchiyama. 2002. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5142–5150.
 30. Semenova, E. A., and K. D. Kuznedelov. 1998. A study of the biodiversity of Baikal picoplankton by comparative analysis of 16S rRNA gene 5'-terminal regions. *Mol. Biol.* **32**:754–760.
 31. Urbach, E., K. L. Vergin, L. Young, A. Morse, G. L. Larson, and S. J. Giovannoni. 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultratrophic Crater Lake. *Limnol. Oceanogr.* **46**:557–572.
 32. van Veen, W. L., D. van der Kooij, E. C. Geuze, and A. W. van der Vlies. 1973. Investigations of the sheathed bacterium *Haliscomenobacter hydrossis* gen. n., sp. n., isolated from activated sludge. *Antonie Leeuwenhoek* **39**:207–216.
 33. Vrba, J., J. Nedoma, L. Kohout, J. Kopáček, L. Nedbalová, P. Ráčková, and K. Šimek. 2003. Massive occurrence of heterotrophic filaments in acidified lakes: seasonal dynamics and composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**:281–294.
 34. Wagner, M., R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer, and K. H. Schleifer. 1994. Identification and in situ detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**:405–417.
 35. Yannarell, A. C., and E. W. Triplett. 2004. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:214–223.
 36. Yu, Z., and W. W. Mohn. 2001. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analyses and 16S ribosomal DNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1565–1574.
 37. Zwart, G. J. M., B. C. Crump, M. Agterveld, F. Hagen, and S. K. Han. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:141–155.
 38. Zwart, G. J. M., W. D. Hiorns, B. A. Methé, M. P. van Agterveld, R. Huismans, S. C. Nold, J. P. Zehr, and H. J. Laanbroek. 1998. Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:546–556.

Ecological Differentiation within a Cosmopolitan Group of Planktonic Freshwater Bacteria (SOL Cluster, *Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*)†

Michael Schauer,^{1*} Christian Kamenik,² and Martin W. Hahn¹

*Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria,¹
and Institute of Plant Sciences, University of Bern, Altenbergrain 21, 3013 Bern, Switzerland²*

Received 16 March 2005/Accepted 3 May 2005

Members of the monophyletic SOL cluster are large filamentous bacteria inhabiting the pelagic zone of many freshwater habitats. The abundances of SOL bacteria and compositions of SOL communities in samples from 115 freshwater ecosystems around the globe were determined by fluorescence in situ hybridization with cluster- and subcluster-specific oligonucleotide probes. The vast majority (73%) of sampled ecosystems harbored SOL bacteria, and all three previously described SOL subclusters (LD2, HAL, and GKS2-217) were detected. The morphometric and chemophysical parameters and trophic statuses of ecosystems were related to the occurrence and subcluster-specific composition of SOL bacteria by multivariate statistical methods. SOL bacteria did not occur in acidic lakes (pH < 6), and their abundance was negatively related to high trophicity and pH. The subcluster-specific variation in the compositions of SOL communities could be related to the pH, electrical conductivity, altitude, and trophic status of ecosystems. All three known SOL subclusters differed in respect to their tolerated ranges of pH and conductivity. Complete niche separation was observed between the vicarious subclusters GKS2-217 and LD2; the former occurred in soft-water lakes, whereas the latter was found in a broad range of hard-water habitats. The third subgroup (HAL) showed a wide environmental tolerance and was usually found sympatrically with the LD2 or GKS2-217 subcluster. Ecological differentiation of SOL bacteria at the subcluster level was most probably driven by differential adaptation to water chemistry. The distribution of the two vicarious taxa seems to be predominantly controlled by the geological backgrounds of the catchment areas of the habitats.

Which factors control the occurrence and abundance of particular bacterial groups in the environment? Despite fast-growing knowledge in microbial ecology, mainly mediated by methodological innovations bypassing the inherent cultivation problem of microorganisms, we have just begun to unravel the phylogenetic compositions of bacterioplankton communities in freshwater ecosystems (8, 9, 26, 51, 52). However, studies dealing with the compositions of freshwater bacterioplankton communities often use methods with low phylogenetic resolution (1, 8) and deal only with single or rather few habitats (1, 14, 23, 36, 43) or target the whole bacterioplankton community composition by fingerprinting methods (15, 20, 25, 49, 50). While valuable insights into factors shaping the bacterioplankton communities have been achieved (3, 15, 20, 24, 25, 27, 38, 49, 50), these approaches may not always be appropriate enough to meaningfully connect the occurrence and abundance of phylogenetically defined groups of bacterioplankton to the relevant environmental factors in order to gain insights into the ecology of certain bacterioplankton groups. For these reasons, characterizations of ecological niches of certain groups, as well as data on the ecological differentiation between closely related taxa, are rather scarce for free-living bacteria (10, 11), while this kind of knowledge is available for many higher organisms (35, 39, 47).

Lately, we have established the phylogenetic basis of the bacteria affiliated with the monophyletic SOL cluster, which is a dominant group of filamentous bacterioplankton that can be found throughout the year in a broad variety of freshwater ecosystems (34). The lengths of the SOL filaments can vary from 8 to >100 μm (34). It has been shown that the share of the bacterial biovolume of the SOL bacteria can exceed 40% of the total bacterial biovolume (30, 34). Members of the striking SOL morphotype form a monophyletic group (the SOL cluster), which so far divides into at least three phylogenetic subclusters (LD2, HAL, and GKS2-217). These subgroups are characterized by minimal 16S rRNA sequence similarities of 97.6% to 99.7% (intrasubcluster) and 89.9% to 95.5% (intersubcluster). These phylogenetic similarity values justify the assumption that the subclusters represent species-like taxa (33). Environmental sequences clustering within the SOL cluster, but outside of the three well-established subgroups (34), along with the latest fluorescence in situ hybridization (FISH) results, suggest the presence of additional subclusters within the SOL cluster. So far, all bacteria assigned to the SOL cluster via specific FISH probes share the same filamentous morphology. Therefore, members of the different species-like subgroups cannot be distinguished by morphological traits. The set of oligonucleotide probes available for this remarkable component of bacterioplankton (34) enables the resolution of the subcluster-specific composition within the closely related SOL cluster.

The aim of this study was to identify potential ecological differences within a model group of heterotrophic bacterioplankton, which consists of well-defined and phylogenetically closely related subgroups. This goal was reached by applying a

* Corresponding author. Mailing address: Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria. Phone: 43 6232 3125 45. Fax: 43 6232 3578. E-mail: michael.schauer@oeaw.ac.at.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

set of FISH probes with varying phylogenetic resolutions to an extensive set of samples from a broad range of different freshwater ecosystems worldwide.

(This work is in partial fulfillment of the requirements for a Ph.D. degree at the University of Salzburg by M.S.)

MATERIALS AND METHODS

Study sites and sampling. During the years 2002, 2003, and 2004, 140 samples from 115 different freshwater habitats were investigated (see Table S1 in the supplemental material). The probed ecosystems are located in four continents (Eurasia, North America, Africa, and Australia) in three climatic zones (temperate, subtropical, and tropical). The pelagic zones of most of the studied freshwater lakes, rivers, and ponds in Austria, the Czech Republic, Italy, Slovenia, Germany, The Netherlands, Sweden, Finland, Zambia, Uganda, Nepal, Tibet, the People’s Republic of China, Hawaii, Mexico, Australia, and New Zealand were sampled with a 10-liter Schindler sampler. Samples from Austrian lakes were kept in 5-liter plastic bottles for less than 2 hours until they were processed in the laboratory. Samples from most of the more distantly located ecosystems were fixed (paraformaldehyde; 2% final concentration) and further processed on site, while a few were transported to Austria untreated. Transcontinental delivery of live samples to the laboratory usually did not take longer than 2 days (maximum, 5 days). Subsamples for total bacterial counts were fixed with formaldehyde (2% final concentration). For FISH, 10 to 30 ml of water was fixed with paraformaldehyde (2% final concentration) for 2 h at room temperature or at 6°C overnight, filtered onto 0.2-µm polycarbonate filters (45 mm; Millipore), dried, and stored frozen at -20°C to await further processing.

Environmental variables. Geographic and morphometric data on habitats (altitude, lake area, and maximum depth) and trophic characterization of Swedish and Austrian freshwater habitats and Tibetan high-mountain lakes were provided by E. Lindström and S. Langenheder, at the Austrian State Department, and Qinglong Wu, respectively. Data on the Bohemian forest lakes were extracted from the work of Vrba et al. (45). Water temperature, pH, and electrical conductivity were measured in the field with a universal meter (Multiline P4; WTW, Weilheim, Germany) whenever possible.

Bacterial abundance. Formaldehyde-fixed samples were stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; final concentration, 6 µg ml⁻¹) (31) and enumerated by epifluorescence microscopy (Zeiss Axioplan). Between 300 and more than 1,000 DAPI-stained bacterial cells were counted at ×1,250 magnification. More than 10 microscopic fields (20 to 50 cells per field) were counted for each sample. Filaments of the SOL morphotype were counted separately.

FISH. FISH was performed on polycarbonate filter sections according to the protocol of Alfreider et al. (1). Counting of hybridized filter sections was done by epifluorescence microscopy (Zeiss Axioplan; ×1,250 magnification) as described previously (34). The oligonucleotide probes used for FISH were SAP-309 (specific for *Saprospiraceae*), SOL-852 (specific for the SOL cluster), LD2-1261 (specific for the LD2 subcluster), HAL-844 (specific for the HAL subcluster), GKS-847 (specific for the GKS2-217 subcluster), and HHY-441 (specific for *Haliscomenobacter hydrossis* strain DMS1100). Details of probe sequences, testing, and adequate formamide concentrations have been presented by Schauer and Hahn (34). Probes SAP-309 and SOL-852 were used as positive controls for the assignment of all SOL morphotype filaments to the monophyletic SOL cluster in all of the samples that were hybridized. The SOL subcluster-specific probes LD2-1261, HAL-844, and GKS-847 were used for the enumeration of SOL subcluster bacteria, together with the total SOL morphotype filament counts of DAPI-stained lake water. Probe HHY-441 was used on selected sam-

ples to determine the presence of *Haliscomenobacter hydrossis* (strain DSM1100) in natural freshwater ecosystems.

Statistical analysis. Fifteen of the habitats were sampled repeatedly (two to five times) during the years 2002 to 2004. For these ecosystems, the means of the assessed variables were used. Trophic was coded as an ordered factor in all analyses (oligotrophic < oligomesotrophic < mesotrophic < eutrophic). Hypertrophic Lake Taihu and mesoeutrophic lakes Grabensee, Ibmsee, and Imnsee were pooled with eutrophic ecosystems to obtain an even distribution.

We used principal-components (PC) analysis (PCA) for summarizing correlations among the environmental variables and for visualizing differences among the lakes; 76 habitats that had no missing values were considered. Variables were centered and standardized. The significance of PC axes was assessed using the broken-stick model (17). The responses of total bacteria and SOL bacteria to environmental variables were studied by ordinary least squares (OLS) regression and generalized linear models (GLM) with a Tweedie variance function (because of a continuous overpositive y, with positive mass at y = 0 distribution) and a canonical link (4, 19), respectively, following (5). Variable selection was based on the Akaike and Bayes information criteria (OLS) and analysis of deviance (GLM) (2). A preliminary detrended correspondence analysis (DCA; detrending by segments) of abundances of filamentous bacteria resulted in an axis length of 2.0 standard deviations, suggesting unimodal response models (41). We therefore used (partial) canonical correspondence analysis (CCA) and 9,999 unrestricted permutations to assess the significance of environmental variables for changes among abundances of SOL bacterial subgroups (22, 40, 41, 42). P values were adjusted (P_{adj}) for multiple testing using a Bonferroni-type test procedure (16). In DCA and CCA, all nonacidic habitats (pH 6.6 to 9.0) with no missing values were considered (53 habitats). Bacterial abundances (number of bacteria ml⁻¹) were log₁₀(x + 1) transformed to make distributions more symmetric.

All statistical analyses were done in R (32). DCA and CCA were run using the R package Vegan (29).

RESULTS

Statistical analysis of environmental variables. Table 1 summarizes the determined environmental variables. Lakes Taihu and Garda had an unusually high lake area and maximum water depth, respectively. Therefore, they were disregarded in all statistical analyses. PCA sums up correlations among conductivity, pH, altitude, lake area, and maximum water depth (see Fig. S1 in the supplemental material). PCA resulted in two significant axes (broken-stick model), explaining 71.5% of the variance in the five environmental variables. Conductivity and pH were most highly correlated with PC axis 1. The two variables and lake area correlated significantly (Kendall’s τ, P_{adj} < 0.05). Altitude, lake area, and maximum water depth were correlated with both significant PC axes. Significant correlations were found among altitude, conductivity, and lake area; the last was also correlated with maximum water depth (Kendall’s τ, P_{adj} < 0.05). PC axis 2 separated the oligotrophic lakes from lakes of higher trophic status (see Fig. S1 in the supplemental material). Trophic changed significantly with con-

TABLE 1. Statistical summary of environmental variables and total bacterial abundances of all 115 sampled ecosystems

Value	Altitude (m a.s.l.)	Lake area (ha)	Maximum depth (m)	pH	Conductivity (µS cm ⁻¹)	Total no. of bacteria (10 ⁶ ml ⁻¹)
Minimum	0	0.1	2	4.5	11	0.19
1st quartile	275	3	6	6.9	31	0.98
Median	553	20	19	8.0	194	1.75
3rd quartile	1,311	214	43	8.4	324	2.69
Maximum	4,987	6,880,000	1,471	9.4	21,700	11.30
Mean	903	105,316	52	7.6	434	2.06
SD	919	738,341	161	1.2	2,207	1.62
Missing values	4	10	27	20	19	4

TABLE 2. Mean abundances of total bacterioplankton in habitats of different trophic status

Trophic status	Total no. of bacteria (10 ⁶ ml ⁻¹)		No. of samples
	Mean	SD	
Oligotrophic	1.17	0.63	63
Oligomesotrophic	1.97	0.77	24
Mesotrophic	2.70	1.12	27
Eutrophic ^a	4.47	3.13	12
ND ^b	2.50	0.75	10

^a Including samples of mesoeutrophic (3) and hypertrophic (1) habitats.

^b ND, trophic status remained undetermined.

ductivity, altitude, and maximum water depth (Kruskal-Wallis rank sum test, $P_{\text{adj}} < 0.05$).

Bacterioplankton abundance. Total bacterial abundances ranged from 0.2×10^6 to 11.3×10^6 ml⁻¹ (mean, 2.0×10^6 ml⁻¹) (Table 2). Trophy, altitude, and pH explained 60% of the variance in the total bacterial concentration (OLS, $P < 0.001$); however, pH was significant only after the effects of trophy and altitude had been considered (type II error, $P > 0.05$). Lake Seeleithensee was omitted in this OLS due to an unusually high total bacterial concentration (11.3×10^6 ml⁻¹).

Detection of SOL bacteria and their proportions in abundance and biovolume. In 73% of all 115 sampled habitats, SOL bacteria were discovered and assigned to known subclusters via FISH with cluster- and subcluster-specific oligonucleotide probes. In 52% of the samples, only one subcluster of SOL bacteria was detected. Twenty-four percent of the samples contained two SOL subclusters, while three different subgroups including phylogenetically uncharacterized SOL groups (PUC group) were found in only two habitats (Cenote Laguna, Mexico, and Lake Nkuruba, Uganda). Twenty-two percent of all samples (31 habitats; 27% of habitats) did not contain SOL bacteria. SOL-negative ecosystems could be partly characterized by low pH values (pH < 6; 10 habitats) or short water retention times (only a few days; 4 habitats).

The maximum abundance of SOL bacteria was 21.6×10^4 filaments ml⁻¹, equivalent to 11% of the total bacterial numbers. For all positive samples, on average, 0.81% (1.24×10^4 filaments ml⁻¹) of total bacterial numbers were assigned to the SOL cluster. Using a previously established (34) biovolume conversion factor of 25.7, SOL bacteria contributed an average of 17.3% of the total bacterial biovolume in all positive samples of our data set.

Subcluster-specific composition of SOL bacteria. All three of the SOL subgroups thus far characterized (LD2, HAL, and GKS2-217 subclusters) were detected in our set of freshwater ecosystems. The most abundant and widespread subgroup of SOL bacteria was the LD2 subcluster, which was found in 62% of all samples, accounting for 75% of all SOL bacteria (Table 3). This subgroup was the only subcluster in 56% of the SOL-positive samples, having a mean abundance of 1.4×10^4 filaments ml⁻¹ in the positive samples. The HAL subgroup was found in 22% of the samples, accounting for 7% of the SOL bacteria and having a mean abundance of 0.17×10^4 filaments ml⁻¹ in the positive samples. Members of the GKS2-217 subcluster were found in 12% of all samples, accounting for 11% of the SOL bacteria. This subcluster was the only subcluster in

TABLE 3. Subcluster-specific compositions of investigated SOL assemblages

Parameter	LD2	HAL	GKS2-217	PUC group ^a
Positive samples (%) ^b	62.1	22.1	12.1	8.6
Mean share of SOL bacteria [%] ^c	74.4	7.3	11.0	6.3
Only subgroup (%) ^c	56.0	0.9	6.4	3.7
Mean abundance (10 ⁴ ml ⁻¹) ^d	1.40	0.17	0.25	0.29

^a PUC group, phylogenetically uncharacterized SOL bacteria.

^b Percentage of all samples ($n = 140$).

^c Percentage of all SOL-positive samples ($n = 109$).

^d Calculated from all samples where the respective subgroup was present.

6% of the SOL-positive samples, having a mean abundance of 0.25×10^4 filaments ml⁻¹. In 12 samples, SOL-type filaments could not be assigned to any of the three known SOL subclusters. These thus far phylogenetically uncharacterized (i.e., unknown subcluster affiliation) SOL bacteria accounted for 6% of the SOL cluster, having a mean abundance of 0.29×10^4 filaments ml⁻¹ in the positive samples (Table 3).

Statistical analysis of environmental factors influencing the occurrence and composition of SOL bacteria. SOL bacteria were lacking in all lakes with a pH of <6 and occurred in all investigated lakes higher than 1,700 m above sea level (a.s.l.), except for Lake Weissensee (2,226 m a.s.l.). Focusing on the 64 nonacidic lakes (pH 6.6 to 9.0; no missing values) we found that abundances of SOL bacteria were negatively related to high trophy and pH (GLM, $P < 0.01$; Tweedie error structure, power = 1.6, $\varphi = 1.5$).

Members of the SOL cluster occurred in 53 of the 64 nonacidic lakes. Phylogenetically uncharacterized SOL bacteria occurred in only three lakes in this data set. It was the only group of SOL bacteria in the Swedish lakes Mörtsjön and Tvigölingen. Therefore, this group and the two lakes were not considered in the analysis. Conductivity, pH, altitude, and trophy individually explained 34%, 56%, 47%, and 21% of the variation in the abundances of HAL, LD2, and GKS2-217 bacteria, respectively ($P_{\text{adj}} < 0.05$). These four environmental variables together explained 66% of the variation in the abundances of the three SOL subclusters. The only variable that had a statistically unique effect was pH, i.e., after the effects of the other three variables had been removed, it still explained 29% of the variation in the abundances of the three SOL subgroups ($P < 0.001$). Conductivity or altitude had significant conditional effects, i.e., either of them accounted for an additional 7% of the variation in the abundances of the SOL subclusters after taking into account the effects of pH ($P < 0.05$). The two sets of environmental variables (either pH and conductivity or pH and altitude) explained almost as much variation as the full set of four environmental variables. They accounted for 59% of the variation in the abundances of the SOL subclusters LD2, HAL, and GKS2-217.

The environmental variable accounting for most of the variation in the abundances of the SOL subclusters was pH, which is illustrated in Fig. 1. CCA axis 1, which was most highly correlated with pH, separated LD2 from GKS2-217. LD2 occurred at a higher pH and conductivity, whereas GKS2-217

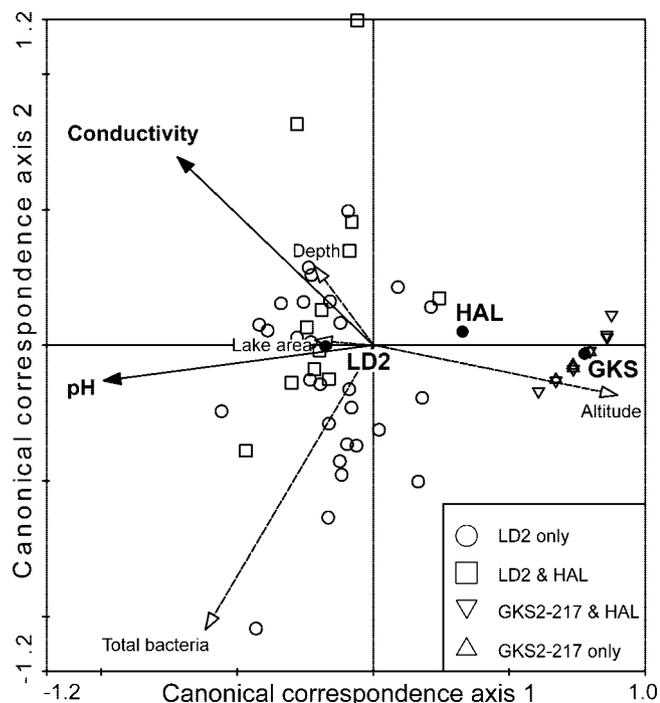


FIG. 1. Canonical-correspondence triplot based on 51 SOL-positive freshwater habitats, the three SOL subclusters, pH, and conductivity. The Swedish lakes Mörtsjön and Tvigölingen exclusively harbored phylogenetically uncharacterized SOL bacteria and hence were excluded. pH and conductivity best explained variation in the three SOL subgroups. Other environmental variables (dashed arrows) were supplementary. Samples were placed according to their pH and conductivity values. The black circles indicate the optima (weighted averages) of the three SOL subclusters in respect to pH and conductivity. Sample and subcluster scores were scaled (factor = 0.4).

was found only in soft-water lakes. HAL was intermediate. SOL subgroups showed a pH tolerance of about 2 (HAL and LD2) and 1 (GKS2-217) orders of magnitude (Table 4). The narrower pH range of the GKS2-217 subcluster did not overlap with the wider one of the LD2 subcluster (Fig. 2). The HAL subgroup was detected in circumneutral (pH 6.6 to 8.6) habitats, overlapping with the respective pH ranges of the other two subgroups (Fig. 2B). The upper range of tolerated pH values of the LD2 subcluster was slightly alkaline. A similar picture can be drawn using electrical-conductivity values (Fig. 3). This variable clearly separated the stenohaline GKS2-217 subcluster from the euryhaline LD2 subcluster. The tolerated conductivity range of the HAL subcluster overlapped with the ranges of the other two subclusters (Fig. 3B).

Sympatric versus allopatric occurrence of SOL subgroups.

The frequently >100- μm -long filaments of the GKS2-217 subcluster were found exclusively in oligotrophic soft-water ecosystems with low conductivity values (<50 $\mu\text{S cm}^{-1}$) in the Austrian Alps and northern Sweden. In seven samples (41.2% of GKS2-217-positive samples), this group was the only SOL subcluster, while in the other habitats it had a sympatric occurrence with the HAL subcluster.

In contrast, the LD2 subcluster was detected in a broad range of morphometrically different habitats with various water chemistries, such as ultraoligotrophic, deep, submontane lakes (e.g., Lake Attersee); hypertrophic bays of large, shallow lowland lakes (e.g., Lake Taihu); the large East African lakes (Lake Victoria and Lake Tanganyika); and oligo- and polyhaline high-mountain lakes in Tibet. In the majority of LD2-

TABLE 4. Minimum and maximum values of environmental variables for SOL subgroups

Subgroup	Parameter	Minimum	Ecosystem ^a	Maximum	Ecosystem ^a
HAL	Altitude (m a.s.l.)	0	Lake Loosdrecht	2,309	Lake ob. Klaffersee
	Lake area (ha)	1	Cenote Laguna	4,620	Lake Attersee
	Maximum depth (m)	2.6	Lake Eckarfjärden	114	Lake Wolfgangsee
	Temp (°C)	4.8	Lake Mondsee	23.3	Lake Nkuruba
	pH	6.6	Lake ob. Klaffersee	8.6	Lake Krottensee
	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	14.7	Lake unt. Klaffersee	570	Lake Loosdrecht
LD2	Altitude (m a.s.l.)	0	Lake Loosdrecht	4,987	High mountain lake (Tibet)
	Lake area (ha)	0.1	Pond Hawaii	6,880,000	Lake Victoria
	Maximum depth (m)	1.5	Pond Waldteich	1,471	Lake Tanganyika
	Temp (°C)	2	Lake Mondsee	25.5	Lake Mondsee
	pH	7.7	Lake Egelsee II	9.5	Lake Mondsee
	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	64	Lake Falkertsee	21,700	Lake Qinghai
GKS2-217	Altitude (m a.s.l.)	115	Lake Ämthyttsjön	2,309	Lake ob. Klaffersee
	Lake area (ha)	0.2	Lake Bergsee 5	11	Lake Zwerfenbergsee
	Maximum depth (m)	6	Lake Moaralmsee	40	Lake unt. Klaffersee
	Temp (°C)	6	Lake Moaralmsee	10.7	Lake unt. Sonntagkarsee
	pH	6.4	Lake Ämthyttsjön	7.3	Lake Moaralmsee
	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	11	Lake Bergsee 5	48	Lake ob. Klaffersee
PUC	Altitude (m a.s.l.)	49	Lake Tvigölingen	1,872	Lake Falkertsee
	Lake area (ha)	0.1	Hawaii pond	6,880,000	Lake Victoria
	Maximum depth (m)	3.4	Lake Mörtsjön	84	Lake Victoria
	Temp (°C)	6.4	Lake Mörtsjön	23.3	Lake Nkuruba
	pH	6.7	Lake S. Snesharen	9.0	Lake Titisee
	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	29	Lake Storsjön	535	Cenote Laguna

^a ob., upper; unt., lower.

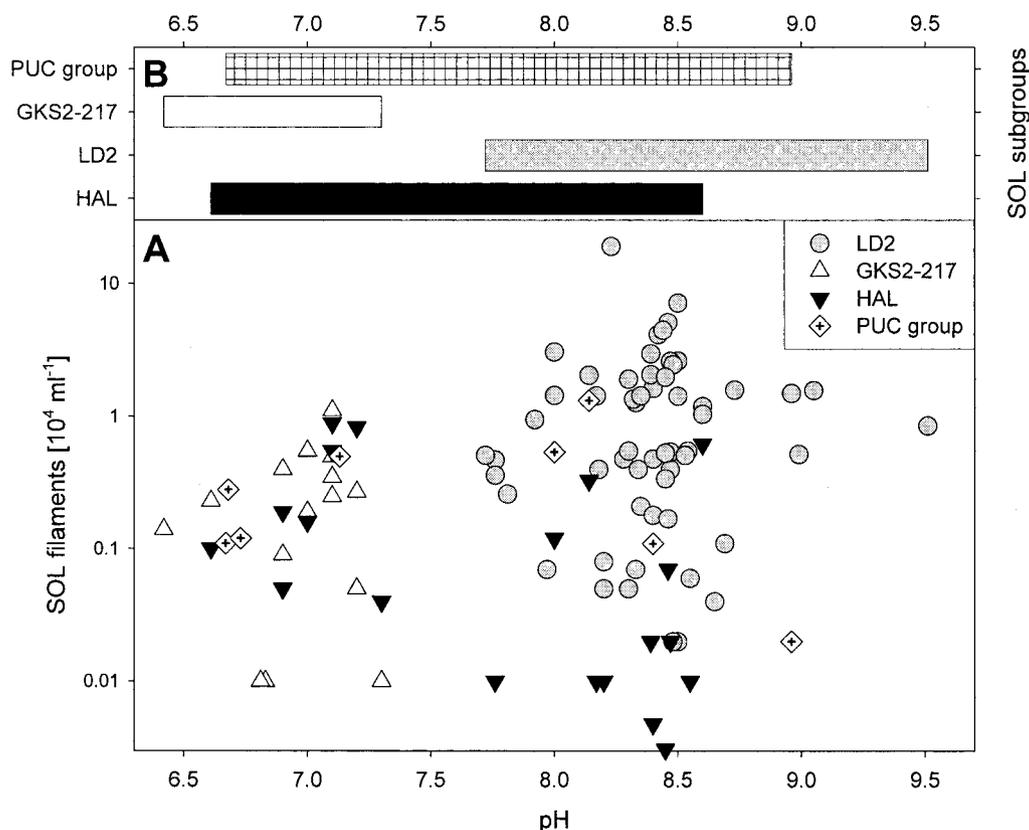


FIG. 2. (A) Total abundances (log scale) of SOL subclusters versus pH. (B) Range of pH values in which SOL subclusters were detected in the investigated ecosystems. PUC group, phylogenetically uncharacterized SOL bacteria.

positive habitats (70.1%), this subgroup occurred exclusively, while in the rest of the habitats, it had a sympatric occurrence with the HAL subcluster and phylogenetically uncharacterized SOL bacteria (the PUC group).

The third known SOL subcluster (HAL) was almost always found (96.8% of HAL-positive samples) in coexistence with other SOL subclusters (LD2, GKS2-217, and the PUC group).

No sympatric occurrence of members of the LD2 and GKS2-217 subclusters was found in any of the investigated habitats. Consequently, there was no coexistence of all three phylogenetically characterized SOL subgroups in any of the samples analyzed.

Phylogenetically uncharacterized (i.e., unknown subcluster affiliation) SOL filaments (PUC group). All bacteria of the SOL morphotype could be assigned to the SOL cluster by positive hybridization with probes SAP-309 and SOL-852. In 12 habitats, SOL bacteria could not be further assigned to one of the three SOL subclusters with subcluster-specific probes. These habitats included four Swedish soft-water lakes (Lakes Tvigölingen, Mörtsjön, Snesnaren, and Storsjön), two Austrian lakes (Lakes Hinterer Gosausee and Falkertsee), and one German lake (Lake Titisee), with conductivity values between 64 and $147 \mu\text{S cm}^{-1}$, and habitats with higher conductivity values in subtropical (Yangtze river) and tropical (Lake Victoria and Lake Nkuruba in Uganda, an artificial pond in Hawaii, and Cenote Laguna in Mexico) regions.

DISCUSSION

Several studies have investigated the factors controlling the diversity of freshwater bacterioplankton (15, 20, 25, 27, 38, 49, 50). Methé and Zehr (27), for instance, did not find direct effects of acidification and pH in broadly based taxonomic groups but hypothesized that effects might be seen in phylogenetically smaller subgroups. Our study chose a phylogenetically well-defined group of bacterioplankton to test which factors might influence its occurrence and composition.

Niche differentiation inside SOL cluster bacteria. Statistical analysis revealed that environmental factors influence the compositions of the SOL communities in natural habitats. Conductivity, pH, altitude, and trophicity were identified as important variables that affect the occurrence and abundance of the known SOL subclusters. Altitude seems to play an important role for the GKS2-217 subcluster, because this subgroup was mainly detected in high mountain lakes located above the tree line. Yannarell and Triplett suggested that spatial differences at the regional and landscape levels explain differences in bacterioplankton community profiles in Wisconsin lakes (50). In the present study, the suggested significance may, however, partly result from covariance among the assessed environmental variables. Submontane and alpine areas, for example, tend to have oligotrophic environments with low conductivity, because of smaller and less intensively used catchments, resulting

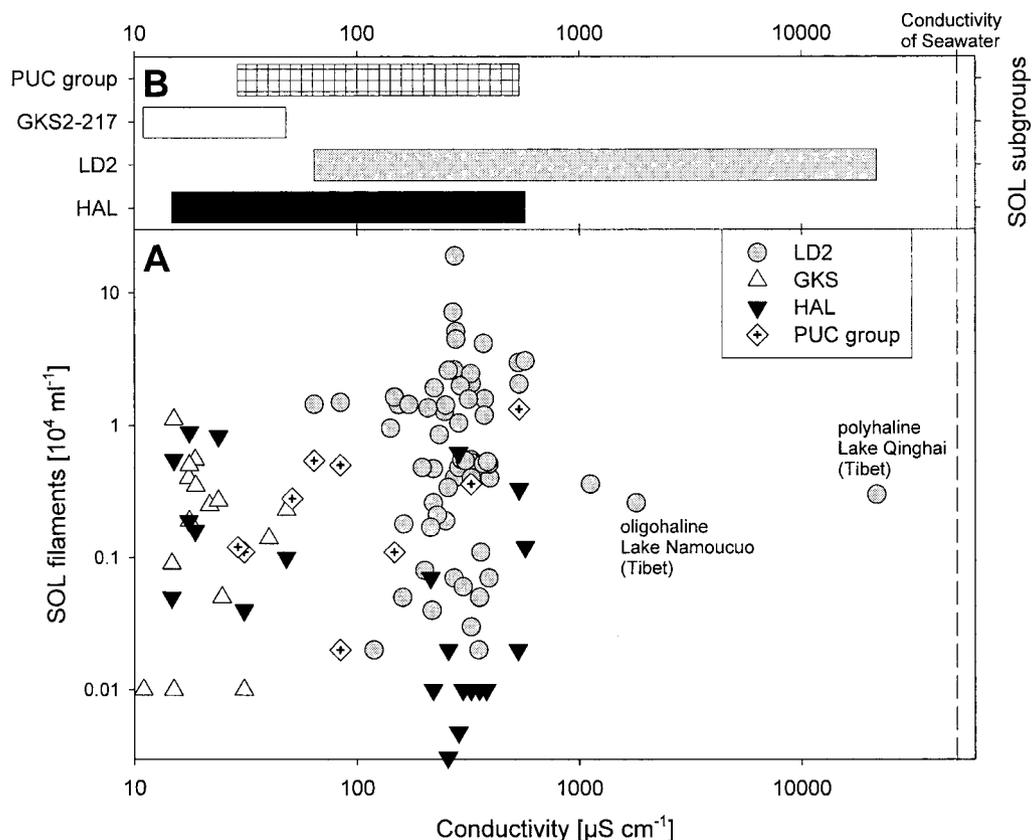


FIG. 3. (A) Total abundances of SOL subclusters versus electrical conductivity. Note the log-log scale. Oligo- and polyhaline habitats are marked separately. The conductivity of seawater was set at a value of $50,000 \mu\text{S cm}^{-1}$. (B) Range of conductivity values in which SOL subclusters were detected in the investigated ecosystems. PUC group, phylogenetically uncharacterized SOL bacteria.

in lower ion and nutrient concentrations (37). A GKS2-217-positive ecosystem from northern Sweden, located below the tree line, demonstrates that this subgroup can also be found in oligotrophic soft-water lakes at low altitude. This example suggests that limnochemical characteristics (i.e., pH and conductivity), not landscape level, control the occurrence of two vicarious (6) species-like subgroups and hence, mainly drive the subcluster-specific composition of the SOL communities.

Apart from the dominating effect of the limnochemistry of the habitats, determined mainly by the geological backgrounds of the catchments, biotic factors might be involved in the fine tuning of the composition and abundance of the SOL community. All bacteria affiliated with the SOL cluster possess the same striking filamentous morphology. This similarity suggests that all SOL subgroups undergo comparable grazing pressures, which might originate from crustacean zooplankton (18, 30) rather than from protists, which are the major grazers of many other bacterioplankton groups (13). The large, rigid morphology potentially protects SOL bacteria from grazing by heterotrophic flagellates and most ciliates. Even so, Wu et al. (48) clearly showed that flagellates can be predators of long yet flexible bacterial morphotypes. While grazing pressure presumably is not a differentiating biotic factor between the SOL subgroups, trophic preferences might be. However, the trophic niche of neither subgroup of SOL bacteria has been characterized yet.

In most cases, it is impossible to quantitatively describe the complete ecological niche of an organism, including all chemical, physical, and biotic factors involved. However, only a few variables (dimensions) may be needed to adequately demonstrate ecological differentiation and hence niche differentiation between certain groups of organisms. Gray et al. demonstrated the niche differentiation in *Achromatium* spp. connected to different redox conditions (10, 11). Moore and colleagues (28) demonstrated that the ecological differentiation of cooccurring populations of *Prochlorococcus* characterized by 97% 16S rRNA gene sequence similarity is connected to high- and low-light environments in the North Atlantic, and in a variety of chemolithotrophic bacteria, niche separation is mainly shown by clearly definable trophic niches (21). We demonstrated that adaptation to different limnochemical conditions has played a major role in the ecological differentiation of SOL bacteria.

Ecological amplitude of SOL subclusters. Members of the LD2 subcluster were found over a broad range of habitat types. This wide ecological tolerance, together with numerical dominance, is also reflected in the number of published partial or full-length 16S rRNA sequences of this subgroup retrieved from freshwater ecosystems (34). These facts make the more generalist LD2 subcluster the most common of the known SOL subclusters.

In contrast to the generalist LD2 subcluster, the GKS2-217 subgroup was detected only in a strictly defined type of fresh-

water ecosystem. The preferred habitats of this subcluster were found in the Austrian Alps and in northern Sweden. Other potentially suitable habitats in northern Sweden with appropriate conductivity values either were populated by phylogenetically uncharacterized SOL filaments or possessed pH values that were excessively low. Also, five acidic lakes in the Bohemian forest (45) could be expected to harbor GKS2-217 bacteria, assuming a circumneutral pH. Acidification of these lakes started 50 years ago and may have caused the extinction of GKS2-217 populations.

The HAL subgroup displayed a broader ecological amplitude, comparable to that of the LD2 subgroup. Interestingly, this more generalist SOL subgroup could not be detected in as many samples as the more common LD2 subcluster. Obviously, the appearance of this SOL subgroup is restricted by other, yet unknown abiotic or biotic factors. The only validly described species inside the SOL cluster, *Haliscomenobacter hydrossis* (44), is affiliated with this subgroup. This species is exclusively known from wastewater treatment plants (46) and could not be detected in spot samples of the natural freshwater ecosystems investigated in this work.

A part of the substantially higher ecological amplitude of the LD2 and HAL subgroups compared to the GKS2-217 subcluster could be based on the higher phylogenetic diversity found in the first two groups (34), thus representing phylogenetically and ecologically more diverse clusters of organisms. A higher resolution of the molecular identification tools might therefore reveal more phylogenetically characterized subunits within those well-defined SOL subclusters. Assuming a high enough phylogenetic resolution, such further steps might also reveal potential biogeographic patterns inside the closely related SOL subclusters, as demonstrated for *Cylindrospermopsis* strains (*Cyanobacteria*) by 16S-23S internally transcribed spacer sequences (12) and for anaerobic phototrophic consortia by partial 16S rRNA gene sequences (7).

Phylogenetically uncharacterized SOL genotypes. Phylogenetic analysis revealed partial sequences that clustered within the monophyletic SOL cluster but could not be affiliated with any of the three known SOL subclusters (34). Regarding these partial sequences (AY509351, AY509360, and AY509380; A. Eiler and S. Bertilsson, unpublished), it is more likely that SOL bacteria that did not hybridize with subcluster-specific probes (only 6% of all SOL bacteria) belong to one or a few still uncharacterized SOL subclusters than that the lack of hybridization with subcluster-specific probes is a result of a mutation present in only a portion of SOL subcluster members.

In the present study, environmental variables, such as pH and electrical conductivity, meaningfully explained distribution patterns between closely related bacterioplankton subgroups. Considering these differentiating factors, the diversity of SOL cluster bacteria on the previously defined subcluster level (34) might be still higher, as suggested by the occurrence of phylogenetically uncharacterized SOL filaments in some freshwater ecosystems. A closer look at specific habitats indicates the potential existence of two or more additional SOL subclusters. One seems to inhabit oligo- and oligomesotrophic soft-water lakes in Europe; other potential subclusters might be found in subtropical and tropical hard-water habitats with higher nutrient loads. Besides the SOL subgroups discovered thus far, forming the majority of the monophyletic SOL cluster, there

seem to be other, unknown subgroups that still need to be characterized phylogenetically and ecologically.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jaroslav Vrba, Silke Langenheder, Eva Lindström, Qinglong Wu, Rainer Kurmayer, Eva Schober, Johann Knoll, Hannes Höllner, Günther Stadler, Doris Hummer, Gabriel Zwart, Paul Bodelier, Robert Sinyinza, and all IPGL participants for providing samples. Peter Stadler and Matthias Pöckl helped with sampling Austrian lakes and provided skillful technical assistance, as did Johanna Schmid.

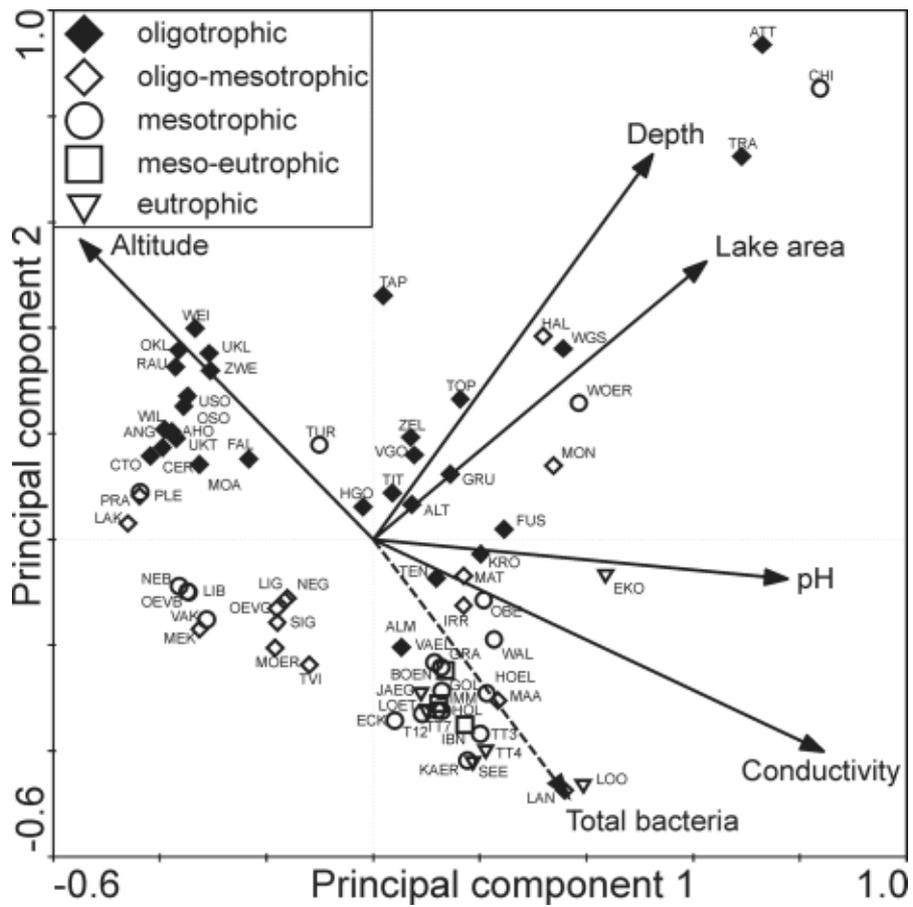
This study was supported by the Austrian Science Fund (project P15655).

REFERENCES

- Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F. O. Glöckner, A. Wille, and R. Psenner. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake using in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2138–2144.
- Chambers, J. M., and T. J. Hastie. 1994. Statistical models in S. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Crump, B. C., G. W. Kling, M. Bahr, and J. E. Hobbie. 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2253–2268.
- Dunn, P. K., and G. K. Smyth. 2001. Tweedie family densities: methods of evaluation, p. 155–162. In B. Klein and L. Korsholm (ed.), *Proceedings of the 16th International Workshop on Statistical Modelling*, Odense, Denmark.
- Fox, J. 2002. An R and S-Plus companion to applied regression. Sage Publications, Thousand Oaks, Calif.
- Ge, Y., J. Chang, C.-X. Fu, and G. Y.-S. Chan. 2003. Effect of soil water status on the physioecological traits and the ecological replacement of two endangered species, *Changium smyrnioides* and *Chuanminshen violaceum*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **44**:291–296.
- Gläser, J., and J. Overmann. 2004. Biogeography, evolution, and diversity of epibionts in phototrophic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4821–4830.
- Glöckner, F. O., B. M. Fuchs, and R. Amann. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3721–3726.
- Glöckner, F. O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler, and R. Amann. 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5053–5065.
- Gray, N. D., R. Howarth, A. Rowan, R. W. Pickup, J. Gwyn Jones, and I. M. Head. 1999. Natural communities of *Achromatium oxaliferum* comprise genetically, morphologically, and ecologically distinct subpopulations. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5089–5099.
- Gray, N. D., D. Comaskey, I. P. Miskin, R. W. Pickup, K. Suzuki, and I. M. Head. 2004. Adaptation of sympatric *Achromatium* spp. to different redox conditions as a mechanism for coexistence of functionally similar sulphur bacteria. *Environ. Microbiol.* **6**:669–677.
- Gugger, M., R. Molica, B. Le Berre, P. Dufour, C. Bernard, and J. F. Humbert. 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (*Cyanobacteria*) isolated from four continents. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1097–1100.
- Hahn, M. W., and M. G. Höffe. 2001. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**:113–121.
- Hiorns, W. D., E. A. Methé, S. A. Nierzwickbauer, and J. P. Zehr. 1997. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2957–2960.
- Höffe, M. G., H. Haas, and K. Dominik. 1999. Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3164–3174.
- Hommel, G. 1988. A stagewise rejective multiple test procedure based on a modified Bonferroni test. *Biometrika* **75**:383–386.
- Jackson, D. A. 1993. Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology* **74**:2204–2214.
- Jing, J. 2003. The interactions of mesozooplankton and filamentous heterotrophic bacteria in oligo-mesotrophic Lake Mondsee. M.Sc. thesis. International Institute for Infrastructural, Hydraulic and Environmental Engineering, Delft, The Netherlands.
- Jørgensen, B. 1997. The theory of dispersion models. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Kent, A. D., S. E. Jones, A. C. Yannarell, J. M. Graham, G. H. Lauster, T. K. Kratz, and E. W. Triplett. 2004. Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake. *Microb. Ecol.* **48**:550–560.
- Koops, H. P., and A. Pommerening-Roser. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**:1–9.

22. Legendre, P., and L. Legendre. 1998. Numerical ecology. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
23. Lindström, E. S. 1998. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**:163–174.
24. Lindström, E. S. 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microb. Ecol.* **40**:104–113.
25. Lindström, E. S. 2001. Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microb. Ecol.* **42**:598–605.
26. Methé, B. A., W. D. Hiorns, and J. P. Zehr. 1999. Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition: analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnol. Oceanogr.* **43**:368–374.
27. Methé, B. A., and J. P. Zehr. 1999. Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect lake water chemistry? *Hydrobiologia* **401**:77–96.
28. Moore, L. R., G. Rocap, and S. W. Chisholm. 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**:464–467.
29. Oksanen, J. 2005. Vegan: community ecology package. <http://cc.oulu.fi/~jarioksa/> [Online.]
30. Pernthaler, J., E. Zöllner, F. Warnecke, and K. Jürgens. 2004. Bloom of filamentous bacteria in a mesotrophic lake: identity and potential controlling mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6272–6281.
31. Porter, K. G., and Y. S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**:943–948.
32. R Development Core Team. 2004. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> [Online.]
33. Rosello-Mora, R., and R. Amann. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:39–67.
34. Schauer, M., and M. W. Hahn. 2005. Diversity and phylogenetic affiliation of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1931–1940.
35. Schwenk, K., P. Juntilla, M. Rautio, F. Bastiansen, J. Knapp, O. Dove, R. Billiones, and B. Streit. 2004. Ecological, morphological, and genetic differentiation of *Daphnia* (*Hyalodaphnia*) from the Finnish and Russian subarctic. *Limnol. Oceanogr.* **49**:532–539.
36. Semenova, E. A., and K. D. Kuznedelov. 1998. A study of the biodiversity of Baikal picoplankton by comparative analysis of 16S rRNA gene 5'-terminal regions. *Mol. Biol.* **32**:754–760.
37. Sommaruga, R., R. Psenner, E. Schaffner, K. A. Koinig, and S. Sommaruga-Wögrath. 1999. Dissolved organic carbon concentrations and phytoplankton biomass in high-mountain lakes of the Austrian Alps: potential effects of climatic warming. *Arc. Antarct. Alp. Res.* **31**:247–253.
38. Stefanauskas, R., M. A. Moran, B. A. Bergamaschi, and J. T. Hollibaugh. 2003. Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**:85–98.
39. Sturmbauer, C., W. Mark, and R. Dallinger. 1992. Ecophysiology of Aufwuchs eating cichlids in Lake Tanganyika: niche separation by trophic specialization. *Environ. Biol. Fish.* **35**:283–290.
40. ter Braak, C. J. F. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* **67**:1167–1179.
41. ter Braak, C. J. F. 1987. The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* **69**:69–77.
42. ter Braak, C. J. F. 1988. Partial canonical correspondence analysis, p. 551–558. *In* H. H. Bock (ed.), Classification and related methods of data analysis. North-Holland, Amsterdam, The Netherlands.
43. Urbach, E., K. L. Vergin, L. Young, A. Morse, G. L. Larson, and S. J. Giovannoni. 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultral oligotrophic crater lake. *Limnol. Oceanogr.* **46**:557–572.
44. Van Veen, W. L., D. van der Kooij, E. C. W. A. Geuze, and A. W. van der Vlies. 1973. Investigations of the sheathed bacterium *Haliscomenobacter hydrossis* gen.n., sp.n., isolated from activated sludge. *Antonie Leeuwenhoek* **39**:207–216.
45. Vrba, J., J. Kopacek, and J. Fott. 2000. Long-term limnological research of the Bohemian Forest lakes and their recent status. *Silva Gabreta.* **4**:7–27.
46. Wagner, M., R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer, and K. H. Schleifer. 1994. Identification and in situ detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**:405–417.
47. Weisse, T., N. Karstens, V. C. L. Meyer, L. Janke, S. Lettner, and K. Teichgräber. 2001. Niche separation in common prostome freshwater ciliates: the effect of food and temperature. *Aquat. Microb. Ecol.* **26**:167–179.
48. Wu, Q., J. Boenigk, and M. W. Hahn. 2004. Successful predation of filamentous bacteria by a nanoflagellate challenges current models of flagellate bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:332–339.
49. Yannarell, A. C., and E. W. Triplett. 2004. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: Investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:214–223.
50. Yannarell, A. C., and E. W. Triplett. 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:227–239.
51. Zwart, G. J. M., W. D. Hiorns, B. A. Methé, M. P. van Agterveld, R. Huismans, S. C. Nold, J. P. Zehr, and H. J. Laanbroek. 1998. Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:546–556.
52. Zwart, G. J. M., B. C. Crump, M. Agterveld, F. Hagen, and S. K. Han. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:141–155.

- Principal components biplot based on 74 lakes having different trophic levels, 5 environmental variables and a correlation matrix.



ab - Details on morphometric, limnochemical, and trophic variables, total bacteria and SOL bacteria abundances, and SOL subcluster specific composition of all 140 samples from 115 different habitats investigated in this survey.

Habitat / Sample	Country	Shortcut	Sampling date	Conductivity [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	pH	max. depth [m]	Lake area [ha]	Altitude [m.a.s.l.]	Trophic status	Total bacteria [10^6 ml^{-1}]	SOL bact. [% ^a]	SOL bact. [10^6 ml^{-1}]	HAL [% ^b]	HAL [10^6 ml^{-1}]	LD2 [% ^b]	LD2 [10^4 ml^{-1}]	GKS2-217 [% ^b]	GKS2-217 [10^4 ml^{-1}]	PUC group [% ^b]	PUC group [10^4 ml^{-1}]
Ahornsee	Austria	AHO	07.08.03	18	7,1	7	2,6	2069	oligotrophic	0,624	2,23	1,39	64,2	0,89	0,0	0,00	35,8	0,50	0,0	0,00
Almsee	Austria	ALM	04.06.03	214	8,5	9	85	589	oligotrophic	1,080	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Altaussee	Austria	ALT	04.06.03	160	8,3	53	214	712	oligotrophic	1,760	0,03	0,05	0,0	0,00	100,0	0,05	0,0	0,00	0,0	0,00
Ämthyttsjön	Sweden	AMT	12.10.02	40	6,4	n.d.	n.d.	115	oligotrophic	1,085	0,13	0,14	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,14	0,0	0,00
Angersee	Austria	ANG	13.08.03	22	7,1	6	3,3	2096	oligotrophic	0,350	0,71	0,25	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,25	0,0	0,00
Attersee	Austria	ATT	19.07.04	274	8,5	169	4620	469	oligotrophic	1,460	0,27	0,40	0,0	0,00	100,0	0,40	0,0	0,00	0,0	0,00
Attersee	Austria	ATT	21.06.04	272	8,5	169	4620	469	oligotrophic	1,740	1,50	2,61	0,0	0,00	100,0	2,61	0,0	0,00	0,0	0,00
Attersee	Austria	ATT	04.09.03	n.d.	n.d.	169	4620	469	oligotrophic	0,516	0,62	0,32	9,0	0,03	91,0	0,29	0,0	0,00	0,0	0,00
Attersee	Austria	ATT	04.06.03	278	8,5	169	4620	469	oligotrophic	1,120	4,53	5,07	0,0	0,00	100,0	5,07	0,0	0,00	0,0	0,00
Attersee	Austria	ATT	26.05.03	278	8,4	169	4620	469	oligotrophic	0,643	6,91	4,44	0,0	0,00	100,0	4,44	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
AUS1	Australia	AU1	22.04.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,9	n.d.	88,1	n.d.	0,0	n.d.	0,0	0,00
Bergsee 3	Austria	BE3	18.09.04	21	6,8	n.d.	0,5	2200	n.d.	2,640	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Bergsee 4	Austria	BE4	18.09.04	15	6,8	n.d.	0,2	2200	n.d.	1,520	0,01	0,01	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,01	0,0	0,00
Bergsee 5	Austria	BE5	18.09.04	11	6,8	n.d.	0,2	2200	n.d.	1,410	0,01	0,01	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,01	0,0	0,00
Blejsko Jezero	Slovenia	BLE	02.07.03	n.d.	n.d.	31	143	475	eutrophic	1,170	0,28	0,33	2,0	0,01	98,0	0,32	0,0	0,00	0,0	0,00
Böndlsee	Austria	BÖN	28.06.04	381	8,2	14	2	845	mesotrophic	2,910	0,00	0,01	66,6	0,01	33,3	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Černé jezero	Czech Republic	CER	17.06.03	37	4,7	40	18,4	1008	oligotrophic	0,499	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Chiemsee	Germany	CHI	29.06.04	324	8,5	74	7990	518	mesotrophic	2,820	0,20	0,55	0,0	0,00	100,0	0,55	0,0	0,00	0,0	0,00
Cenote Kaape Ha	Mexico	CKH	29.08.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	50	n.d.	2,810	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Cenote Laguna	Mexico	CLA	28.08.04	535	8,1	n.d.	1	50	n.d.	2,300	1,60	3,68	8,9	0,33	55,3	2,04	0,0	0,00	35,8	1,32
Čertovo jezero	Czech Republic	CTO	17.06.03	43	4,5	36	10,3	1028	oligotrophic	1,360	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Cenote Zaci	Mexico	CZA	28.08.04	1119	7,8	n.d.	0,5	50	n.d.	3,330	0,11	0,36	0,0	0,00	100,0	0,36	0,0	0,00	0,0	0,00
Eckarfjärden	Sweden	ECK	08.10.02	220	7,8	3	23	6	mesotrophic	2,449	0,20	0,48	2,0	0,01	98,0	0,47	0,0	0,00	0,0	0,00
Egelsee-II	Austria	EG2	25.06.04	391	7,7	n.d.	5	592	mesotrophic	2,910	0,18	0,51	0,0	0,00	100,0	0,51	0,0	0,00	0,0	0,00
Egelsee	Austria	EGE	26.05.03	385	8,5	n.d.	1,5	481	mesotrophic	1,600	0,33	0,53	0,0	0,00	100,0	0,53	0,0	0,00	0,0	0,00
Egelsee	Austria	EGE	29.08.02	n.d.	n.d.	n.d.	1,5	481	mesotrophic	1,500	0,12	0,18	0,0	0,00	100,0	0,18	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Eibensee	Austria	EIB	08.08.04	n.d.	n.d.	n.d.	2,3	952	oligotrophic	1,480	0,18	0,27	0,0	0,00	100,0	0,27	0,0	0,00	0,0	0,00
Eibensee	Austria	EIB	04.09.03	n.d.	n.d.	n.d.	2,3	952	oligotrophic	1,970	0,80	1,58	0,0	0,00	100,0	1,58	0,0	0,00	0,0	0,00
Eibensee	Austria	EIB	26.05.03	250	8,5	n.d.	2,3	952	oligotrophic	0,900	1,58	1,42	0,0	0,00	100,0	1,42	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Ekoln	Sweden	EKO	07.06.02	360	8,7	40	2000	1	eutrophic	4,735	0,02	0,11	0,0	0,00	100,0	0,11	0,0	0,00	0,0	0,00
Falkertsee	Austria	FAL	18.02.04	64	8,0	13	4,32	1872	oligotrophic	0,957	2,07	1,98	0,0	0,00	72,5	1,44	0,0	0,00	27,5	0,54
Fischteich	Austria	FIT	06.07.04	n.d.	n.d.	2	6,7	449	n.d.	2,860	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Fuschlsee	Austria	FUS	04.09.03	n.d.	n.d.	67	265	662	oligotrophic	1,320	0,84	1,11	23,9	0,27	76,1	0,84	0,0	0,00	0,0	0,00
Fuschlsee	Austria	FUS	26.05.03	324	8,5	67	265	662	oligotrophic	1,270	1,93	2,45	0,0	0,00	100,0	2,45	0,0	0,00	0,0	0,00
Fuschlsee	Austria	FUS	29.08.02	n.d.	n.d.	67	265	662	oligotrophic	1,940	0,15	0,30	0,0	0,00	100,0	0,30	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Lago di Garda	Italy	GAR	10.09.04	229	8,4	346	37000	65	oligotrophic	2,430	0,09	0,21	0,0	0,00	100,0	0,21	0,0	0,00	0,0	0,00
Gran Cenote	Mexico	GCE	29.08.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	50	n.d.	3,610	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Goldegger See	Austria	GOL	28.06.04	395	8,2	7	3	823	mesotrophic	3,350	0,12	0,40	0,0	0,00	100,0	0,40	0,0	0,00	0,0	0,00
Grabensee	Austria	GRA	28.05.03	303	8,4	14	130	503	meso-eutrophic	1,810	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Grundlsee	Austria	GRU	21.06.04	196	8,3	70	414	709	oligotrophic	1,930	0,25	0,48	0,0	0,00	100,0	0,48	0,0	0,00	0,0	0,00
Grundlsee	Austria	GRU	04.06.03	208	8,3	64	414	709	oligotrophic	1,170	1,15	1,35	0,0	0,00	100,0	1,35	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Hallstättersee	Austria	HAL	21.06.04	201	8,2	125	855	508	oligo-mesotrophic	2,230	0,04	0,08	0,0	0,00	100,0	0,08	0,0	0,00	0,0	0,00
Hallstättersee	Austria	HAL	26.05.03	217	8,7	125	855	508	oligo-mesotrophic	2,710	0,01	0,04	0,0	0,00	100,0	0,04	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Hawaii	Hawaii	HAW	02.12.03	n.d.	n.d.	n.d.	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0	0,00	86,7	n.d.	0,0	0,00	13,3	n.d.
Hinterer Gosausee	Austria	HGO	17.07.04	147	8,4	36	26	1156	oligotrophic	0,758	2,30	1,74	0,0	0,00	93,7	1,63	0,0	0,00	6,3	0,11
High mountain lake	Tibet	HML	23.07.04	250	9,18	n.d.	3500	4987	oligo-mesotrophic	2,660	0,07	0,19	0,0	0,00	100,0	0,19	0,0	0,00	0,0	0,00

Holzöstersee	Austria	HOL	04.09.02	n.d.	n.d.	5	9	460	mesotrophic	3,930	0,30	1,19	11,3	0,13	88,7	1,06	0,0	0,00	0,0	0,00
Holzöstersee	Austria	HOL	28.05.03	326	8,4	5	9	460	mesotrophic	4,300	0,48	2,06	0,0	0,00	100,0	2,06	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Höllerersee	Austria	HÖL	28.05.03	373	8,6	20	20	440	mesotrophic	4,160	0,29	1,19	0,0	0,00	100,0	1,19	0,0	0,00	0,0	0,00
Halleswiessee	Austria	HWS	28.04.04	n.d.	n.d.	9	1	828	oligotrophic	1,300	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Ibnsee	Austria	IBN	28.05.03	370	8,4	6	25	424	meso-eutrophic	3,130	1,32	4,12	0,0	0,00	100,0	4,12	0,0	0,00	0,0	0,00
Immsee	Austria	IMM	28.05.03	326	8,3	6	5	500	meso-eutrophic	5,970	0,07	0,40	0,0	0,00	100,0	0,40	0,0	0,00	0,0	0,00
Irrsee	Austria	IRR	21.06.04	286	8,4	32	355	553	oligo-mesotrophic	2,640	0,18	0,48	1,0	0,00	99,0	0,48	0,0	0,00	0,0	0,00
Irrsee	Austria	IRR	04.09.03	n.d.	n.d.	32	355	553	oligo-mesotrophic	2,300	0,24	0,55	4,0	0,02	96,0	0,53	0,0	0,00	0,0	0,00
Irrsee	Austria	IRR	26.05.03	291	8,5	32	355	553	oligo-mesotrophic	1,870	1,06	1,98	0,0	0,00	100,0	1,98	0,0	0,00	0,0	0,00
Irrsee	Austria	IRR	29.08.02	n.d.	n.d.	32	355	553	oligo-mesotrophic	0,983	1,05	1,03	65,0	0,67	35,0	0,36	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Jägerteich	Austria	JÄG	13.09.02	270	8,5	3	20	502	eutrophic	5,940	1,20	7,13	0,0	0,00	100,0	7,13	0,0	0,00	0,0	0,00
Jangtse river	P.R. China	JAN	22.04.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0	0,00	60,0	n.d.	0,0	0,00	40,0	n.d.
Kapuzinersee	Austria	KAP	13.08.03	21	7,2	20	1,2	2147	oligotrophic	0,300	3,03	0,91	n.d.	n.d.	0,0	0,00	n.d.	n.d.	0,0	0,00
Kärven	Sweden	KÄR	10.10.02	390	7,7	6	161	12	mesotrophic	1,657	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Krottensee	Austria	KRO	06.08.02	n.d.	n.d.	60	9	610	oligotrophic	1,670	0,43	0,71	0,0	0,00	100,0	0,71	0,0	0,00	0,0	0,00
Krottensee	Austria	KRO	26.05.03	286	8,6	60	9	610	oligotrophic	1,130	1,47	1,66	37,2	0,62	62,8	1,04	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Jezero Laka	Czech Republic	LAK	17.06.03	20	5,0	3	2,8	1096	oligo-mesotrophic	0,811	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Längsjön	Sweden	LAN	06.06.02	530	8,4	13	250	26	oligo-mesotrophic	2,714	1,09	2,97	0,8	0,02	99,2	2,95	0,0	0,00	0,0	0,00
Lilla Björn	Sweden	LIB	02.06.02	27	5,2	8	2	335	mesotrophic	2,037	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Lilla Gädd	Sweden	LIG	01.06.02	37	7,0	15	20	257	oligo-mesotrophic	1,830	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Loosdrecht	The Netherlands	LOO	22.01.04	570	8,0	3	980	0	eutrophic	2,270	1,40	3,17	3,7	0,12	96,3	3,05	0,0	0,00	0,0	0,00
Lötsjön	Sweden	LÖT	07.06.02	222	8,3	8	64	9	eutrophic	3,829	0,50	1,91	0,0	0,00	100,0	1,91	0,0	0,00	0,0	0,00
Maarseveen	The Netherlands	MAA	22.01.04	355	8,2	31	70	0	oligo-mesotrophic	0,796	0,08	0,06	14,3	0,01	85,7	0,05	0,0	0,00	0,0	0,00
Mattsee	Austria	MAT	28.05.03	256	8,5	42	360	503	oligo-mesotrophic	3,040	0,11	0,34	0,9	0,00	99,1	0,34	0,0	0,00	0,0	0,00
Mekkojärvi	Finland	MEK	05.08.04	52	5,1	4	0,4	136	oligo-mesotrophic	2,540	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Mittersee	Austria	MIT	01.08.04	n.d.	n.d.	n.d.	0,4	1370	oligotrophic	2,160	0,03	0,06	0,0	0,00	100,0	0,06	0,0	0,00	0,0	0,00
Moaralmsee	Austria	MOA	14.09.04	31	7,3	6	2	1825	oligotrophic	0,938	0,05	0,05	71,4	0,04	0,0	0,00	18,6	0,01	0,0	0,00
Mondsee	Austria	MON	01.07.02	317	9,1	68	1378	481	oligo-mesotrophic	2,190	0,72	1,57	0,0	0,00	100,0	1,57	0,0	0,00	0,0	0,00
Mondsee	Austria	MON	02.09.02	299	8,6	68	1378	481	oligo-mesotrophic	2,754	0,02	0,06	10,0	0,01	90,0	0,06	0,0	0,00	0,0	0,00
Mondsee	Austria	MON	03.09.03	214	8,5	68	1378	481	oligo-mesotrophic	2,450	0,10	0,24	29,9	0,07	70,1	0,17	0,0	0,00	0,0	0,00
Mondsee	Austria	MON	26.05.03	234	9,5	68	1378	481	oligo-mesotrophic	1,260	0,67	0,85	0,0	0,00	100,0	0,85	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Moerichsee	Austria	MÖN	01.08.04	n.d.	n.d.	34	2,3	1283	oligotrophic	2,060	0,52	1,07	0,0	0,00	100,0	1,07	0,0	0,00	0,0	0,00
Mörtsjön	Sweden	MÖR	07.10.02	51	6,7	3	23	68	oligo-mesotrophic	1,689	0,17	0,28	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,28
Lake Namoucuo	Tibet	NAM	26.07.04	1800	9,38	n.d.	2E+05	4740	oligotrophic	1,110	0,23	0,26	0,0	0,00	100,0	0,26	0,0	0,00	0,0	0,00
N. Bredsjön	Sweden	NBR	12.10.02	30	6,6	n.d.	n.d.	267	oligotrophic	1,367	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Nedre Björn	Sweden	NEB	02.06.02	26	5,0	10	3	335	mesotrophic	4,259	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Nedre Gädd	Sweden	NEG	01.06.02	37	7,0	14	110	257	oligo-mesotrophic	0,840	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Lake Nkuruba	Uganda	NKU	16.06.03	325	n.d.	38	3	1400	mesotrophic	0,981	0,41	0,40	2,5	0,01	8,3	0,03	0,0	0,00	89,2	0,36
NZ5	New Zealand	NZ5	22.04.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0	n.d.	100,0	n.d.	0,0	n.d.	0,0	0,00
Obertrumersee	Austria	OBE	04.09.02	n.d.	n.d.	36	480	503	mesotrophic	4,900	0,06	0,30	0,0	0,00	100,0	0,30	0,0	0,00	0,0	0,00
Obertrumersee	Austria	OBE	28.05.03	306	8,5	36	480	503	mesotrophic	2,360	0,23	0,54	0,0	0,00	100,0	0,54	0,0	0,00	0,0	0,00
(a)	a																			
Offensee	Austria	OFF	06.08.02	n.d.	n.d.	38	55	649	oligotrophic	1,830	0,25	0,46	0,0	0,00	100,0	0,46	0,0	0,00	0,0	0,00
ob. Klaffersee	Austria	OKL	18.09.04	48	6,6	33	5,1	2309	oligotrophic	1,470	0,22	0,33	30,0	0,10	0,0	0,00	70,0	0,23	0,0	0,00
ob. Klaffersee	Austria	OKL	13.08.03	15	7,1	33	5,1	2309	oligotrophic	0,547	3,03	1,66	33,0	0,55	0,0	0,00	67,0	1,11	0,0	0,00
(a)	a																			
Ö. Skärsjön	Sweden	ÖSK	12.10.02	25	6,2	n.d.	n.d.	219	oligotrophic	1,312	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
ob. Sonntagkarsee	Austria	OSO	13.08.03	19	7,1	18	6,8	2063	oligotrophic	0,315	1,11	0,35	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,35	0,0	0,00
Övre Björn	Sweden	ÖVB	02.06.02	27	5,2	8	4	335	mesotrophic	3,718	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Övre Gädd	Sweden	ÖVG	01.06.02	36	6,9	10	70	257	oligo-mesotrophic	1,163	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Plešné jezero	Czech Republic	PLE	17.06.03	36	4,8	18	7,5	1090	mesotrophic	1,750	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Prášílské jezero	Czech Republic	PRA	17.06.03	27	4,9	16	4,2	1079	oligo-mesotrophic	0,688	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Lake Qinghai	P.R. China	QIN	16.07.04	21700	9,29	n.d.	4E+05	3203	oligotrophic	0,229	1,31	0,30	0,0	0,00	100,0	0,30	0,0	0,00	0,0	0,00
Ranipokhari	Nepal	RAN	16.06.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1350	eutrophic	9,040	2,39	21,60	0,0	0,00	100,0	21,60	0,0	0,00	0,0	0,00
Rauhenbergsee	Austria	RAU	13.08.03	19	7,0	26	2,8	2263	oligotrophic	0,398	1,78	0,71	23,1	0,16	0,0	0,00	76,9	0,55	0,0	0,00
Riesachsee	Austria	RIE	07.08.04	n.d.	n.d.	19	20	1338	oligotrophic	0,475	0,02	0,01	100,0	0,01	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Sattelsee	Austria	SAT	18.09.04	31	6,0	n.d.	0,3	2450	n.d.	1,700	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Schwarzensee	Austria	SCH	29.08.02	n.d.	n.d.	54	48	716	oligotrophic	0,988	0,37	0,37	0,0	0,00	100,0	0,37	0,0	0,00	0,0	0,00
Seeleithensee	Austria	SEE	28.05.03	459	7,9	2	10	425	eutrophic	11,300	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00

Stausee Gosaubach	Austria	SGO	17.07.04	186	8,4	n.d.	4	760	oligotrophic	0,439	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Siggefora	Sweden	SIG	07.10.02	42	6,6	11	76	74	oligo-mesotrophic	2,034	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Schwarzkarlsee	Austria	SKS	19.08.04	n.d.	n.d.	n.d.	1,5	2191	oligo-mesotrophic	2,130	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
S. Snesnaren	Sweden	SSN	12.10.02	31	6,7	n.d.	n.d.	257	oligotrophic	0,972	0,11	0,11	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,11
Storsjön	Sweden	STO	12.10.02	29	6,7	n.d.	45000	117	oligotrophic	1,399	0,09	0,12	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,12
Taihu	P.R. China	TAI	31.01.02	275	8,2	3	2E+05	3	hypertrophic	1,750	10,86	19,00	0,0	0,00	100,0	19,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Tanganjika	Zambia	TAN	07.03.03	n.d.	n.d.	1471	3E+06	773	oligotrophic	1,750	0,07	0,13	0,0	0,00	100,0	0,13	0,0	0,00	0,0	0,00
Tappenkarsee	Austria	TAP	08.09.04	153	8,2	100	24	1762	oligotrophic	0,614	2,33	1,43	0,0	0,00	100,0	1,43	0,0	0,00	0,0	0,00
Lago di Tenno	Italy	TEN	09.09.04	272	8,0	47	19,5	570	oligotrophic	0,962	0,07	0,07	0,0	0,00	100,0	0,07	0,0	0,00	0,0	0,00
Tilmitsch T3	Austria	TT3	14.10.02	328	9,0	5	7,7	277	mesotrophic	3,470	0,15	0,52	0,0	0,00	100,0	0,52	0,0	0,00	0,0	0,00
Tilmitsch T4	Austria	TT4	14.10.02	374	8,7	4	5,5	277	eutrophic	2,670	0,59	1,58	0,0	0,00	100,0	1,58	0,0	0,00	0,0	0,00
Tilmitsch T7	Austria	TT7	14.10.02	278	8,4	6	21,9	275	mesotrophic	2,950	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Tilmitsch T12	Austria	T12	14.10.02	288	8,1	5	10,2	274	mesotrophic	3,630	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Titisee	Germany	TIT	13.07.04	84	9,0	45	130	858	oligotrophic	2,290	0,66	1,51	0,0	0,00	99,0	1,49	0,0	0,00	1,0	0,02
Toplitzsee	Austria	TOP	04.06.03	171	8,4	103	50	719	oligotrophic	1,390	1,03	1,43	0,0	0,00	100,0	1,43	0,0	0,00	0,0	0,00
Traunsee	Austria	TRA	21.06.04	391	8,3	191	2435	422	oligotrophic	1,980	0,04	0,07	0,0	0,00	100,0	0,07	0,0	0,00	0,0	0,00
Traunsee	Austria	TRA	26.05.03	369	8,5	191	2435	422	oligotrophic	1,920	0,27	0,51	0,0	0,00	100,0	0,51	0,0	0,00	0,0	0,00
a (a)	a																			
Turrachersee	Austria	TUR	18.02.04	119	8,5	33	20	1763	mesotrophic	0,750	0,03	0,02	0,0	0,00	100,0	0,02	0,0	0,00	0,0	0,00
Tvigölingen	Sweden	TVI	06.06.02	84	7,1	4	7	49	oligo-mesotrophic	3,058	0,16	0,50	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,50
unt. Klaffersee	Austria	UKL	13.08.03	24	7,2	40	3,9	2103	oligotrophic	0,384	2,86	1,10	75,8	0,83	0,0	0,00	24,2	0,27	0,0	0,00
unt. Klaffersee	Austria	UKT	07.08.03	15	6,9	11	1,6	1883	oligotrophic	0,704	0,20	0,14	36,3	0,05	0,0	0,00	63,7	0,09	0,0	0,00
unt. Sonntagkarsee	Austria	USO	07.08.04	n.d.	n.d.	26	4,9	1962	oligotrophic	0,198	0,15	0,03	27,0	0,01	0,0	0,00	73,0	0,02	0,0	0,00
unt. Sonntagkarsee	Austria	USO	13.08.03	18	6,9	26	4,9	1962	oligotrophic	0,175	3,37	0,59	32,1	0,19	0,0	0,00	67,9	0,40	0,0	0,00
a a (a)	a																			
Valkea-Kotinen	Finland	VAK	05.08.04	43	5,3	7	4,1	156	mesotrophic	2,163	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Vällen	Sweden	VÄL	09.10.02	220	7,8	5	942	13	mesotrophic	2,198	0,12	0,26	0,0	0,00	100,0	0,26	0,0	0,00	0,0	0,00
Vorderer Gosausee	Austria	VGO	17.07.04	162	8,4	69	52	933	oligotrophic	2,040	0,09	0,18	0,0	0,00	100,0	0,18	0,0	0,00	0,0	0,00
Victoriasee	Uganda	VIC	16.06.03	n.d.	n.d.	84	7E+06	1134	mesotrophic	0,842	0,14	0,12	0,0	0,00	25,0	0,03	0,0	0,00	75,0	0,09
Wallersee	Austria	WAL	28.05.03	352	8,5	23	590	506	mesotrophic	2,400	0,01	0,02	0,0	0,00	100,0	0,02	0,0	0,00	0,0	0,00
Waldteich	Austria	WAT	06.07.04	n.d.	n.d.	2	0,2	450	n.d.	2,850	0,64	1,82	0,0	0,00	100,0	1,82	0,0	0,00	0,0	0,00
Weissensee	Austria	WEI	07.08.03	19	7,0	44	6,5	2226	oligotrophic	0,334	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Wolfgangsee	Austria	WGS	21.06.04	247	8,3	114	1284	538	oligotrophic	2,240	0,57	1,27	0,0	0,00	100,0	1,27	0,0	0,00	0,0	0,00
Wolfgangsee	Austria	WGS	26.05.03	257	8,5	114	1284	538	oligotrophic	1,120	2,33	2,61	0,7	0,02	99,3	2,59	0,0	0,00	0,0	0,00
Wolfgangsee	Austria	WGS	29.08.02	n.d.	n.d.	114	1284	538	oligotrophic	1,680	0,15	0,25	0,0	0,00	100,0	0,25	0,0	0,00	0,0	0,00
a (a)	a																			
Wildlochsee	Austria	WIL	13.08.03	18	7,0	6	1,2	2108	oligotrophic	0,610	0,31	0,19	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,19	0,0	0,00
Wörthersee	Austria	WÖR	16.10.03	295	8,3	85	1940	439	mesotrophic	2,810	0,20	0,55	0,0	0,00	100,0	0,55	0,0	0,00	0,0	0,00
Zellersee	Austria	ZEL	28.06.04	141	7,9	70	455	750	oligotrophic	2,000	0,48	0,95	0,0	0,00	100,0	0,95	0,0	0,00	0,0	0,00
Zwerfenbergsee	Austria	ZWE	13.08.03	25	7,2	36	11,0	2025	oligotrophic	0,330	0,15	0,05	0,0	0,00	0,0	0,00	100,0	0,05	0,0	0,00

^a % of total bacteria

^b % of SOL bacteria

^c n.d. not determined

Recurrent Seasonal Variations in Abundance and Composition of Filamentous SOL Cluster Bacteria (*Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*) in Oligomesotrophic Lake Mondsee (Austria)†

Michael Schauer,¹ Jing Jiang,^{1,2,‡} and Martin W. Hahn^{1*}

Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria,¹ and Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, 73 East Beijing Road, Nanjing 210008, People's Republic of China²

Received 13 December 2005/Accepted 20 April 2006

The spatial and temporal variation of SOL cluster bacteria was assessed in oligomesotrophic Lake Mondsee and adjacent lakes by fluorescence in situ hybridization over two annual cycles. The filamentous SOL bacteria were present in Lake Mondsee throughout the study period, and the seasonal dynamics of the SOL community were remarkably similar with respect to both abundance and composition in the two consecutive years. Only two of the three SOL subclusters were detected in Lake Mondsee and four connected lakes. These two populations significantly differed in size distribution and demonstrated pronounced but recurrent differences in seasonality and length of period of appearance in Lake Mondsee. Extensive sampling of the lakes in September 2003 revealed low horizontal variation in the composition of the SOL community within Lake Mondsee but marked variations with depth. Between connected habitats pronounced differences in the composition and abundance of the SOL community were detected. The interaction of SOL bacteria with bacterivorous protists, mesozooplankton, and phytoplankton was investigated in order to reveal variables controlling the structure and dynamics of SOL communities. No strong indication for a bottom-up influence of phytoplankton was found, while the estimated community grazing rates of mesozooplankton on SOL bacteria indicated a top-down control of SOL abundance during mesozooplankton peaks in spring and early autumn. Furthermore, species-specific differences in grazing of mesozooplankton on SOL bacteria were observed. In general, the overall composition of SOL communities was controlled by abiotic factors (water chemistry), while their dynamics seemed to be controlled by abiotic and biotic interactions.

Cultivation-independent methods roughly revealed the overall composition of bacterioplankton in freshwater ecosystems (4, 5, 12, 31, 34, 42). Several factors potentially influencing or controlling the bacterioplankton community composition (BCC) in freshwater habitats were discovered by interhabitat comparison of bacterioplankton composition, by seasonal studies, and by manipulation experiments (4, 13, 15, 17, 19–22, 32, 40, 41). Most of these studies investigated the environmental influences on the BCC at the community level by application of community fingerprinting methods, and only a few studies tried to reveal the environmental influences controlling the distribution and dynamics of species- or genus-like groups of freshwater bacteria (30, 38). The knowledge gained from these investigations allows understanding of why BCC in habitats differing in environmental conditions is different; however, it does not really allow understanding or predicting of the dynamics of particular populations of freshwater bacteria.

In the study presented here, we tried to reveal the crucial environmental factors controlling the dynamics of species-like populations of SOL cluster bacteria in an oligomesotrophic lake. We investigated the spatial and temporal distribution of

the SOL community in Lake Mondsee and in four neighboring lakes connected by running waters to Lake Mondsee. The influence of predation (top-down factor) by protists and mesozooplankton was investigated by grazing experiments, and the grazing mortality of SOL bacteria caused by mesozooplankton was estimated for populations inhabiting Lake Mondsee. In order to reveal potential bottom-up (resource) factors, the dynamics of SOL cluster bacteria and the dynamics of phytoplankton in Lake Mondsee were compared statistically.

SOL cluster bacteria (29) are filamentous, heterotrophic bacteria affiliated with the monophyletic SOL cluster (*Bacteroidetes* phylum). This genus-like cluster was recently discovered and recognized as an undescribed taxon. Therefore, this phylogenetic cluster was designated with the preliminary name “SOL” (29). Bacteria affiliated with this cluster always possess a conspicuous filamentous morphology, characterized by rather stable diameters of 0.25 to 0.35 μm , and highly variable lengths of 5 to >100 μm (24, 29). The filaments are usually straight, and even the longest filaments do not show a segmentation in cell-like compartments. SOL bacteria are cosmopolitan inhabitants of the pelagic zones of inland waters and were also found in wastewater treatment plants. They were detected in many freshwater lakes, as well as in oligo- and polyhaline lakes (24, 29, 30, 42). SOL filaments comprise up to 11% of bacterioplankton cell numbers in inland waters (30), but due to their filamentous morphology they contribute overproportionally to total bacterioplankton biovolume (29). Within a range of 0 to 3% relative abundance of SOL bacteria, each percent-

* Corresponding author. Mailing address: Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, 5310 Mondsee, Austria. Phone: 43 6232 3125 29. Fax: 43 6232 3578. E-mail: martin.hahn@oeaw.ac.at.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

‡ Present address: Shenzhen Sheng Yi Environmental Co., Ltd., 8 Guishan Road, Shekou, Shenzhen 518067, People's Republic of China.

TABLE 1. Morphometric, hydrologic, and trophic characteristics of the investigated lakes

Habitat ^a	Maximum depth (m)	Lake area (ha)	Altitude (m)	Retention time (yr)	Trophic status
Lake Eibensee	ND ^b	2.3	952	ND	ND
Lake Fuschlsee	67	265	662	2.6	Oligotrophic
Lake Irrsee	32	355	553	1.29	Oligomesotrophic
Lake Mondsee	68	1,378	481	1.82	Oligomesotrophic
Lake Attersee	169	4,620	469	7.13	Oligotrophic

^a All habitats are located in the Salzkammergut area of Austria.

^b ND, not determined.

age of cell number contribution equals a 10 to 20% contribution to the total bacterioplankton biovolume, and contributions of >40% to bacterioplankton biovolume have been observed repeatedly (24, 29). SOL bacteria contributed an average 17% of the total bacterioplankton biovolume in 84 inland waters inhabited by these bacteria (30).

The monophyletic SOL cluster can be divided into at least three subclusters (HAL, LD2, and GKS2-217) (29). Only the HAL subcluster contains a described species, namely, *Haliscomenobacter hydrossis*, known from wastewater treatment plants (35). The other subclusters consist exclusively of environmental sequences, and sequences obtained from mixed cultures (29). Sequence similarities within and between the three subclusters indicated that each subcluster represents a species-like group (27, 29). Previous studies provided first insights in the ecology of the SOL bacteria. Pernthaler et al. (24) characterized the LD2 bacteria as ephemeral bacteria, which bloomed during a phytoplankton spring peak and benefited from protection against grazing by protists. We recently demonstrated complete niche separation between GKS2-217 and the LD2 subclusters due to the adaptation to softwater and hardwater conditions, respectively. The members of the HAL subcluster possess intermediate adaptations, which partially overlap with those of members of the vicarious GKS2-217 and LD2 subclusters. LD2 and HAL bacteria are known to cohabit Lake Mondsee and other lakes (29, 30); however, the temporal and spatial aspects of this cohabiting, as well as the ecological factors influencing the potential interplay between the two populations, are not known. In the present study we further reveal the ecology of LD2 and HAL bacteria and especially investigate the co-occurrence of these two closely related populations in Lake Mondsee.

MATERIALS AND METHODS

Study sites and sampling. Lake Mondsee is a deep (maximum depth, 68 m) oligomesotrophic lake situated in a pre-alpine region at an altitude of 481 m above sea level (Table 1). Samples were taken at the main sampling station from a depth of 1 m on a biweekly basis during the years 2002 and 2003. A more extensive sampling campaign was conducted in September 2003. Two depth profiles (0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, and 40 and 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 40, 50, and 60) were sampled at two sites (3 km apart) with maximum water depths of 48 and 60 m, respectively. In addition, Lake Mondsee was sampled (1-m depth) at sites close (30 to 50 m) to the apertures of three small rivers (Zeller Ache, Wangauer Ache, and Fuschler Ache) discharging into Lake Mondsee, as well as close (200 m) to the outlet forming the river Seeache. Furthermore, three lakes (Fuschlsee, Irrsee, and Attersee), which are directly connected by small rivers (3 to 22 km in length) to Lake Mondsee, were sampled. Lake Attersee was sampled at two sites separated by 20 km. Furthermore, a small montane lake (Lake Eibensee, 952 m), which is indirectly connected to Lake Mondsee via Lake Fuschlsee, as well as a creek flowing into Lake Eibensee, were also sampled. All

of these lakes were sampled at 1 m depth on 4 September 2003. In addition, these habitats were sampled during the years 2002 to 2004. Sampling and processing of samples was performed as described previously (29). Temperature, conductivity, and pH were measured onsite with an automatic multiprobe set (Yellowsprings 6502 Profiler).

Bacterial abundances. Formaldehyde-fixed samples were stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; final concentration 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (26) and enumerated by epifluorescence microscopy as described previously (30). SOL filaments were identified by specific morphological characteristics (29, 30) and enumerated separately. The length of DAPI-stained SOL filaments was measured with an image analysis system as described previously (29). We sized 50 to >100 SOL filaments per sample.

FISH. The fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses were performed on polycarbonate filter sections according to the protocol of Alfreider et al. (1) as described previously (29, 30). The oligonucleotide probes used for FISH were SAP-309, SOL-852, LD2-1261, HAL-844, GKS-847, and HHY-441 (29, 30). The conspicuous morphology of SOL bacteria allowed for an easy and secure detection in both DAPI-stained and probe-hybridized samples. Following standard procedures (23, 26), it is possible to trace these cells down to very low abundances (<100 filaments ml^{-1}). Probe HHY-441, specific for *Haliscomenobacter hydrossis* (29), was applied to selected samples to reveal the presence of this species.

Chlorophyll *a* and phytoplankton taxa. Biweekly samples were taken with an integrating sampling device at a depth of 0 to 20 m in Lake Mondsee. Chlorophyll *a* was determined by using standard methods (14). Enumeration and biovolume measurements of lugol-fixed phytoplankton samples were done under an inverted microscope connected to an image analysis system (33). Fifty-five algal taxa (mainly species) were detected and quantified in the samples from 2002 and 2003.

Mesozooplankton abundance in Lake Mondsee and grazing impact on SOL filaments. A total of 21 depth-integrated samples (30 liters) from Lake Mondsee were collected during 2002. Samples were filtered onto 50- μm -pore-size mesh filters, and mesozooplankton was preserved in a 4% sucrose-formalin solution (11). Mesozooplankton was enumerated in 10-ml chambers under a dissecting microscope (Reichert) and identified to the species level under a compound microscope (Neovar 2; Reichert-Jung). Species identification was done according to the methods of Flössner (8), Kiefer (16), Lilljeborg (18), and Einsle (6).

SOL filament specific grazing rates by *Daphnia hyalina*, *Diaphanosoma brachyurum*, *Eudiaptomus gracilis*, *Cyclops abyssorum*, and *Mesocyclops leuckarti* were determined in separate (except *C. abyssorum* and *M. leuckarti*) laboratory grazing experiments. Grazers were collected from Lake Mondsee and acclimatized to the experimental conditions prior to the experiments. During the acclimatization period, grazers were fed with the algae *Cryptomonas* sp. A SOL community from Lake Attersee was used for the grazing experiments. The size distribution of this community (range, 8 to 90 μm ; average, 18 μm) was similar to the distribution of the SOL community in Lake Mondsee during September 2002. The predation experiments were performed in beakers receiving 55 ml of water from Lake Attersee and 9 to 15 acclimatized individuals of the respective mesozooplankton species or without the addition of the grazers (controls). The initial SOL abundance in the experiments was 1.5×10^4 filaments ml^{-1} . Predation on SOL bacteria was investigated in the presence or absence of alternative food (*Cryptomonas* sp.) in triplicate experiments, respectively, over periods of 6 days. The growth rates of SOL bacteria (in the presence or absence of *Cryptomonas* sp.) were determined from grazer-free control treatments within the same grazing experiments. For the estimation of the in situ impact of the mesozooplankton community on SOL bacteria in Lake Mondsee, the SOL-specific mesozooplankton community grazing rate was calculated by using the experimentally determined grazing rates (corrected for temperature by assuming a Q10 of 2), the in situ SOL filament abundance, and the in situ mesozooplankton abundances. Grazing experiments could not be performed with *Daphnia cucullata* (contributing an average 2% of mesozooplankton biomass in Lake Mondsee) and *Eubosmina coregoni* (contributing an average 4% of mesozooplankton biomass). Therefore, grazing data measured in the experiments for *Diaphanosoma brachyurum* and *Daphnia hyalina*, which, respectively, share the filter mesh characteristics with the not investigated species, were used for the estimation of the SOL mortality caused by these two species.

Protistan grazing experiments. The grazing of three cultivated bacterivorous protists on SOL bacteria from Lake Attersee was investigated in batch culture experiments. Axenic cultures of flagellated (*Ochromonas* sp. strain DS and *Spu-mella* sp. strain JBC07) and ciliated (*Tetrahymena pyriformis* strain ATTC205062) protists were precultured at 20°C with heat-killed bacteria (*Listonella pelagia*) (3). SOL bacteria were sampled from Lake Attersee. The size distribution of this community was similar to the distribution of the SOL community in Lake Mond-

TABLE 2. Variability of bacterial parameters in the six investigated habitats

Habitat	No. of samples	Total bacteria (10^6 ml^{-1})	SOL bacteria (%) ^a	SOL bacteria (10^4 ml^{-1})	HAL (%) ^b	HAL (10^4 ml^{-1})	LD2 (%) ^b	LD2 (10^4 ml^{-1})
Inflow Lake Eibensee ^c	1	0.34	0	0	0	0	0	0
Lake Eibensee	3	0.90–1.97	0.18–1.58	0.27–1.58	0	0	100	0.27–1.58
Lake Fuschlsee	3	1.27–1.94	0.15–1.93	0.30–2.45	0–23.9	0–0.27	76.1–100	0.30–2.45
Lake Irrsee	4	0.98–2.64	0.18–1.06	0.48–1.98	0–65.0	0–0.67	35.0–100	0.36–1.98
Lake Mondsee	68	1.05–6.04	0.01–1.42	0.02–2.29	0–47.8	0–0.39	52.2–100	0.02–2.29
Lake Attersee	8	0.52–1.74	0.27–6.91	0.32–5.07	0–10.0	0–0.03	90.0–100	0.29–5.07

^a That is, the percentage of total bacteria.

^b That is, the percentage of SOL bacteria.

^c No lacustrine habitat upstream.

see during the spring and summer of 2002 (i.e., size range, 5 to 50 μm , with >90% of filaments being <20 μm [average, 14 μm]). The triplicated grazing experiments were performed in Erlenmeyer flasks, which received 40 ml of lake water (containing the SOL bacteria) and 10 ml of the respective axenic protist culture. As a control for grazing activity, three other treatments consisting of 10 ml of the respective protist culture and 50 ml of an inorganic medium (IBM medium) (10) were established and fed with nonfilamentous heat-killed bacteria (*Listonella pelagia*). Another control treatment (triplicates) consisted of lake water (containing the SOL bacteria) without the addition of protists and heat-killed bacteria. All treatments were incubated at 20°C without shaking in the dark. Subsamples were taken on days 0, 7, and 14; fixed with formaldehyde (2% final concentration); and analyzed by epifluorescence microscopy.

Statistics. Pearson correlations between SOL, LD2, and HAL abundances, physicochemical parameters, phytoplankton biovolumes (55 taxa), mesozooplankton abundances (9 taxa), and mesozooplankton-mediated SOL mortality estimated for three different grazer types were calculated. The best correlating parameters were further analyzed by multiple linear regressions. All statistics were determined with SIGMASTAT.

RESULTS

Detected SOL bacteria subclusters. Bacteria of the SOL morphotype were detected in 86 of the 87 samples from the six different habitats (Table 2). A small creek feeding Lake Eibensee was the only system where no SOL bacteria could be detected. This creek was the only sampled habitat not fed by a lacustrine system. Members of all three SOL subclusters (HAL, LD2, and GKS2-217) have been detected in Austrian lakes (29, 30) but, despite the intensive sampling of Lake Mondsee over a period of 2 years (Fig. 1), only two of these three subclusters were detected in the lake. The same holds true for the other four sampled lakes, which all share with Lake Mondsee a similar water chemistry (hardwater lakes). Bacteria of the LD2 subcluster were found in all 63 hybridized samples. Apart from one sample from Lake Irrsee, members of the LD2 subcluster always represented the majority of the SOL cluster communities. Members of the HAL subcluster were present in 54% of the hybridized samples. The maximum share of members of this subcluster was 65% of the SOL bacteria (Lake Irrsee). Members of the GKS2-217 subcluster were not found in any of the 63 hybridized samples taken from the six freshwater systems. No hints on the presence of SOL bacteria not affiliated with subclusters LD2 or HAL were obtained, and all investigated filaments of the SOL morphotype gave positive hybridization signals with the probes SAP-309 and SOL-852 in all of the samples analyzed.

Temporal variations of SOL cluster bacteria in Lake Mondsee. Lake Mondsee is characterized by two complete mixing events (holomixis) in spring and autumn and a stable stratification during summer. The data on water temperatures and

total bacterial numbers during the two annual cycles are presented in Fig. 1. Lake Mondsee usually lacks marked phytoplankton blooms in spring followed by a clearwater phase as known from other temperate lakes, and its phytoplankton is dominated by the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* (mean, 25.4% of the total phytoplankton biovolume). This species is forming a metalimnetic chlorophyll maximum during the stratification period. The heterotrophic SOL filaments contributed 0.01 to 1.4% of total bacterial numbers (0.02×10^4 to

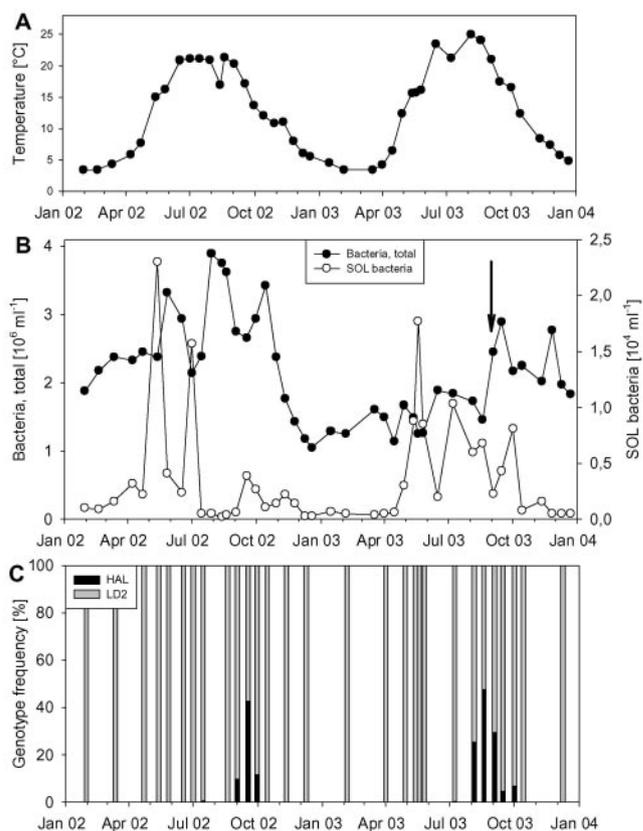


FIG. 1. Biweekly sampling of Lake Mondsee in the years 2002 and 2003. All samples were taken from a depth of 1 m at the main sampling station. (A) Water temperature. (B) Total bacterial numbers and SOL bacteria numbers. The arrow marks the date of extensive sampling in September 2003 (see data presented in Fig. S1 in the supplemental material and Fig. 4). (C) Composition of SOL cluster community.

TABLE 3. Climatic parameters of the study region and Lake Mondsee for the years 2002 and 2003

Climatic parameter	Value for:	
	2002	2003
Mean air temp (°C) ^a	19.00	21.43
Mean water temp (°C) ^{a,b}	20.02	22.56
Precipitation (mm m ⁻²) ^a	514	312
Mean annual precipitation (%) ^c	119	82

^a For June, July, and August.

^b Lake Mondsee (1-m depth).

^c For the whole year.

2.3×10^4 filaments ml⁻¹); thus, they were much more abundant than the filamentous *P. rubescens*.

The climatic conditions in the area of Lake Mondsee differed strongly between the two investigated years (Table 3). The summer of 2002 was characterized by major precipitation events causing extensive flooding of the region, while the summer of 2003 was dry and exceptionally hot. Despite these markedly different climatic situations, the dynamics of the SOL community in the years 2002 and 2003 was in respect to both abundance and composition remarkably similar (Fig. 1). In both years the highest observed abundances of SOL cluster bacteria occurred in late spring, and additional peaks of lower magnitude were detected during summer and autumn (Fig. 1B). Only low numbers of SOL cluster bacteria maintained in the lake during the winter period (0.02×10^4 to 0.1×10^4 filaments ml⁻¹). In 66% of the hybridized samples the SOL community was exclusively composed of members of the LD2 subcluster (Fig. 1C). In the cold year 2002, members of the HAL subcluster only appeared for a period of 4 weeks, reaching 43.0% of the SOL cluster community. In this time span both populations increased simultaneously in numbers (see Fig. S1A in the supplemental material). In the following warmer year the HAL subcluster occurred during the same season but for a longer time (12 weeks, up to 47.8% of all SOL cluster bacteria). At the beginning of this period the HAL subcluster increased, while the LD2 subcluster decreased in numbers; however, in the second half the bloom of each population developed in the opposite way (see Fig. S1B in the supplemental material).

The size distribution of the SOL community was rather stable during the first nine months of 2002 but expanded toward larger filaments along with the appearance of HAL filaments (Fig. 2C). In part this change was caused by the significantly larger length of HAL bacteria (Fig. 3); however, the filament length of the LD2 bacteria was also larger during this period.

The abundance of HAL bacteria correlated with temperature ($R^2 = 0.20$, $P < 0.05$), as well as with conductivity ($R^2 = 0.27$; $P < 0.01$), whereas the abundance of LD2 bacteria correlated with pH ($R^2 = 0.22$, $P < 0.05$).

Spatial variability of SOL community composition within Lake Mondsee. SOL bacteria numbers showed in the two investigated depths profiles a much higher vertical variability than total bacterial numbers (Fig. 4B and E). On average, SOL bacteria were more abundant in epilimnetic than in metalimnetic and hypolimnetic water layers. The exceptionally high values of both SOL bacteria numbers and total bacterial num-

bers in the deepest sample of the second depth profile (Fig. 4E) most likely resulted from the proximity of the sampled water layer to the sediment layer. The HAL subcluster constituted 29.9 and 32.0%, respectively, of the SOL community at the water surface, and both depth profiles showed a general trend of decreasing HAL frequencies with depth (Fig. 4C and F). The horizontal variation in Lake Mondsee (six samples, 1-m depth) of SOL abundance (0.2×10^4 to 1.1×10^4 filaments ml⁻¹) (Fig. 5) was in a range similar to that of the vertical variation (0.1×10^4 to 1.4×10^4 filaments ml⁻¹) (Fig. 4). By contrast, the horizontal variation of the SOL community composition in Lake Mondsee (26.4 to 32.0% HAL subcluster) (Fig. 5) was much more stable than the vertical variation (1.0 to 32.0% HAL subcluster).

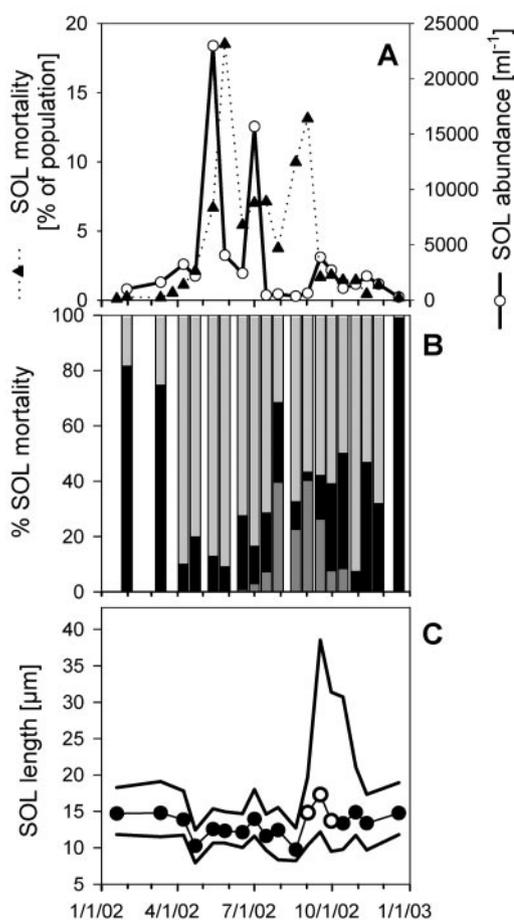


FIG. 2. (A) Estimation of SOL bacteria mortality (as a percentage of the population per day) by mesozooplankton community grazing and SOL bacteria abundances in Lake Mondsee in 2002. (B) Estimated contribution of different metazooplankton groups to SOL mortality. Light gray bars (top) represent the mortality caused by cladocerans with coarse filter meshes (*Daphnia hyalina* and *Eubosmina coregoni*), the dark gray bars (bottom) represent the contribution of cladocerans with fine filter meshes (*Diaphanosoma brachyurum* and *Daphnia cucullata*), and the black bars depict the contribution of the calanoid copepod *Eudiaptomus gracilis*. (C) Length distribution of SOL filaments. Symbols: ●, median length in samples exclusively containing LD2 filaments; ○, median length in samples containing LD2 and HAL filaments. The upper and lower lines depict the 75 and 25% percentiles, respectively, of the SOL length distributions.

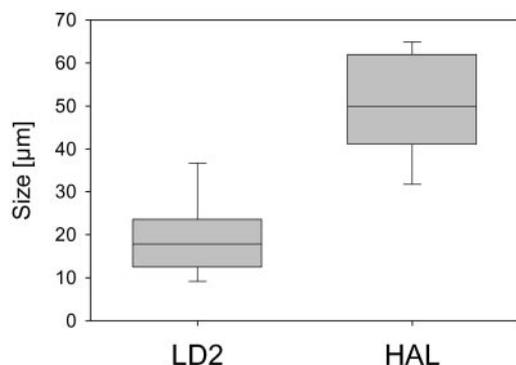


FIG. 3. Box plots depicting length distributions of LD2 and HAL populations in Lake Mondsee. Pooled data from 2002 and 2003 are presented. The 10th, 25th, 75th, and 90th percentiles and the medians are shown.

Between-lake variability of SOL communities. Sampling of freshwater lake ecosystems surrounding and connecting to Lake Mondsee in September 2003 resulted in larger between-lake differences in SOL community composition (see Table S1 in the supplemental material). In Lake Eibensee only members of the LD2 subcluster were found, while the samples from all other lakes contained members of both subclusters (Fig. 5). Despite the separation of the sampling sites of Lake Attersee by 20 km, the two samples from this lake displayed surprisingly similar values of total SOL numbers (0.3×10^4

SOL filaments ml^{-1} in both samples) and subcluster frequencies (9 and 10% HAL).

Besides the above-presented investigation (Fig. 5) the five lakes were also sampled at eight dates in the period of May to September during the years 2002, 2003 and 2004 (see Table S1 in the supplemental material). In all of the 18 samples members of the SOL cluster were present (see Fig. S2 in the supplemental material). Although bacteria of the LD2 subcluster were present in all samples, HAL subcluster bacteria were only found in six samples (33.3%) and were again absent from all of the samples from the headwater Lake Eibensee. All other lakes contained members of the HAL subcluster in various quantities in at least one of the samples taken. Of eight samples taken in the months August and September five (63%) contained bacteria of the HAL subcluster, while of ten samples taken from May to July only one sample (Lake Irrsee, 21 June 2004) was HAL positive (only 1% of the SOL cluster community). These observations indicate that the HAL bacteria showed in all four larger lakes a high seasonality with occurrence only in a short period during late summer and early autumn. In contrast, this group of bacteria seemed to be absent from the smaller, montane Lake Eibensee.

Grazing impact of protists. A previous investigation demonstrated that not all filamentous bacteria are resistant to protistan predation (37). Therefore, we needed to verify the previously assumed protection of LD2 bacteria against protistan predation (24) by experimental investigations. Laboratory grazing experiments with three axenic protistan cultures

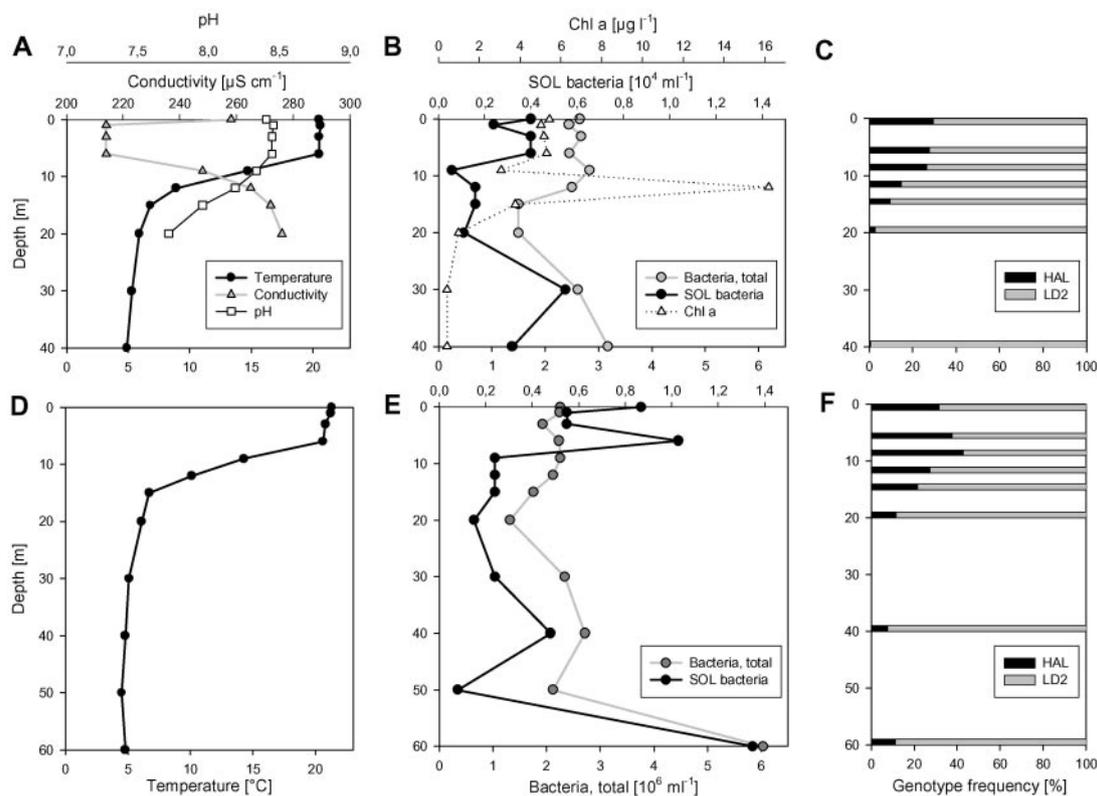


FIG. 4. Depth profiles of Lake Mondsee from September 2003. Samples were taken from 0 to 40 m (A, B, and C) and 0 to 60 m (D, E, and F), respectively. (A and D) Temperature, pH, and conductivity. (B and E) Total bacterial numbers, SOL bacteria numbers, and chlorophyll *a*. (C and F) Composition of SOL cluster community.

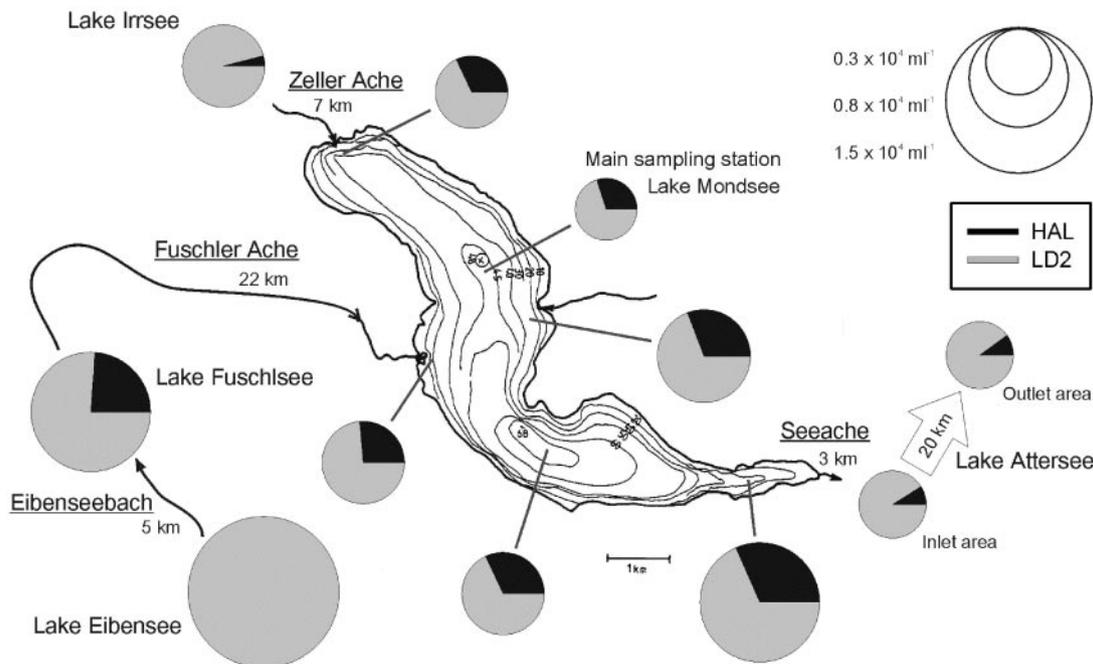


FIG. 5. Abundance and composition of the SOL cluster community in Lake Mondsee and neighboring lakes on 3 and 4 September 2003. All samples were taken at a depth of 1 m. Sampling positions of Lake Mondsee are marked with gray lines. The names of sampled lakes and rivers connecting the lakes (underlined names with distances specified) are given. Arrowheads mark the directions of river flows. The sizes of the pie charts correspond to the total number of SOL bacteria. The scale bar (1 km) is only valid for Lake Mondsee. Sampling sites of Lake Attersee were 20 km apart.

demonstrated that SOL bacteria benefited from the activity of protistan predators (see Table S2 in the supplemental material). Grazing sensitive bacteria (i.e., small and medium sized single cells) were almost completely replaced by grazing-resistant types (floc-forming and filamentous bacteria) in all treatments with predators. The occurrence of these grazing-protected bacterial types resulted in a lack of decrease in total bacterial numbers. In contrast to the total bacterial numbers, the SOL bacteria strongly increased (by 283 to 1,818%) in all treatments with predators during the investigated 14-day period.

Mesozooplankton grazing on SOL filaments. Over the annual cycle of 2002, the three mesozooplankton species *Daphnia hyalina* (41%), *Cyclops abyssorum* (34%), and *Eudiaptomus gracilis* (15%) contributed together 90% of total mesozooplankton biomass. In grazing experiments with five different mesozooplankton species, the cladoceran *D. hyalina* was identified as the most efficient predator on SOL bacteria (ingestion rate [I] = 5,381 ± 428 filaments individual⁻¹ h⁻¹). The cladoceran *Diaphanosoma brachyurum* (I = 1,854 ± 224 filaments individual⁻¹ h⁻¹) and the calanoid copepod *E. gracilis* (I = 1,381 ± 87 filaments individual⁻¹ h⁻¹) were found to feed less efficiently on SOL filaments, whereas the cyclopoid copepods *Cyclops abyssorum* and *Mesocyclops leuckarti* did not decrease SOL bacteria abundances at all. The herbivorous copepod *E. gracilis* was the only investigated species significantly selecting against SOL bacteria in the presence of alternative food. Furthermore, this species was the sole species significantly changing the size distribution of SOL bacteria in the course of the experiment. The copepod removed SOL filaments of >40 μm

almost completely and also reduced filaments in the range of 30 to 40 μm overproportionally. The estimated mesozooplankton community-grazing rate on SOL filaments in Lake Mondsee peaked on 27 May 2002, when a calculated 18.5% of the SOL population were potentially removed by mesozooplankton per day (Fig. 2A). A second peak in grazing activity occurred on 2 September 2002, when 13% of the SOL population was potentially removed by zooplankton grazing per day.

The abundances of SOL, LD2, and HAL showed no significant correlations with the abundances of the investigated zooplankton taxa, as well as no significant correlations with the estimated SOL mortalities caused by the different zooplankton taxa. On the other hand, negative correlations of the average length of SOL filaments with the mortality caused by the copepod *E. gracilis* ($R^2 = 0.24$; $P < 0.05$), as well as with the abundance of *E. gracilis* ($R^2 = 0.27$; $P < 0.05$), were found.

Influence of phytoplankton on SOL bacteria. No correlation was found between the SOL bacteria abundance and the total chlorophyll *a* content in Lake Mondsee. The SOL community dynamics significantly correlated with the dynamics of the phytoplankton group *Chrysophytes* ($R^2 = 0.17$; $P < 0.01$). This group constituted on average 5% of the phytoplankton biovolume in Lake Mondsee during the years 2002 and 2003. Within the *Chrysophytes* the best correlations were found with the species *Dinobryon divergens* ($R^2 = 0.16$; $P = 0.009$; mean, 2.8% of phytoplankton) and *Dinobryon bavaricum* ($R^2 = 0.23$; $P < 0.01$; mean, 0.4% of phytoplankton). From a total of 55 taxa, 6 taxa were identified to significantly correlate with the marked seasonal dynamics of the HAL subcluster ("*Microcystis aeruginosa*" [$R^2 = 0.21$; $P < 0.05$; mean, 0.4% of phytoplankton],

Gomphosphaeria lacustris [$R^2 = 0.16$; $P < 0.05$; mean, 0.003% of phytoplankton], *Aphanitzomenon* sp. [$R^2 = 0.4$; $P < 0.001$; mean, 0.04% of phytoplankton]; *Pseudanabaena catenata* [$R^2 = 0.16$; $P < 0.05$; mean, 0.35% of phytoplankton], *Chrysochromulina parvus* [$R^2 = 0.16$; $P < 0.05$; mean, 0.001% of phytoplankton], and heterotrophic *Katablepharis* cf. *ovalis* [$R^2 = 0.15$; $P < 0.05$; mean, 0.01% of phytoplankton]).

Combined influence of environmental factors on population dynamics. Multiple linear regression analysis considering only the best correlating parameters indicated that pH and chrysophyte biovolume explained together 38% of the variability of the LD2 population during the two investigated years. In the case of the HAL population, the parameters temperature, conductivity, *E. gracilis* abundance (only data for 2002 were available), *M. flos-aquae* biovolume, and *P. catenata* biovolume explain together 82% of the observed variability in 2002. Without the parameter *E. gracilis* abundance, this set of parameters explained 79% of the variability of the HAL population in 2002 but only 32% of the variability in the investigated 2-year period.

DISCUSSION

Pernthaler et al. (24) observed a short-term bloom of LD2 bacteria in a mesotrophic lake in Germany in spring and suggested that the ephemeral blooming was favored by selective predation of bacterivorous protists on bacteria competing with LD2 bacteria and that the blooming was terminated by the grazing of filter-feeding mesozooplankton. In temperate lakes, such a sequence of initially high protistan grazing pressure favoring predation-resistant filamentous bacteria and a later occurrence of high grazing pressure by mesozooplankton is typically occurring during phytoplankton spring blooms and subsequent clear water phases. In principle, this typical succession is also occurring in Lake Mondsee (28) (Fig. 1A and 2), but the mesozooplankton predation in the lake is usually not strong enough to cause a pronounced clear water phase. However, the scenario suggested by Pernthaler et al. (24) can also explain the spring peaks of LD2 in Lake Mondsee (Fig. 1 and 2), but this mechanism would not explain the LD2 and HAL peaks observed later in the annual succession. This seems to indicate that the mechanisms controlling the dynamics of LD2 and HAL populations are more complex as assumed previously. Therefore, we included potential bottom-up factors, i.e., phytoplankton as potential substrate sources, as well as more detailed investigations on potential top-down factors, i.e., specific impacts by different mesozooplankton species, in our study.

Possible factors triggering the dynamics of SOL bacteria. Shaping of bacterioplankton communities is connected to both top-down (e.g., grazing by protists and mesozooplankton) and bottom-up factors (e.g., nutrient availability and phytoplankton bloom events) (9, 13, 17, 32). Höfle et al. (13) studied the dynamics of the bacterioplankton community structure in the eutrophic Lake Plusssee and found strong changes in the overall diversity of the bacterioplankton connected to grazing pressure by zooplankton and associated with the dominance of particular phytoplankton species. Kent et al. (15) and Yannarell et al. (40) described similar influences on bacterioplankton composition. The potential influence of phytoplank-

ton on bacterioplankton communities via the release of DOM is known (7, 13). Our statistical analysis revealed some correlations between phytoplankton taxa and LD2 or HAL bacteria; however, these findings should be interpreted cautiously in terms of potential bottom-up relationships. The observed correlations with the taxa chrysophytes, *Dinobryon*, *Chrysochromulina*, and *Katablepharis* may result from grazing-mediated reduction of bacteria competing with the grazing-resistant SOL bacteria by these mixotrophic or heterotrophic taxa (2, 25). We also observed that the dynamics of six phytoplankton species were correlated with the dynamics of HAL bacteria in Lake Mondsee. A closer look at the dynamics of these potential trigger species revealed that "*Microcystis flos-aquae*" shows several peaks in summer and autumn, which did not match the appearance of HAL filaments. The population dynamics of the other species correlated with the HAL appearance in the year 2003 but did not correlate in 2002. Thus, we did not observe any strong indication for a bottom-up effect mediated by phytoplankton on the SOL bacteria.

Subcluster-specific differences in the ecology of SOL bacteria. Members of the GKS2-217 subcluster, i.e., the third SOL subcluster, were not detected in any of the samples hybridized in the present study. We conclude that members of the GKS2-217 subcluster are not present with detectable numbers in the investigated freshwater ecosystems throughout the year. The most likely complete absence of this subcluster in the investigated hardwater lakes well supports a recently proposed adaptation of the GKS2-217 subcluster to environments with circumneutral pH and low conductivity values (softwater) (30).

The populations of LD2 and HAL bacteria inhabiting Lake Mondsee demonstrated strong seasonal differences. LD2 bacteria were always detectable, whereas the appearance of HAL bacteria was restricted to a short period at the end of the summer. Furthermore, the set of samples from the other investigated lakes seems to indicate that the two populations behave similarly in these habitats to those in Lake Mondsee. Populations of these two groups significantly differed in filament lengths. Larger filament sizes, which were predominantly observed in the HAL population, were preferentially predated by the copepod *Eudiaptomus gracilis*. Although the grazing mortality mediated by this copepod, as well as its abundance was significantly correlated with the length of SOL filaments in Lake Mondsee, no correlation of these parameters with the HAL population was observed. Thus, size selective predation by zooplankton could potentially explain the differences in the population dynamics of LD2 and HAL bacteria; however, the analyzed data set does not strongly support this hypothesis. Furthermore, the two subcluster populations correlated differently with water temperature, conductivity, and pH. These correlations further supported previously proposed differences in ecophysiological adaptations of members of these two subclusters (30) and also indicated that physicochemical parameters may be factors responsible for the differences in the seasonal dynamics of the two closely related populations.

The bacterium *Haliscomenobacter hydrossis*, the only described species within the SOL cluster, is affiliated with the HAL subcluster (29). This species was thus far exclusively reported from wastewater treatment plants (36). Despite a low detection limit for SOL bacteria, *Haliscomenobacter hydrossis* was not detected in selected HAL subcluster-positive samples.

This may indicate that this species is adapted to the hypertrophic and/or more turbulent conditions in wastewater treatment plants and also hints at ecological differentiations even within SOL subclusters.

Spatial variability of SOL bacteria in and between lakes. Horizontal sampling of Lake Mondsee on one day in September 2003 revealed a quite constant genotypic composition of the SOL community (Fig. 5; see Fig. S1C in the supplemental material); however, the variability in SOL abundances was rather high. Thus, the genotype frequencies were independent from total SOL numbers, which could be an effect of unselective top-down factors (e.g., zooplankton grazing). The vertical profiles in Lake Mondsee displayed much more pronounced changes in the compositional structure of the SOL cluster community, pointing to strong changes in growth conditions with depth. Furthermore, the analysis of samples of Lake Mondsee and connected lakes indicate that the spatial variability of the epilimnetic SOL community composition within an ecosystem is much lower than between ecosystems (Fig. 5). Yannarell et al. (41) also found within-lake variability of the composition of bacterioplankton lower than variability between lakes. Lindström (21) studied the bacterioplankton community composition of five mesotrophic lakes and suggested the connectivity of the lakes and therewith the input of allochthonous bacteria by the inlet rivers to be a major structuring factor of bacterioplankton communities. Recently, she concluded that external factors (most likely bacterial import) dominate the control of bacterial community structures in lakes with hydraulic retention times of less than 200 days (22). The lakes investigated in our study, however, possess turnover times of between 470 and 2,600 days. The small inflow to the headwater Lake Eibensee was the only SOL-negative sample in the present study, while the lake contained SOL filaments. In addition, preliminary data suggest that the transport of SOL bacteria via the rivers connecting the studied lakes is limited (unpublished data). Therefore, we expect that the investigated systems harbor distinct bacterioplankton communities, which undergo only minor changes due to the allochthonous input of bacteria by the connecting rivers. The minor connectivity of these systems in regard to the SOL cluster community, together with apparent differences in the trophic status, may explain the differences in abundance and composition of the SOL cluster community in the investigated lakes. Even so, the river input of water and nutrients at different sites in Lake Mondsee may be responsible for a part of the within-lake variations in absolute numbers of SOL bacteria via potential direct (e.g., dilution) or potential indirect effects (e.g., nutrient input).

Pronounced and recurrent seasonality of SOL cluster bacteria in Lake Mondsee. In spite of the fact that the years 2002 and 2003 were remarkably different in climatic conditions, a recurring seasonal development of the SOL cluster community with respect to both abundance and community composition was detected. A recurrent seasonality was also observed for a *Polynucleobacter* subcluster PnecB (*Betaproteobacteria*) population also inhabiting Lake Mondsee (39). For this species-like group the population dynamics was followed over a period of three consecutive years. The observation of recurrent seasonality of two different bacterial groups seems to be noteworthy in the light of studies by Kent et al. (15), Lindström (19), and

Yannarell et al. (40), which did not observe pronounced recurrent seasonality in bacterioplankton communities of freshwater lakes. Although these studies revealed seasonal changes of bacterioplankton community composition, consecutive years were found to be rather different in terms of bacterioplankton community fingerprints. However, the fingerprinting methods applied in those studies (automated rRNA intergenic spacer analysis or denaturing gradient gel electrophoresis) presumably offer a higher taxonomic resolution than does FISH, with probes targeting species-like groups with minimal 16S rRNA gene sequence similarities of ca. 98% (39). This higher taxonomic resolution might result in the detection of different subsets of functionally similar phylotypes present in the lakes in different years, which would result in an overinterpretation of the actual ecological dynamics found in the bacterioplankton communities. Another possible explanation for the high variability in bacterioplankton community composition observed by the fingerprinting methods could be the size and hence the water retention times of the studied lakes, which are, except for Lake Mendota, far below that of Lake Mondsee. Therefore, the bacterioplankton in Lake Mondsee might be much less influenced by allochthonous factors (such as the import of bacteria and substrates) than lakes with shorter water retention times (22).

In conclusion, our study demonstrated that the basic composition of SOL communities is controlled by abiotic factors (related to conductivity and pH). Water chemistry (hardwater versus softwater) mainly determines which of the two vicarious subclusters, i.e., LD2 or GKS2-217, is present in a particular lacustrine habitat. Furthermore, the population dynamics of LD2 and HAL bacteria in Lake Mondsee seem to be differently influenced by water temperature and water chemistry. In addition, top-down influences by mesozooplankton and (indirectly) by protistan grazing are involved in the shaping of the dynamics of SOL bacteria. A strong indication for the involvement of phytoplankton in the bottom-up control of the dynamics of SOL, LD2, or HAL bacteria was not observed. Obviously, detailed knowledge of the substrate spectrum utilized by these bacteria, as well as detailed information of the impact by viruses, are required for a deeper understanding of the dynamics of these important freshwater bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Katrin Teubner for kindly providing phytoplankton data for Lake Mondsee, Qinglong Wu for his support in sampling Lake Mondsee, Matthias Pöckl and Peter Stadler for excellent technical assistance, Ulrike Brandt for sizing of SOL bacteria, Rainer Kurmayer for an introduction to mesozooplankton species identification, and Jens Boenigk for kindly providing protist cultures.

This study was supported by the Austrian Science Fund (project P15655).

REFERENCES

- Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F. O. Glöckner, A. Wille, and R. Psenner. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake using in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2138–2144.
- Bird, D. F., and J. Kalf. 1986. Bacterial grazing by planktonic algae. *Science* **231**:493–495.
- Boenigk, J., P. Stadler, A. Wiedlroither, and M. W. Hahn. 2004. Strain-specific differences in the grazing sensitivity of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5787–5793.
- Crump, B. C., G. W. Kling, M. Bahr, and J. E. Hobbie. 2003. Bacterioplank-

- ton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2253–2268.
5. Eiler, A., and S. Bertilsson. 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ. Microbiol.* **6**:1228–1243.
 6. Einsle, U. 1993. Crustacea, Copepoda: Calanoida und Cyclopoida. Süßwasserfauna von Mitteleuropa, Band 8/4–1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
 7. Fandino, L. B., L. Riemann, G. F. Steward, R. A. Long, and F. Azam. 2001. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquat. Microb. Ecol.* **23**:119–130.
 8. Flössner, D. 1972. Krebstiere, Crustacea, Kiemen- und Blattfüßer, Branchiopoda, Fischläuse, Branchiura. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
 9. Hahn, M. W., and M. G. Höfle. 2001. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**:113–121.
 10. Hahn, M. W., P. Stadler, Q. L. Wu, and M. Pöckl. 2004. The filtration acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J. Microbiol. Methods* **57**:379–390.
 11. Haney, J. F., and D. J. Hall. 1973. Sugar-coated *Daphnia*: a preservation technique for Cladocera. *Limnol. Oceanogr.* **18**:331–333.
 12. Hiorns, W. D., E. A. Methé, S. A. Nierzwickbauer, and J. P. Zehr. 1997. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2957–2960.
 13. Höfle, M. G., H. Haas, and K. Dominik. 1999. Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3164–3174.
 14. International Organization for Standardization. 1992. Water quality—measurement of biochemical parameters—spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration. ISO 10260. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
 15. Kent, A. D., S. E. Jones, A. C. Yannarell, J. M. Graham, G. H. Lauster, T. K. Kratz, and E. W. Triplett. 2004. Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake. *Microb. Ecol.* **48**:550–560.
 16. Kiefer, F. 1978. Das Zooplankton der Binnengewässer. Teil 2, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany.
 17. Langenheder, S., and K. Jürgens. 2001. Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnol. Oceanogr.* **46**:121–134.
 18. Lilljeborg, W. 1982. Cladocera sueciae I u. II. Almqvist & Wiksell, International, Stockholm, Sweden.
 19. Lindström, E. S. 1998. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**:163–174.
 20. Lindström, E. S. 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microb. Ecol.* **40**:104–113.
 21. Lindström, E. S. 2001. Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microb. Ecol.* **42**:598–605.
 22. Lindström, E. S., M. Forslund, G. Algesten, and A.-K. Bergström. 2006. External control of bacterial community structure in lakes. *Limnol. Oceanogr.* **51**:339–342.
 23. Pernthaler, J., F. O. Glöckner, W. Schönhuber, and R. Amann. 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods Microbiol.* **30**:207–226.
 24. Pernthaler, J., E. Zöllner, F. Warnecke, and K. Jürgens. 2004. Bloom of filamentous bacteria in a mesotrophic lake: identity and potential controlling mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6272–6281.
 25. Porter, K. G. 1988. Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiologia* **159**:89–97.
 26. Porter, K. G., and Y. S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**:943–948.
 27. Rosello-Mora, R., and R. Amann. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:39–67.
 28. Salbrechter, M., and H. Arndt. 1994. The annual cycle of protozooplankton in the alpine, mesotrophic Lake Mondsee (Austria). *Mar. Microb. Food Webs* **8**:217–234.
 29. Schauer, M., and M. W. Hahn. 2005. Diversity and phylogenetic affiliations of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1931–1940.
 30. Schauer, M., C. Kamenik, and M. W. Hahn. 2005. Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, *Saprosiraceae*, *Bacteroidetes*). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5900–5907.
 31. Sekiguchi, H., M. Watanabe, T. Nakahara, B. Xu, and H. Uchiyama. 2002. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5142–5150.
 32. Šimek, K., J. Pernthaler, M. G. Weinbauer, K. Hornák, J. R. Dolan, J. Nedoma, M. Mašín, and R. Amann. 2001. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2723–2733.
 33. Teubner, K., M. Tolotti, S. Greisberger, H. Morscheid, M. T. Dokulil, and H. Morscheid. 2003. Steady state phytoplankton in a deep pre-alpine lake: species and pigments of epilimnetic versus metalimnetic assemblages. *Hydrobiologia* **502**:49–64.
 34. Urbach, E., K. L. Vergin, L. Young, A. Morse, G. L. Larson, and S. J. Giovannoni. 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultraligotrophic crater lake. *Limnol. Oceanogr.* **46**:557–572.
 35. Van Veen, W. L., D. van der Kooij, E. C. W. A. Geuze, and A. W. van der Vlies. 1973. Investigations of the sheathed bacterium *Haliscomenobacter hydrossis* gen.n., sp.n., isolated from activated sludge. *Antonie Leeuwenhoek* **39**:207–216.
 36. Wagner, M., R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer, and K. H. Schleifer. 1994. Identification and in situ detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**:405–417.
 37. Wu, Q. L., Boenigk, J., and M. W. Hahn. 2004. Successful predation of filamentous bacteria by a nanoflagellate challenges current models of flagellate bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:332–339.
 38. Wu, Q. L., and M. W. Hahn. 7 March 2006, posting date. Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microbiol. Ecol.* [Online.] doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00105.x.
 39. Wu, Q. L., and M. W. Hahn. High predictability of the seasonal dynamics of a species-like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake. *Environ. Microbiol.*, in press.
 40. Yannarell, A. C., A. D. Kent, G. L. Lauster, T. K. Kratz, and E. W. Triplett. 2003. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microb. Ecol.* **46**:391–405.
 41. Yannarell, A. C., and E. W. Triplett. 2004. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:214–223.
 42. Zwart, G. J. M., B. C. Crump, M. Ageton, F. Hagen, and S. K. Han. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:141–155.

Siliceous algae-based seasonal temperature inference and indicator pollen tracking ca. 4,000 years of climate/land use dependency in the southern Austrian Alps

Roland Schmidt · Christian Kamenik ·
Monika Roth

Received: 9 June 2006 / Accepted: 28 November 2006 / Published online: 8 May 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Diatom and chrysophyte cyst-based reconstructions of the dates of spring and autumn lake-mixing enabled us to estimate spring (ST_{anom}) and autumn (AT_{anom}) temperature anomalies as well as ice-cover of the last ca. 4,000 years in a lake sediment core (Oberer Landschitzsee, 2,076 m a.s.l.) from the southern slopes of the Austrian Central Alps. The two independently inferred temperature anomalies were significantly correlated. On average, spring and autumn temperatures were lower during the two millennia B.C than during 0–1,300 A.D. Marked spring and autumn temperature minima occurred at about 1,300 and 600 B.C. At about 1,300 A.D, ST_{anom} declined again. Spring-temperature anomalies during Roman and Medieval times equaled or slightly exceeded the modern values and paralleled tree-line and glacier fluctuations. The de-coupling of autumn and spring climates, which began during the Medieval period, might indicate changes in major circulation modes. It was assumed that the North-Atlantic influence, triggering winter-rain climate in the

Northern Mediterranean, became weaker during Medieval times, resulting in a trend towards warmer autumns and overall more continental climate conditions in the study area. Four pulses of land use, inferred from indicator pollen, occurred during (1) the Early to Late Bronze, (2) the transition from Late Bronze to Early Iron Age (Hallstatt), (3) Late Iron Age (La Tène, Celtic time) to Roman times, and (4) during high to late Medieval times. Climate seemed to be an important, though complex, trigger of Alpine land use.

Keywords Diatoms · Chrysophyte stomatocysts · Alpine lake · Lake mixing · Air temperature anomalies · Ice-cover · Pollen tracers · Land use

Introduction

Climate change considerably affected settlement and land-use activities of pre-historic and historic European societies (van Geel et al. 1996; Maise 1998; deMenocal 2001). Similarly, Alpine climate and land use are connected (Kamenik et al. 2000; Hausmann et al. 2002). During warm periods, pastures extended to higher elevations. Humid and cold climate increased losses of harvest and domesticated animals. Tinner et al. (2003) stressed, however, the complexity of the climate/land-use dependency.

The southern Austrian Alps lie in a transition zone between the central European and the

R. Schmidt (✉) · M. Roth
Institute of Limnology, Austrian Academy of Sciences,
Mondseestraße 9, 5310 Mondsee, Austria
e-mail: roland.schmidt@oeaw.ac.at

C. Kamenik
Institute of Plant Sciences, University of Bern,
Altenbergrain 21, 3013 Bern, Switzerland

Mediterranean climate (Auer et al. 2005; Böhm 2006). Winter climate in the Alps is affected by the North Atlantic Oscillation (NAO) (e.g. Beniston and Junco 2002). Mediterranean climate is mainly characterized by winter-rain pattern and warm and dry summers. The so-called Genua depression of the northern Mediterranean is mainly active from autumn until spring and its impact on the southern Alps can vary (Auer et al. 2001; Böhm et al. 2001, 2003; Kaiser et al. 2001; Casty et al. 2005; Böhm 2006). Hence, climate proxies are needed that can infer seasonal autumn to spring climates. Most of the terrestrial (glaciers, tree-line, tree-rings) and aquatic (midges) proxies that were used for climate reconstruction in the Alps are, however, controlled by summer temperatures (e.g. Wick and Tinner 1997; Nicolussi and Patzelt 2000; Tinner and Ammann 2001; Tinner and Theurillat 2003; Heiri et al. 2003; Nicolussi et al. 2004, 2005; Büntgen et al. 2005; Frank and Esper 2005).

Diatoms and resting stages of chrysophytes (stomatocysts or simply cysts) show seasonal (Siver and Hamer 1992; Rautio et al. 2000; Smol and Cumming 2000; Kamenik et al. 2001; Catalan et al. 2002) and altitudinal (Lotter et al. 1997; Heegaard et al. 2006) distribution patterns. Recently, diatoms and cysts were shown to be indicators for autumn and spring temperatures in relation to lake stratification and mixing (Schmidt et al. 2004a; Kamenik and Schmidt 2005a; Köster and Pienitz 2006). Snow-height and snow cover duration (summarized as snow-pack) play an important role in Alpine environments (Beniston et al. 2003). They are linked to large-scale climate forcing (Beniston 1997; Hantel et al. 2000). Pollen abundance variation of *Alnus viridis* (Chaix) DC. appeared to be a good indicator of snow-pack and the duration of snow-cover (Schmidt et al. 2002, 2006). *Fagus* L., which does not tolerate late frost, at present is excluded from the sub-continental, snow-poor, inner-alpine study area of Lungau, Niedere Tauern, (Gams 1931/32; Kilian et al. 1994). Under these climate conditions, *Larix* Mill. is common at timberline. Indicator pollen of herbs and the total percentage of herbs (non-arboreal pollen = NAP) are commonly used to track land-use changes in the Alps (e.g. Drescher-Schneider 2003; Tinner et al. 2003).

In the Austrian Alps, pollen records indicate that humans have been present at high altitudes since Neolithic times (Öggel 1994). Pollen records were supported by the discovery of the Tyrolian Ice-Man (Bortenschlager and Öggel 2000) and by archaeological findings from high altitudes nearby the study area (Hebert 2003; Mandl-Neumann and Mandl 2003). Pollen of anthropophytes occurred in the Niedere Tauern first during Neolithic times and increased in abundance during the Bronze Age (Bortenschlager 1967; Kral 1981, 1985; Krisai 1991; Brosch 2000; Schmidt et al. 2002; Drescher-Schneider 2003).

In the present study we combine seasonal (spring, autumn) climate reconstructions based on siliceous algae and pollen tracers from an Alpine lake-sediment core to evaluate climate impact on Alpine land use during the last 4,000 years. We compare our results with those from another lake in the drainage area (Unterer Landschitzsee, 1,778 m a.s.l.), with the local history, and with other climate proxies on Alpine and Northern Hemispheric (e.g. von Grafenstein et al. 1998, 1999) scales.

Study site

Oberer Landschitzsee (ObLAN, 2,076 m above sea level; 47°14' 52" N/13°51' 40" E) is located in Lungau (Fig. 1) at the southern slopes of the Austrian Central Alps (Niedere Tauern). The lake lies slightly above the present tree-line, which is formed by *Pinus cembra* L., associated with *Larix decidua* Mill. and shrubs of *P. mugo* Turra and *Alnus viridis*. Cattle and horse pastures currently extend to ca. 1,900 m a.s.l. At higher altitudes they are replaced by sheep. Thompson et al. (2005) showed that ObLAN's summer epilimnion-water temperature follows the usual altitude/air temperature relation illustrated by Livingstone and Lotter (1998).

Methods

A sediment core (ObLAN) was sub-sampled (1 cm³ of fresh material) in 1 and 2 cm intervals for diatom, chrysophyte cyst, and pollen analyses. For details on coring of ObLAN, AMS ¹⁴C dating and preparation techniques see Schmidt et al.

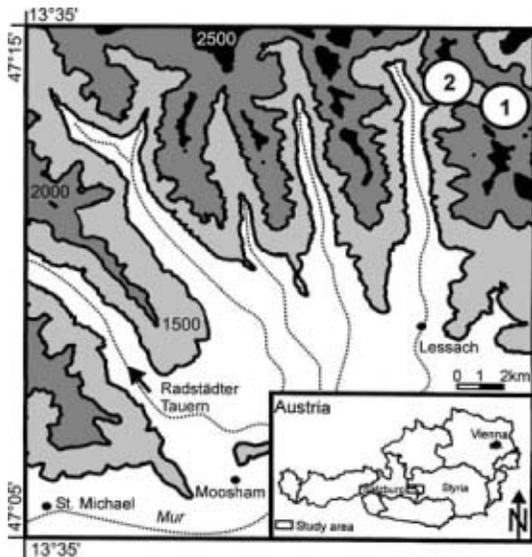


Fig. 1 Contour-map of the study area Lungau (the insert shows its position in Austria) with the location of Lake Oberer Landschitzsee (1) and the reference site Unterer Landschitzsee (2), the Mur tributary-river system (dotted), villages (mentioned in the text) and the main road crossing the Central Alps (Radstätter Tauern, arrowed). Black areas indicate elevations >2,500 m

(2004a) and Kamenik and Schmidt (2005a, b). All given dates are calibrated calendar years before (B.C) and after Christ (A.D), calculated with the age/depth model of Heegaard et al. (2005). Diatoms (500 valves per sample) and pollen (minimum 500 grains) were counted using a light microscope (Leitz “Diaplan”). Chrysophyte cysts (200 per sample) were counted by scanning electron microscopy (Jeol JSM-35) equipped with an image analyzing system (QUANTEL Crystal) (Kamenik and Schmidt 2005b). Diatom taxonomy followed Krammer and Lange-Bertalot (1986–1991, 2000) and Krammer (2000). For chemical treatment of the pollen samples and pollen identification see Schmidt et al. (2002). For plants identified by pollen, we used the taxonomic list from Ehrendorfer (1973). Cyst types were determined according to Facher and Schmidt (1996), Duff et al. (1995), Wilkinson et al. (2001), and Kamenik et al. (2001, 2005).

The diatom-based “date of autumn mixing” (A_{mix}) and the stomatocyst-based “date of spring mixing” (S_{mix}) inference models were described in detail by Schmidt et al. (2004a) and Kamenik and Schmidt (2005a), respectively. A_{mix} and S_{mix} (given

in Julian days) were calculated using the program C2 (Juggins 2003). Reconstructed A_{mix} and S_{mix} were converted into corresponding altitudes using simple empirical models that were derived from a lake survey on 45 mountain lakes (Schmidt et al. 2004b; Thompson et al. 2005): $\text{Altitude} = 6855 - 16.324 * A_{\text{mix}}$ ($R^2_{\text{adj}} = 0.34$, $P < 0.001$); $\text{Altitude} = 2441 - 3.47 * 10^{10} * S_{\text{mix}}^{-3.6}$ ($R^2_{\text{adj}} = 0.88$, $P < 0.001$). Altitudes were transformed into temperature anomalies assuming a constant lapse-rate of 5°C km^{-1} (Agustí-Panareda and Thompson 2002); inferences for the surface sediments were used as reference temperatures. Potential errors of the inferred T_{anom} signals result from (1) the errors of prediction of the diatom and chrysophyte-cyst models and (2) the conversion of S_{mix} and A_{mix} into altitude-dependent air temperature anomalies. Hence, the estimations are discussed in the context with other climate proxies. Thermistor measurements from the 45 mountain lakes showed that ice-on (freeze) and ice-out dates were highly correlated with the dates of autumn and spring mixing, respectively ($R = 0.76$ and 0.95 , respectively, $P < 0.001$). Hence, we estimated “ice-cover” as duration (in days) between A_{mix} and S_{mix} ($365 - A_{\text{mix}} + S_{\text{mix}}$). For the comparison of ST_{anom} with oxygen isotopes ($\delta^{18}\text{O}$) from Greenland ice-cores we used the GRIP data set (<ftp://ftp.ncdc.noaa.gov/pub/data/paleo/icecore/greenland/summit/grip/isotopes/grip18o.txt>; Dansgaard et al. 1993; Grootes et al. 1993; Johnsen et al. 1997).

We summarized pollen percentages of *Cirsium* Mill., *Plantago* L. (*P. major/media* and *lanceolata* types), *Rumex* L. and *Urtica* L. as anthropophytes and used their sum together with Cerealia, Poaceae, and the total of the non-arboreal pollen (NAP) as indicators for land use. *Calluna* Salisb. and Chenopodiaceae naturally occur in alpine plant communities. Since they can, however, expand during land use, they were also included into the sum of anthropophytes. *Pteridium* Scop. spores were excluded from this sum. NAP commonly reflect more local vegetation than arboreal pollen. At Unterer Landschitzsee, up to 40% of arboreal pollen originated from lower altitudes (Schmidt et al. 2002). Hence, long-distance pollen transport (including anthropophytes) from lower altitudes cannot be excluded at Oberer Landschitzsee, although the valley is bordered by steep mountain ranges.

Diatom and chrysophyte cyst stratigraphies were plotted in Tilia*Graph (Grimm 1992). Stratigraphic zones were established with the optimal sum of squares partitioning method (Birks and Gordon 1985) as implemented in the computer program ZONE (Lotter and Juggins 1991). The significance of zone boundaries was assessed with the broken-stick model (Bennett 1996). Time series were smoothed by locally weighted regression (Cleveland and Devlin 1988) using the LOESS smoother implemented in the program SigmaPlot 2000. For Principal Component Analysis (PCA) of pollen assemblages we used Canoco version 4.5. (ter Braak and Šmilauer 2002).

Results

Diatom stratigraphy

Two-hundred diatom taxa were identified, of which 80 occurred with an abundance >1% in at least one sample. Five stratigraphic zones were significant (Fig. 2).

Zone 1 (ca. 2,000–1,300 B.C): *Aulacoseira alpigena* (Grunow) Krammer dominated (20–37%). It was associated with *Achnanthes levanderi* Hustedt (<6 μm) (5–15%), *Achnanthes minutissima* Kützing, *Navicula laevissima* Kützing, *Navicula pupula* Kützing, and various *Pinnularia* taxa with an abundance between 2% and 10%.

Zone 2 (ca. 1,300–400 B.C): *A. levanderi* (< 6 μm) (10–20%) prevailed.

Zone 3 (ca. 400 B.C–200 A.D): *Achnanthes subatomoides* (Hustedt) Lange-Bertalot & Archibald (5–12%), *N. laevissima* and *N. pupula* (10–20%) became abundant.

Zone 4 (ca. 200–1,900 A.D): *A. alpigena* increased towards the top. Additionally, several species were encountered that ranged between 2% and 15%, such as *Aulacoseira lirata* (Ehrenberg) Ross, *A. alpigena*, *Achnanthes marginulata* Grunow, *A. levanderi*, *A. minutissima*, *A. subatomoides*, *N. laevissima* and *N. pupula*.

Zone 5 (ca. 1,900 A.D until present): *A. alpigena* dominated again (up to 25%), associated with *Aulacoseira distans* var. *nivalis* (W. Smith) Lange-Bertalot (10%). *Achnanthes kuelbsii* Lange-Bertalot (10%), *Fragilaria delicatissima* (W. Smith) Lange-

Bertalot and *F. exiguiformis* Lange-Bertalot (<30 μm), and *Pinnularia anglica* Krammer became more abundant (3–12%).

Chrysophyte cyst stratigraphy

Sixty-eight cyst types were distinguished, of which 27 occurred with an abundance >3% in at least one sample. Six stratigraphic zones were significant (Fig. 3).

Zone 1 (ca. 2,000–600 B.C): ST 13 prevailed (20–30%). Types without ornamentation (regular pore, 5.3–8.8 μm), ST42, ST114c+d and ST210 were frequent (10–45%, 5–14%, 3–14% and 5–12%, respectively).

Zone 2 (ca. 600 B.C–300 A.D): Types without ornamentation (regular pore, 3.3–5.3 μm) were dominating.

Zone 3 (ca. 300–250 B.C): ST13 had a low abundance and ST210 increased.

Zone 4 (ca. 100–1,900 A.D): ST13 re-appeared and types without ornamentation (regular pore, 3.3–5.3 μm) decreased.

Zone 5 (ca. 1,900 A.D until present): Types without ornamentation (regular pore, 3.3–5.3 μm), ST55, ST84 and ST113 increased.

Dates of spring and autumn mixing, ice-cover and mean air-temperature anomalies

The date of spring mixing (S_{mix}) varied within 20 days throughout the 4,000 years. This corresponds with an inferred mean spring air temperature change of 1.4°C. S_{mix} was earliest from 0 to 1,400 A.D and rose again during the last centuries. The inferred mean spring air temperature anomaly (ST_{anom}) showed minima between ca. 1,400 and 1,100 B.C, and around 500 B.C. It declined from ca. 1,400 A.D to present, contrasting higher values between ca. 200 and 1,400 A.D. Variation of A_{mix} (AT_{anom}) paralleled S_{mix} (ST_{anom}) during the first two millennia B.C. The independently inferred time series of ST_{anom} and AT_{anom} were significantly correlated (bootstrapped Pearson's r 95% confidence interval: 0.2–0.5), taking into account serial autocorrelation (Mudelsee 2003). During the last two millennia, A_{mix} (AT_{anom}) increased towards present (Fig. 4). Duration of ice-cover varied within 25 days. It was highest between ca. 1,300 and 1,100 B.C and lowest between ca. 200 and 1,300 A.D (Fig. 4).

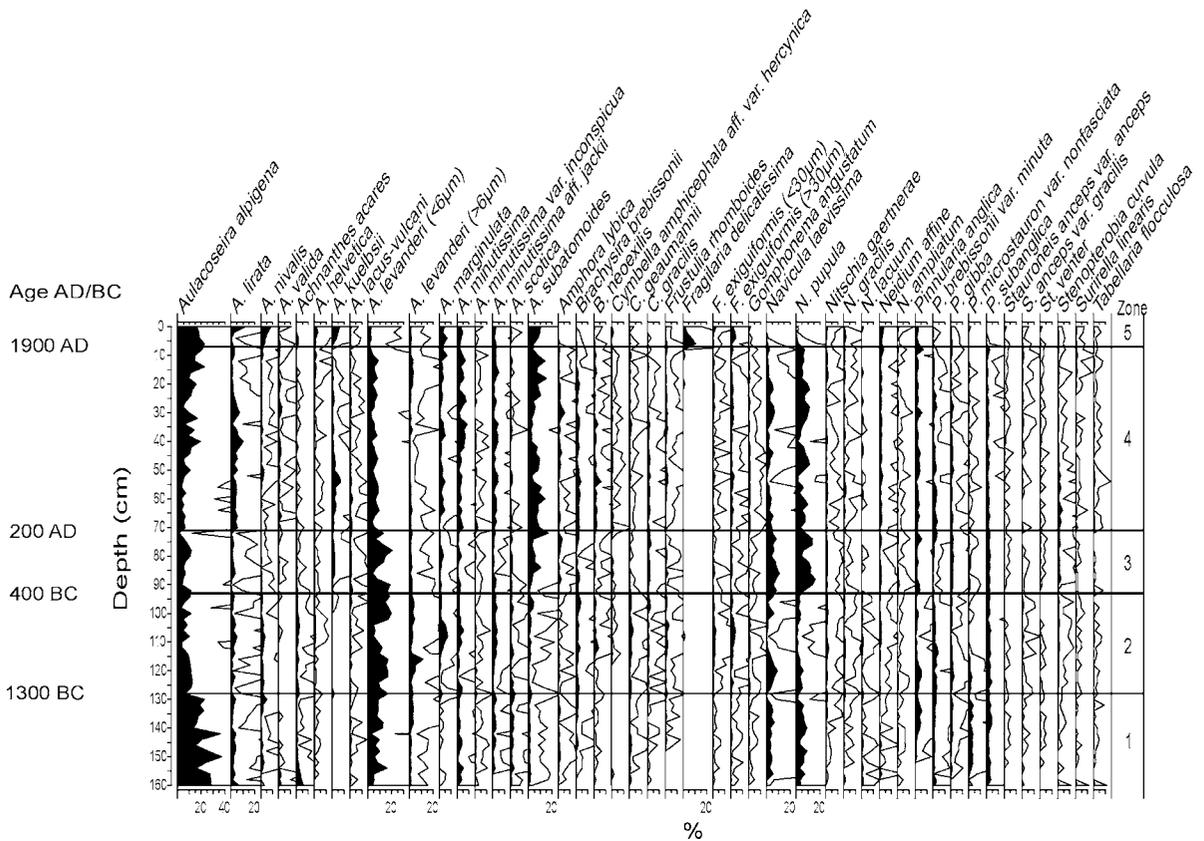


Fig. 2 Diatom percentage diagram of the sediment core ObLAN spanning the last ca. 4,000 years. The significant zones with their calibrated ages before (B.C) and after (A.D) Christ are indicated

Indicator pollen

NAP (maximum % 38), Poaceae (maximum % 20) and anthropophytes (maximum % 4.3) showed similar long-term trends. Their abundance was highest during the last millennium. During the same time Cerealia (<1%) and Larix (maximum % 1.8) had frequent occurrences, whereas Fagus (maximum % 7.5) decreased. Alnus viridis (maximum % 16) followed trends in anthropophytes, peaking around ca. 1,700 B.C, 800 B.C, 100 A.D, and 1,300 A.D (Fig. 4).

Discussion

Comparison between spring and autumn temperatures

Estimated autumn-temperature anomalies fluctuated within a narrower range than estimated spring-

temperature anomalies. The smaller amplitude of AT_{anom} was probably caused by lower R²_{boot} of the diatom-based A_{mix} inference model and lower R²_{adj} of the AT_{anom} regression model (compare with Esper et al. 2005). In addition, the planktonic chrysophytes might have responded more sensitively to short-term fluctuations than the diatom assemblages, which were dominated by benthic species. Until Medieval times, parallel trends of spring and autumn temperatures suggested that diatoms and chrysophytes responded to the same climate forcing (see discussion below).

Comparison of our results with other climate proxies on Alpine and Northern Hemispheric scales

During the two millennia B.C, estimated spring temperature anomalies and GRIP δ¹⁸O showed similar long-term trends, except from 1,200 to

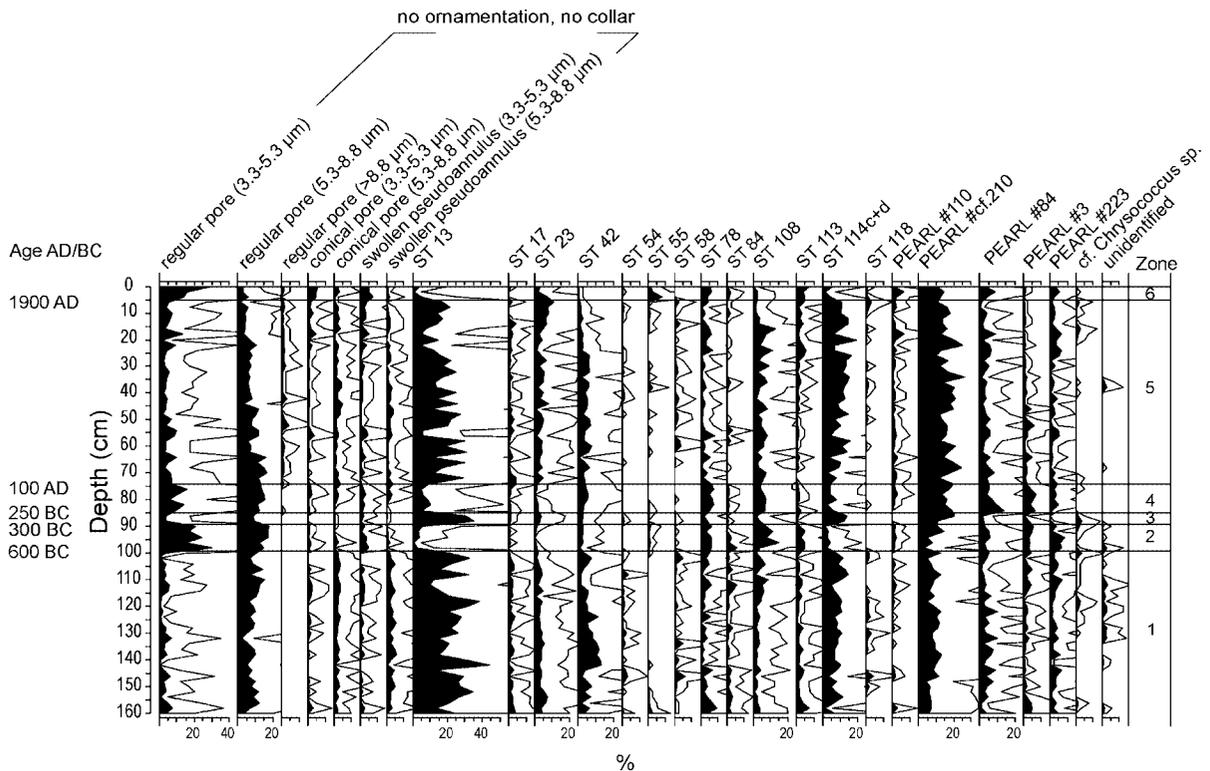


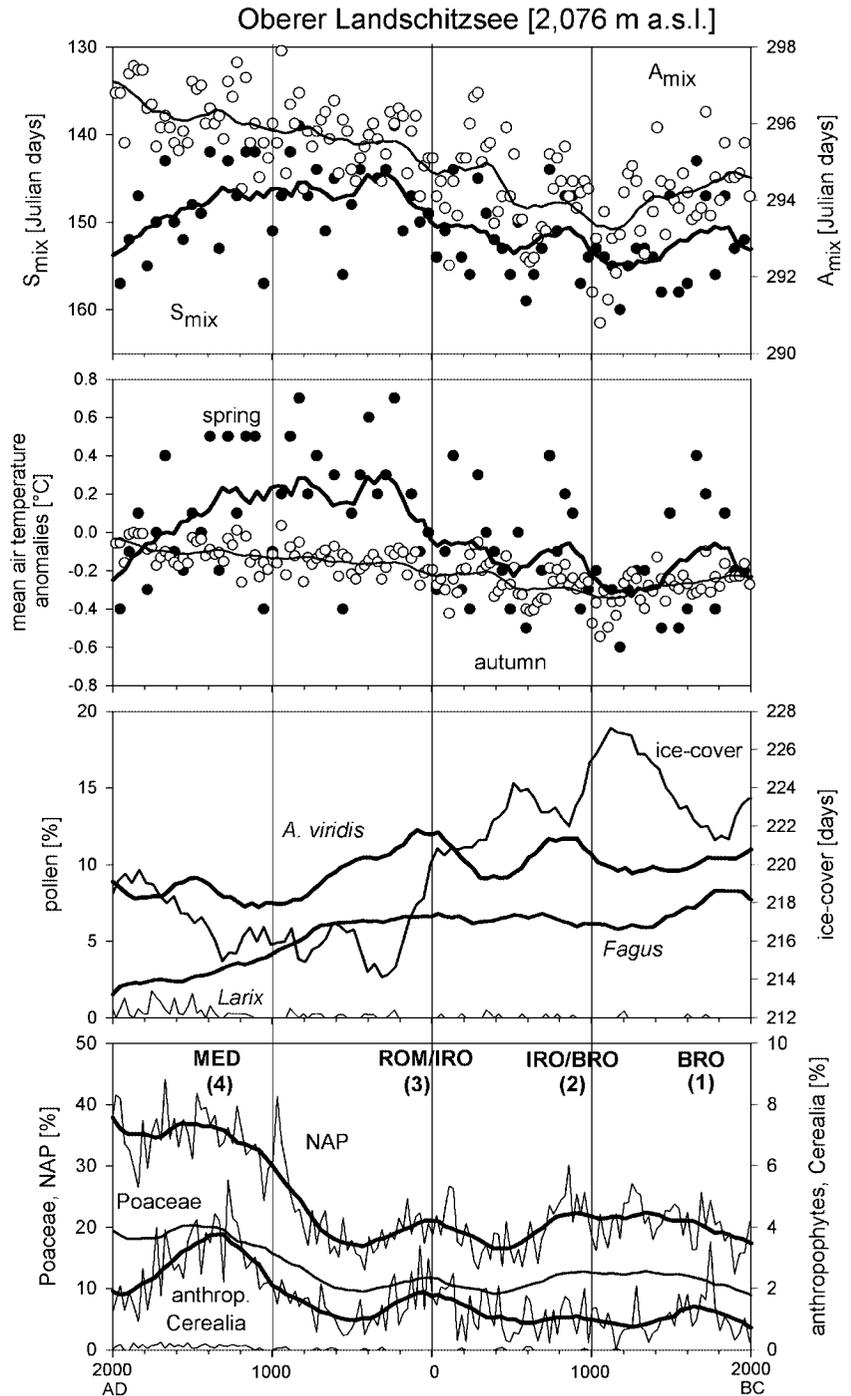
Fig. 3 Chrysophyte cyst percentage diagram of the sediment core ObLAN spanning the last ca. 4,000 years. The significant zones with their calibrated ages before (B.C) and after (A.D)

Christ are indicated. Numbering of cyst types according to Duff et al. (1995, PEARL), Facher and Schmidt (1996) and Kamenik et al. (2001, 2005)

1,000 B.C (Fig. 5). Their short-term fluctuations (GRIP $\delta^{18}\text{O}$ averaged over 50 years) were, however, not significantly correlated ($P > 0.1$). The parallel trends suggested that on centennial-scale they followed a Northern Hemispheric climate pattern. According to Beniston and Jungo (2002), high elevation temperature in the Alps is significantly linked with the Northern Hemisphere zonal circulation. Both AT and ST_{anom} minima at ca. 1,300 and ca. 500 B.C corresponded with GRIP $\delta^{18}\text{O}$ minima, indicating marked climate deteriorations. Low ST_{anom} between ca. 1,500 and 1,000 B.C and ca. 700 to 400 B.C also coincided with the episodes 6 (1,500–1,100 B.C) and 5 (750–350 B.C) of high lake levels in northern Switzerland and the French pre-Alps (Magny 2004). ST_{anom} during these periods equaled ST_{anom} during the Little Ice-Age (LIA, 15th and 19th century) corresponding with a glacier extension in the southern Hohe Tauern during the so-called Lössen Oscillation (ca. 1,500 B.C; Nicoussi and Patzelt 2000): at Frosnitzkees, maximum

glacier extension during this advance exceeded its extension of 1850 A.D by 100–150 m (Patzelt and Bortenschlager 1973). Higher winter precipitation on southern glaciers might have favored larger extensions. Periods of glacier advances are generally cool and humid, with reduced sunshine duration and increased precipitation (Schöner et al. 2000). Increased precipitation in the study area could have been triggered by a southerly drift of the westerly jet-stream system (Magny et al. 2003), as it was assumed for the Holocene climate oscillations (Schmidt et al. 2006), and by enhanced cyclon formation in the Northern Mediterranean. Schmidt et al. (2006) assumed that winter precipitation increased in the southern Alps with the establishment of Mediterranean climate in the northern Adriatic region between ca. 3,000 and 2,000 B.C (Schmidt et al. 2000). This hypothesis is supported by corresponding long-term trends in autumn and spring temperature anomalies during the two millennia B.C suggesting that northern Mediterranean cyclones (e.g. the Genua depression)

Fig. 4 Chrysophyte cyst and diatom-based reconstructions and indicator pollen of the sediment core ObLAN spanning the last ca. 4,000 years. From top to bottom: Chrysophyte cyst inferred date of spring mixing (S_{mix} , inverted y-axis) and diatom inferred date of autumn mixing (A_{mix}) in Julian days; S_{mix} and A_{mix} -based mean spring and autumn air-temperature anomalies in °Celsius; pollen-abundance (%) of *Alnus viridis*, *Fagus*, and *Larix*, and ice-cover (in days); pollen abundance (%) of total non-arboreal pollen (NAP), Poaceae, anthropophytes, and Cerealia. Land-use phases 1–4 are indicated (BRO = Bronze Age; IRO = Iron Age; ROM = Roman Age; MED = Medieval Age). Data were smoothed using LOESS (span = 0.1)



could have been similarly active during autumn and spring. Humid (snow-rich) winter-climate, which contrasted warm summers during climate amelioration (Schmidt et al. 2006), could explain both the on average lower autumn and spring temperatures and

the increased pollen abundances of *Abies* and *Fagus* during the two millennia B.C.

Low ST_{anom} and AT_{anom} between ca. 1,500 B.C. and 0 at ObLAN reflected severe climate oscillations, probably with humid, snow-rich conditions. Minima

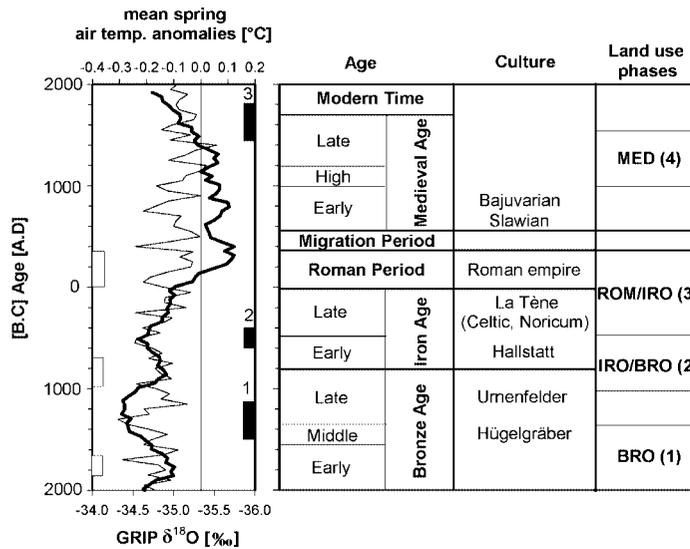


Fig. 5 Overview of ages and cultures (Urban 2000), land use phases 1–4 and inferred mean spring air-temperature (this study, compare with Fig. 4), and oxygen isotopes ($\delta^{18}\text{O}$, running average of 50 years, thinner line) from Greenland ice-cores (GRIP) (Dansgaard et al. 1993; Grootes et al. 1993;

Johnsen et al. 1997) for the last ca. 4,000 years. Major glacier advances in the Tauern area (Nicolussi and Patzelt 2000; 1 = Lössen, 2 = Advances ca. 700–400 B.C., 3 = LIA) and periods with tree-lines higher than 1980 A.D. (Nicolussi et al. 2005; white boxes) are indicated by time-bars

in *A. viridis* pollen coincided with ice-cover peaks between ca. 1,300 and 1,100 B.C. and between ca. 700 and 400 B.C. Prolonged snow-cover and/or high snow-pack during these cold climate conditions probably suppressed flowering of *A. viridis*. Humid conditions between ca. 1,400 and 1,000 B.C. were also indicated by a distinct peak in *Abies* pollen found at nearby Unterer Landschitzsee (Schmidt et al. 2002).

Peaks in ST_{anom} during the Early to Middle Bronze Age, during Hallstatt and Roman times (ca. 200–450 A.D.) corresponded with a tree-line approximating the present (Nicolussi et al. 2005) and glacier retreat in the Austrian Alps (Patzelt 1995; Nicolussi and Patzelt 2000).

AT_{anom} showed a slight but steady increase from Roman to modern times. From ca. 700 A.D. onwards this trend was paralleled by a decrease of *Fagus* (Fig. 4) and *Abies* pointing to a more continental Lungau during Medieval times (Schmidt et al. 2002) and/or clear cutting (increased NAP). The decoupling of autumn and spring temperatures could indicate a change in major circulation mode. We hypothesize that the North-Atlantic influence, e.g. by the North Atlantic Oscillation (NAO), which also triggers winter-rain climate in the Northern Mediterranean, has become weaker in Lungau since Medieval times. Mangini et al. (2001) also assumed changes in

circulation patterns during the last ca. 2,000 years from $\delta^{18}\text{O}$ of Alpine speleothems.

Temperature reconstructions from different proxies of the so-called Medieval Warm Period (MWP, ca. 900–1,400 A.D.) in relation to present global warming are controversial (e.g. Mann et al. 1999; Crowley 2000; Crowley and Lowery 2000; Broecker 2001; Briffa et al. 2002; Bradley et al. 2003; Jones and Moberg 2003; Jones and Mann 2004). Since ST_{anom} accumulates model errors (see methods), at least the minor fluctuations of ST_{anom} during Medieval times range, however, within the error of prediction. Nevertheless, the ST_{anom} -curve corresponded with Alpine tree-ring data. They indicated warm phases similar to present between ca. 850–1,000 A.D. and 1,200–1,300 A.D., followed by climate deterioration at ca. 1,300 A.D., which culminated during LIA (Büntgen et al. 2005). Pla and Catalan (2005) reconstructed altitude anomalies from chryso-phyte cyst assemblages at Lake Redon (2,240 m a.s.l.) in the Pyrenees, which at about 1,000 A.D. approximated present values.

During the past millennium, ST_{anom} varied within 1°C , corresponding with the 1°C amplitude of the 30-year Gaussian low-pass filtered European mean winter temperatures from ca. 1,500 to 1,900 A.D. (Luterbacher et al. 2004). The decrease of ST_{anom} ,

and to a lower range of AT_{anom} , between ca. 1,400 and 1,600 A.D corresponded with the climate deterioration during the Little Ice Age. According to the stomatocysts, ST_{anom} did not increase recently; however, our time resolution (25–50 years) was probably insufficient to resolve the strong short-term fluctuations in Alpine mean spring temperatures during the last 50 years (Böhm et al. 2001; Luterbacher et al. 2004; Auer et al. 2005; Xoplaki et al. 2005). Additionally, other environmental drivers, such as acid rain, could have affected our proxies during more recent times.

Climatic and anthropogenic impacts

With the exception of the Medieval times, the percentage of anthropophytes was <4% of the total pollen sum. Nevertheless, they indicated four pulses of land use. As illustrated in Fig. 4, these occurred during (1) the Early to Middle Bronze Age (ca. 1,800–1,300 B.C), (2) the transition from Late Bronze to Hallstatt times of the Early Iron Age (ca. 1,000–500 B.C), (3) the Late Iron Age (La Tène, Celtic time) and the Roman period (ca. 0–200 A.D), and (4) the High to Late Medieval periods (ca. 1,000–1,600 A.D). At about ca. 1,300 to 1,500 A.D land use peaked.

Extended ice-cover from ca. 1,300 to 1,100 B.C and ca. 700 to 400 B.C occurred between the land use phases (1) and (3). A marked peak in the saturated isothermal remanent magnetism (SIRM) at around ca. 1,300 B.C at Unterer Landschitzsee (Schmidt et al. 2002) suggested enhanced erosion. It was followed by a marked change in the total carbon/nitrogen (C/N) ratio, which, together with pollen of anthropophytes, indicated forest clearing during the Late Bronze Age. A charcoal layer from the foundation of an alpine hut at 1,980 m a.s.l. in the adjacent Dachstein Mountains was dated at 1,360 B.C (Mandl 2003) and was associated with pollen indicators of land use (Drescher-Schneider 2003).

Phase (2) of ObLAN, at the transition from Late Bronze to Early Iron Age (Hallstatt), coincided with climate warming and high tree-line (Nicolussi et al. 2005). Although NAP peaked, pollen of anthropophytes were lower than during the Early Bronze Age. The NAP peak could indicate that during climate warming the local vegetation became more dense, whereas the lower numbers of anthropophytes were explained by different land-use types; the use of

natural meadows near tree-line as pastures during Early Bronze Age, and forest clearing (probably by the use of fire) at Unterer Landschitzsee during the Late Bronze Age.

The re-establishment of Alpine land use after the climate deterioration between ca. 700 and 400 B.C corresponded approximately with the invasion of Celtic tribes in the southern Austrian Alps in the 4th century B.C and the following foundation of the kingdom of Noricum at around 200 B.C (Dopsch 1981). Land-use phase (3) culminated during the Roman period, corresponding with maxima in ST_{anom} . A Roman Alpine settlement, found at 1,640 m a.s.l. in the adjacent Dachstein area, also indicated intense Roman high-altitude land use (Mandl 2003). Alpine land use in Lungau was probably associated with trading routes. Archaeological excavations showed a Roman settlement (Immurium, the present village Moosham), probably with Celtic origin, along the Roman road that passed through the Lungau Mur valley (Fleischer and Moucka-Weitzel 1998).

Between Roman and Medieval land use, anthropophytes declined. This decline was associated with the collapse of the Roman epoch (between 488 and 476 A.D) and the subsequent migration of the populations.

The Medieval re-establishment of high-altitude land use after the migration period started between ca. 1,000 and 1,200 A.D, and culminated between ca. 1,300 and 1,500 A.D. The expansion of *Larix* was probably favored by both continental climate conditions and increasing anthropogenic impact at timberline. Clear cutting during the extension of Medieval land use probably weakened the link between ice cover and *Alnus viridis* pollen. The more continental climate resulted in extended warm summers/autumns and less snow and earlier snow-melt. The Medieval Warm Period probably favored the extension of pastures to high altitudes. During phase (4), indicators of nitrophilous plant communities (*Urtica*, *Rumex*), of pastures (*Achillea*-type, *Campanula* L., *Ranunculus* L.), of *Calluna* heathlands (Tinner et al. 1999), of tall-herbs (*Aconitum* L., *Apiaceae* and *Heracleum*-type, Cichoriaceae, *Mentha*-type), of *Pteridium* thickets, and of species-rich meadows (*varia*), gained in importance (Fig. 6). They indicated an increase in high-altitude cattle pasturing, at the expense of sheep and goats, which had commonly

dominated the preceding Roman Alpine land-use phase (Mandl 2003). According to tree-ring records from the Alps (Nicolussi and Patzelt 2000; Büntgen et al. 2005), the Late Medieval land-use phase (4) (between ca. 1,300 and 1,500 A.D) was characterized by a cooling trend that was accompanied by significant inter-decadal climate variation. Hence, land use was decoupled from climate. In Lungau, mining activities boomed during Late Medieval times (von Kürsinger 1853; Mutschlechner 1967; Ortner and Sagmeister 1992). Alpine land use was probably a prerequisite for high-elevation mining activities (up to 2,800 m a.s.l., Katschner 1984) in the upper Lessach Valley. Demographic and political changes might also have affected Alpine land-use. The population increased, and during the 13th century Lungau became part of the archbishopric of Salzburg (Keusch 1948; Klebel 1960; Dopsch 1981; Hübl 1983; Katschner 1984; Ortner and Sagmeister 1992).

From ca. 1,400 A.D onwards, ST_{anom} decreased. This decrease was not paralleled by AT_{anom} . Corresponding with ST_{anom} , anthropophytes declined. At present the upper limit of permanent farming is around 1,400 m a.s.l.; cattle pastures (“Hüttstäten”) extend up to 1,920 m a.s.l. (Mandl 2003).

Conclusions

- (1) During the two millennia B.C and during Roman times, the significantly correlated mean spring and autumn temperatures indicate common climate forcing. Predominant Atlantic climate forcing could explain two cold climate oscillations (ca. 1,500–1,000 B.C and ca. 700–400 B.C), which corresponded with minima in the GRIP oxygen isotopes ($\delta^{18}O$). By triggering winter-rain climate in the Northern Mediterranean, it could explain similar spring and autumn temperatures, which on average were lower during the two millennia B.C.
- (2) Warm periods were inferred for the Early Bronze Age, the transition from the Late Bronze to Early Iron Age, the Roman Period, and Medieval periods between ca. 800 and 1,300 A.D. Roman and Medieval spring warming corresponded with increased Alpine summer temperatures inferred from tree-rings and tree-line. Our estimates of spring temperature

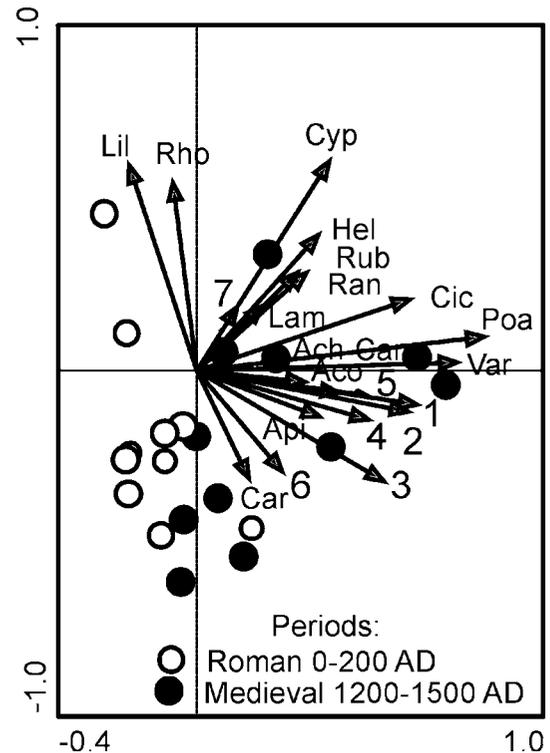


Fig. 6 Principal Components Analysis (PCA) on total non-arboreal pollen percentages (NAP) of the sediment core ObLAN. Only samples of the Roman and High Medieval land use phases and selected pollen types are shown. Anthropophytes: 1 = *Rumex*, 2 = *Plantago*, 3 = *Urtica*, 4 = *Artemisia*, 5 = *Calluna*-type; 6 = Chenopodiaceae; 7 = *Cirsium*. Other herbs: Ach = *Achillea*-type, Aco = *Aconitum*, Api = Apiaceae, Cam = *Campanula*, Car = Caryophyllaceae, Cic = Cichoriaceae, Cyp = Cyperaceae, Hel = *Helianthemum*, Lil = Liliaceae, Poa = Poaceae, Ran = *Ranunculus*, Rho = *Rhododendron*-type, Rub = Rubiaceae, Var = *Varia*

anomalies for the Roman and Medieval warm periods suggested that spring climate was at least as warm as today.

- (3) Autumn and spring climates appeared to have been decoupled since Medieval times. Changes in circulation modes, such as a weakening of the North Atlantic (NAO) impact, might have caused warmer autumns. In sum, the study area has probably become more continental.
- (4) Although climate appeared to be the primary trigger of alpine land use, the relationships were complex. From Early to Late Bronze Age, the type of land use probably changed from natural pastures near tree-line to forest clearing. Unfavorable climate separated the land use phases

(1)–(3). During Medieval land use, which culminated between ca. 1,300 and 1,500 A.D (land-use phase (4), Late Middle Ages), mining, demographic and political changes probably affected high-alpine land use in addition to climate—or even decoupled land use and climate.

Acknowledgements The investigations were funded by the Austrian Science Fund (FWF project No. P14912-B06) and by the Austrian Academy of Sciences research program “Alpenforschung” (project CLIM-LAND). We would like to thank H.J.B. Birks and E. Heegaard (Bergen) for providing the age-depth model; UWITEC Mondsee (R. Niederreiter) for sediment coring; H. Höllner and J. Knoll for their technical assistance; I. Heitzmann, K. Löcker, F. Scharinger for information on the regional history; R. Drescher-Schneider for those on pollen records; R. Böhm and W. Schöner (ZAMG Vienna) on meteorology; K. Nicolussi on Austrian tree-ring and timberline records; the local government of Lessach and the Österr. Bundesforste (Tamsweg) for permissions; A. Lyman for correcting the English.

References

- Agustí-Panareda A, Thompson R (2002) Reconstructing air temperature at eleven remote alpine and arctic lakes in Europe from 1781 to 1997 AD. *J Paleolimnol* 28: 7–23
- Auer I, Böhm R, Brunetti M, Maugeri M, Nanni T, Schöner W (2001) Austrian long-term climate 1767–2000. Multiple Instrumental Climate Time Series from Central Europe (ALOCLIM). *Österr Beitr Metereol Geophys*, Vol 25, ZAMG, Vienna
- Auer I, Böhm R, Jurkovic A, Orlik A, Potzmann R, Schöner W, Ungersböck M, Brunetti M, Nanni T, Maugeri M, Briffa K, Jones P, Efthymiadis D, Mestre O, Moisselin JM, Begert M, Brazdil R, Bochnicek O, Cegnar T, Gajic-Capka M, Zaninovic K, Majstorovic Z, Szalai S, Szentimrey T (2005) A new instrumental precipitation dataset in the greater alpine region for the period 1800–2002. *Int J Clim* 25:139–166
- Beniston M (1997) Variations of snow-depth and duration in the Swiss Alps over the last 50 years links to changes in large-scale climate forcing. *Clim Change* 36:281–300
- Beniston M, Junco P (2002) Shifts in the distribution of pressure, temperature and moisture and changes in the typical weather patterns in the Alpine region in response to the behavior of the North Atlantic Oscillation. *Theor Appl Climatol* 71:29–42
- Beniston M, Keller F, Goyette S (2003) Snow pack in the Swiss Alps under changing climate conditions an empirical approach for climate impact studies. *Theor Appl Climatol* 74:19–31
- Bennett KD (1996) Determination of the number of zones in a biostratigraphical sequence. *New Phytol* 132:155–170
- Birks HJB, Gordon AD (1985) Numerical methods in quaternary pollen analysis. Academic Press, London, pp 317
- Böhm R, Auer I, Brunetti M, Maugeri M, Nanni T, Schöner W (2001) Regional temperature variability in the European Alps: 1760–1998 from homogenized instrumental time series. *Int J Climatol* 21:1779–1801
- Böhm R (2006) Reconstructing the climate of the 250 years of instrumental records at the northern border of the Mediterranean (The Alps). *Nuova Cimento* 29:13–19
- Böhm et al (2003) Der Alpine Niederschlagsdipol ein dominierendes Schwankungsmuster der Klimavariabilität in den scales 100 km – 100 Jahre. 6. Deutsche Klimatagung. *Terra Nostra* 2003/6, pp 61–65
- Bortenschlager S (1967) Pollenanalytische Untersuchungen des Seemooses im Lungau (Salzburg). *Verh Zool-Bot Ges Wien* 107:57–74
- Bortenschlager S, Öggel K (2000) The man in the ice IV the iceman and his natural environment. Springer Humanbiology, Vienna, Austria, pp 164
- Bradley RS, Hughes MK, Diaz HF (2003) Climate in medieval time. *Science* 302:404–405
- Briffa KR, Osborn TJ, Schweingruber FH, Jones PD, Shiyatov SG, Vaganov EA (2002) Tree-ring width and density around the Northern hemisphere part 2 spatio-temporal variability and associated climate patterns. *Holocene* 12:759–789
- Broecker WS (2001) Was the medieval warm period global? *Science* 291:1497–1499
- Brosch U (2000) Pollenanalytische Untersuchungen zur spät- und postglazialen Vegetationsgeschichte am Seetaler See (Salzburg, Lungau). *Mitt Naturwiss Verein Steiermark* 130:169–201
- Büntgen U, Esper J, Frank DC, Nicolussi K and Schmidhalter M (2005) A 1052-year tree-ring proxy for Alpine summer temperatures. *Climatic Dynamics*(<http://dx.doi.org/10.1007/s00382-005-0028-1>) 10.1007/s00382-005-0028-1
- Casty C, Wanner H, Luterbacher J, Esper J, Böhm R (2005) Temperature and precipitation variability in the European Alps since 1500. *Int J Climatol* 25:1855–1880
- Catalan J, Ventura M, Brancelj A, Granados I, Thies H, Nickus U, Korhola A, Lotter AF, Barbieri A, Stuchlik E, Lien L, Bitusik B, Buchaca T, Camamero L, Goudsmit GH, Kopacek J, Lemcke G, Livingstone DM, Müller B, Rautio M, Sisko M, Sorvari S, Sporka F, Strunecky O, Toro M (2002) Seasonal ecosystem variability in remote mountain lakes implications for detecting climatic signals in sediment records. *J Paleolimnol* 28:25–46
- Cleveland WS, Devlin S (1988) Locally-weighted regression an approach to regression analysis by local fitting. *J Am Stat Assoc* 83:596–610
- Crowley TJ (2000) Causes of climate change over the past 1,000 years. *Science* 295:270–277
- Crowley TJ, Lowery ST (2000) How warm was the medieval warm period? *Ambio* 29:51–54
- Dansgaard W, Johnsen SJ, Clausen HB, Dahl-Jensen D, Gundestrup NS, Hammer CU, Hvidberg CS, Steffensen JP, Sveinbjörns-Dottir AE, Jouzel J, Bond G (1993) Evidence for general instability of past climate from a 250-kyr ice-core record. *Nature* 364:218–220
- de-Menocal PB (2001) Cultural responses of climate change during the late holocene. *Science* 292:667–673

- Dopsch H (1981) Aus der Geschichte. In: Müller G (ed) Der Lungau mehr als eine Ferienlandschaft. Gebietsverband Lungau, pp 123
- Drescher-Schneider R (2003) Pollenanalytische Untersuchungen an einem Bodenprofil im Zusammenhang mit dem urgeschichtlichen Brandopferplatz auf dem Sölkpass (1780 m NN Niedere Tauern Steiermark). In: Mandl F (ed) Sölkpass Ein 6000 Jahre alter Saumpfad über die Alpen. ANISA, pp 89–112
- Duff K Zeeb B, Smol JP (1995) Atlas of chrysophycean cysts. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 189
- Ehrendorfer F (1973) Liste der Gefäßpflanzen Mitteleuropas. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp 318
- Esper J, Frank DC, Wilson RJS, Briffa KR (2005) Effect of scaling and regression on reconstructed temperature amplitude for the past millennium. *Geophys Res Lett* 32:L07711
- Facher E, Schmidt R (1996) A siliceous chrysophycean cyst-based pH transfer function for Central European lakes. *J Paleolimnol* 16:275–321
- Fleischer R and Moucka-Weitzel V (1998) Die römische Strassenstation Immurium-Moosham im Salzburger Lungau. *Archäologie in Salzburg*, Bd. 4, pp 320
- Frank DC, Esper J (2005) Characterization and climate response patterns of a high elevation multi species tree-ring network for the European Alps. *Dendrochronologia* 22:107–121
- Gams H (1931/32) Die klimatische Begrenzung von Pflanzenarealen und die Verteilung der hygrischen Kontinentalität in den Alpen. *Z Ges Erdkunde*, Berlin, 9:321–346 and 10:52–56, 178–198
- Grimm C (1992) TILIA 1.11 and TILIA*Graph 1.17. Illinois State Museum, Springfield
- Grootes PM, Stuiver M, White JWC, Johnsen S, Jouzel J (1993) Comparison of oxygen isotope records from the GISP2 and GRIP Greenland ice cores. *Nature* 366:552–554
- Hantel M, Ehrendorfer M, Haslinger A (2000) Climate sensitivity of snow cover duration in Austria. *Int J Climatol* 20:615–640
- Hausmann S, Lotter AF, van Leeuwen JFN, Ohlendorf C, Lemcke G, Grönlund E, Sturm M (2002) Interactions of climate and land-use documented in the varved sediments of Seebensee in the Swiss Alps. *Holocene* 13:477–484
- Hebert B (2003) Archäologische Untersuchungen auf dem Sölkpass Altwege ein hochalpiner urgeschichtlicher Brandopferplatz und weitere Funde von der Steinzeit bis in die Moderne. In: Mandl F. (ed) Sölkpass Ein 6000 Jahre alter Saumpfad über die Alpen, ANISA, pp 49–88
- Heegaard E, Birks HJB, Telford RJ (2005) Relationships between calibrated ages and depth in stratigraphical sequences: an estimation procedure by mixed-effect regression. *Holocene* 15:612–618
- Heegaard E, Lotter A, Birks H (2006) Aquatic biota and the detection of climate change: are there consistent aquatic ecotones? *J Paleolimnol* 35:507–518
- Heiri O, Lotter AF, Hausmann S, Kienast F (2003) A chironomid-based Holocene summer air temperature reconstruction from the Swiss Alps. *Holocene* 13:477–487
- Hübl S (1983) Der Lungau Landschaft Geschichte Kultur. Otto Müller Verlag Salzburg, pp 118
- Johnsen SJ, Clausen HB, Dansgaard W, Gundestrup NS, Hammer CU, Andersen U, Andersen KK, Hvidberg CS, Dahl-Jensen D, Steffensen JP, Shoji H, Sveinbjörnsdóttir AE, White JWC, Jouzel J, Fisher D (1997) The $\delta^{18}\text{O}$ record along the Greenland Ice Core Project and the problem of possible Eemian climatic instability. *J Geophys Res* 102:26397–26410
- Jones PD, Mann ME (2004) Climate over past millennia. *Rev Geophys* 42:1–42
- Jones PD, Moberg A (2003) Hemispheric and large-scale surface air temperature variations an extensive revision and an update to 2001. *J Climatol* 16:206–223
- Juggins S (2003) C2 user guide software for ecological and palaeoecological data analysis and visualisation. University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, pp 69
- Kaiser A, Scheifinger H, Kralik M, Papesch W, Rank D, Stichler W (2001) Links between meteorological conditions and spatial/temporal variations in long-term isotopic records from the Austrian precipitation network. In: H. I.A.E.A. (ed) Study of environmental change using isotope techniques, C&S Paper Series 13/B, IAEA, Vienna, pp 67–77
- Kamenik C, Schmidt R (2005a) Chrysophyte resting stages a tool for reconstructing winter/spring climate from Alpine lake sediments. *Boreas* 34:477–489
- Kamenik C, Schmidt R (2005b) Computer-aided SEM analysis of chrysophyte stomatocysts. *Nova Hedwigia*, Beiheft 128:269–274
- Kamenik C, Agustí-Panareda A, Appleby PG, Dearing JA, Shilland EM, Šporka F, Štefková E, Thompson R (2005) Paleolimnological evidence for atmospheric pollution, climate and catchment-related changes in alpine chrysophyte stomatocyst assemblages (Tatra, Slovakia). *Nova Hedwigia*, Beihefte 128:275–293
- Kamenik C, Koinig KA, Schmidt R, Appleby PG, Dearing JA, Lami A, Thompson R, Psenner R (2000) Eight-hundred years of environmental changes in a high alpine lake (Gossenköllesee, Tyrol) inferred from sediment records. *J Limnol* 59:43–52
- Kamenik C, Schmidt R, Koinig KA, Agustí-Panareda A, Thompson R, Psenner R (2001) The chrysophyte stomatocyst composition in a high alpine lake (Gossenköllesee Tyrol Austria) in relation to seasonality temperature and land-use. *Nova Hedwigia*, Beihefte 122:1–22
- Katschner E (1984) Erlebnis Lungau Kleinod im Salzburger Land. Leopold Stocker Verlag, Graz, Stuttgart, pp 200
- Keusch P (1948) Geschichte des Lungaus. Salzburger Kulturvereinigung, pp 18
- Kilian W, Müller F and Starlinger F (1994) Die forstlichen Wuchsgebiete Österreichs Eine Naturraumgliederung nach waldökologischen Gesichtspunkten. FBVA, Berichte 82, pp 60
- Klebel E (1960) Der Lungau. Gesellschaft Salzburger Landeskunde, pp 212
- Köster D, Pienitz R (2006) Seasonal diatom variability and paleolimnological inferences – a case study. *J Paleolimnol* 35:395–416
- Kral F (1981) Zur postglazialen Waldentwicklung in den nördlichen Hohen Tauern mit besonderer Berücksichti-

- gung des menschlichen Einflusses. Akad Wiss Wien, Sitzungsber Math-nat Klasse Abt I 190:193–234
- Kral F (1985) Zur postglazialen Waldentwicklung in den südlichen Hohen Tauern mit besonderer Berücksichtigung des menschlichen Einflusses. Sitzber Österr Akad Wiss Math-nat Kl Abt I 194:247–289
- Krammer K (2000) The genus *Pinnularia*. In: Lange-Bertalot H (ed) Diatoms of Europe, A.R.G. Gantner Verlag K.G., pp 703
- Krammer K and Lange-Bertalot H (1986–1991) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bacillariophyceae 2/1–4, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Krammer K, Lange-Bertalot H (2000) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bacillariophyceae, Second emended edition. Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Krisai R (1991) Spät- und postglaziale Waldgeschichte des Ost-Lungaus. In: Krisai R, Burgstaller B, Ehmer-Künkele U, Schiffer R and Wurm E (eds) Die Moore des Ost-Lungaus Heutige Vegetation Entstehung Waldgeschichte ihrer Umgebung. Sauteria 5:13–26
- Livingstone DM, Lotter AF (1998) The relationship between air and water temperatures in lakes of the Swiss Plateau a case study with paleolimnological implications. J Paleolimnol 19:181–198
- Lotter AF, Juggins S (1991) POLLPROF, TRAN and ZONE programs for plotting editing and zoning pollen and diatom data. INQUA-subcommission for the study of the Holocene working on data handling methods. Newsletter 6:4–6
- Lotter AF, Birks HJB, Hofmann W, Marchetto A (1997) Modern diatom cladocera chironomid and chrysophyte cyst assemblages as quantitative indicators for the reconstruction of past environmental condition in the Alps. I climate. J Paleolimnol 18:395–420
- Luterbacher J, Dietrich D, Xoplaki E, Grosjean M, Wanner H (2004) European seasonal and annual temperature variability trends and extremes since 1500. Science 303:1499–1503
- Magny M (2004) Holocene climate variability as reflected by mid-European lake-level fluctuations and its probable impact on pre-historic human settlements. Quat Int 113:65–79
- Magny M, Bégeot C, Guiot J, Peyron O (2003) Contrasting patterns of hydrological changes in Europe in response to Holocene climate cooling phases. Quat Sci Rev 22:1589–1596
- Maise C (1998) Archäoklimatologie Vom Einfluss nacheiszeitlicher Klimavariabilität in der Ur- und Frühgeschichte. Jb Schweiz Gesellschaft für Ur- und Frühgeschichte 81:197–235
- Mandl F (2003) Almen im Herzen Österreichs Dachsteingebirge Niedere Tauern Salzkammergut Totes Gebirge. ANISA, pp 312
- Mandl-Neumann H, Mandl F (2003) Der Sölkpass in Geschichte und Gegenwart. In: Mandl F (ed) Sölkpass Ein 6000 Jahre alter Saumpfad über die Alpen. ANISA, 5–43
- Mangini A, Spötl C, Verdes P (2001) Reconstruction of temperature in the Central Alps during the past 2000 yr from a $\delta^{18}\text{O}$ stalagmite record. Earth Planet Sci Lett 235:741–751
- Mann ME, Bradley RS, Hughes MK (1999) Northern Hemisphere temperatures during the past millennium inferences uncertainties and limitations. Geophys Res Lett 26:759–762
- Mudelsee M (2003) Estimating Pearson's correlation coefficient with bootstrap confidence interval from serially dependent time series. Math Geol 35:651–665
- Mutschlechner G (1967) Über den Bergbau im Lungau. Mitt Ges für Salzburger Landeskunde 107:129–168
- Nicolussi K, Patzelt G (2000) Untersuchungen zur Holozänen Gletscherentwicklung von Pasterze und Gepatschferner (Ostalpen). Z Gletsch Glazialgeol 36:1–87
- Nicolussi K, Kaufmann M, Patzelt G, van der Plicht J, Thurner A (2005) Holocene tree-line variability in the Kauner Valley, Central Eastern Alps indicated by dendrochronological analysis of living trees and subfossil logs. Veget Hist Archaeobot 14:221–234
- Nicolussi K, Lumassegger G, Patzelt G, Pindur P and Schiesling P (2004) Aufbau einer holozänen Hochlagen-Jahring Chronologie für die zentralen Ostalpen Möglichkeiten und erste Ergebnisse. In: Innsbrucker Geographische Gesellschaft (ed), Innsbrucker Jahresbericht 2001/02, 16:114–136
- Öggl K (1994) The palynological record of human impact in highland zone ecosystems. In: Biagi P, Nandris J (eds) Highland exploitation in southern Europe. Monograf Nat Bresciana 20:107–122
- Ortner F, Sagmeister R (1992) Lessach im Lungau Geschichte und Gegenwart eines Dorfes. Gemeinde Lessach, pp 383
- Patzelt G (1995) Die klimatischen Verhältnisse im südlichen Mitteleuropa zur Römerzeit. In: Die ländliche Besiedlung und die Landwirtschaft in den Rhein-Donauprovinzen in der römischen Kaiserzeit. Passauer Universitätsschriften zur Archäologie 2:7–20
- Patzelt G, Bortenschlager S (1973) Die postglazialen Gletscher- und Klimaschwankungen in der Venedigergruppe (Hohe Tauern Ostalpen). Z Geomorph N.F. Suppl. Bd. 16:25–72
- Pla S, Catalan J (2005) Chrysophyte cysts from lake sediments reveal the submillennial winter/spring climate variability in the northwestern Mediterranean region throughout the Holocene. Clim Dynam 24:263–278
- Rautio M, Sorvari S, Korhola A (2000) Diatom and crustacean zooplankton communities their seasonal variability and representation in the sediments of subarctic Lake Saanajärvi. J Limnol 59:81–96
- Schmidt R, Kamenik C, Kaiblinger C, Hetzel M (2004a) Tracking Holocene environmental changes in an alpine lake sediment core: application of regional diatom calibration, geochemistry, and pollen. J Paleolimnol 32:177–196
- Schmidt R, Kamenik C, Lange-Bertalot H, Klee R (2004b) *Fragilaria* and *Staurosira* taxa (Bacillariophyceae) from surface sediments of 40 lakes in the central Austrian Alps (*Niedere Tauern*) in relation to environmental variables. J Limnol 63:171–189
- Schmidt R, Kamenik C, Tessadri R, Koinig KA (2006) Climatic changes from 12,000 to 4,000 years ago in the Austrian Central Alps tracked by sedimentological and biological proxies of a lake sediment core. J Paleolimnol 35:491–505
- Schmidt R, Koinig KA, Thompson R, Kamenik C (2002) A multi proxy core study of the last 7000 years of climate

- and alpine land-use impacts on an Austrian mountain lake (Unterer Landschitzsee Nedere Tauern). *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 187:101–120
- Schmidt R, Müller J, Drescher-Schneider R, Krisai R, Szeroczyńska K, Baric A (2000) Changes in lake level and trophy at Lake Vrana, a large karstic lake on the Island of Cres (Croatia) with respect to palaeoclimate and anthropogenic impacts during the last approx. 16,000 years. *J Limnol* 59:113–130
- Schöner W, Auer I, Böhm R (2000) Climate variability and glacier reaction in the Austrian eastern Alps. *Ann Glaciol* 31:31–38
- Siver PA, Hamer JS (1992) Seasonal periodicity of Chrysophyceae and Synurophyceae in a small New England lake implications for paleolimnological research. *J Phycol* 28:186–198
- Smol JP, Cumming BF (2000) Tracking long-term changes in climate using algal indicators in lake sediments. *J Phycol* 36:986–1011
- ter Braak CJF, Šmilauer P (2002) CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user guide software for canonical community ordination (version 4.5). Biometris, Wageningen and Česke Budejovice, pp 500
- Thompson R, Kamenik C, Schmidt R (2005) Ultra-sensitive Alpine lakes and climate change. *J Limnol* 64:139–152
- Tinner W, Ammann B (2001) Timberline paleoecology in the Alps. *PAGES News* 9/3:9–11
- Tinner W, Theurillat JP (2003) Uppermost limit, extent, and fluctuations of the timberline and tree-line ecotone in the Swiss Central Alps during the past 11500 Years. *Arch Alp Res* 35:158–169
- Tinner W, Hubschmid P, Wehrli M, Ammann B, Conedera M (1999) Long-term forest fire ecology and dynamics in southern Switzerland. *J Ecol* 87:273–289
- Tinner W, Lotter AF, Ammann B, Conedera W, Hubschmid P, van Leeuwen JFN, Wehrli M (2003) Climatic change and contemporaneous land-use phases north and south of the Alps 2300 BC to 800 AD. *Quat Sci Rev* 22:1447–1460
- Urban OH (2000) *Der lange Weg zur Geschichte Die Urgeschichte Österreichs Österreichs Geschichte bis 15 v. Chr.* Verlag Ueberreuter, Wien
- van Geel B, Buurman J, Waterbolk HT (1996) Archaeological and palaeoecological indications of an abrupt climate change in The Netherlands and evidence for climatological teleconnections around 2650 BP. *J Quat Sci* 11:451–460
- von Grafenstein U, Erlenkeuser H, Müller J (1998) The cold event 8,200 years ago documented in oxygen isotope records of precipitation in Europe and Greenland. *Clim Dynam* 14:73–81
- von Grafenstein U, Erlenkeuser H, Brauer A, Jouzel J, Johnsen SJ (1999) A mid-European decadal isotope-climate record from 15,50 to 5000 years B.P. *Science* 284:1654–1657
- von Kürsinger I (1853) *Lungau Historisch ethnographisch statistisch aus bisher unbenützten urkundlichen Quellen.* Oberer'sche Buchhandlung, Salzburg, pp 854
- Wick L, Tinner W (1997) Vegetation changes and timber-line fluctuations in the Central Alps as indicators of Holocene climate oscillations. *Arch Alp Res* 29:445–458
- Wilkinson AN, Zeeb B, Smol JP (2001) *Atlas of Chrysophycean cysts, vol II.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 180
- Xoplaki E, Luterbacher J, Paeth H, Dietrich D, Steiner N, Grosjean M, Wanner H (2005) European spring and autumn temperature variability and change of extremes over the last half millennium. *Geophys Res Lett* 32:157–213

Disentangling late-Holocene climate and land use impacts on an Austrian alpine lake using seasonal temperature anomalies, ice-cover, sedimentology, and pollen tracers

Roland Schmidt · Monika Roth ·
Richard Tessadri · Kaarina Weckström

Received: 3 July 2007 / Accepted: 12 November 2007 / Published online: 6 December 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Major and trace elements, minerals and grain-size were analysed from a sediment core covering the last 4,000 years of an Austrian Alpine lake (Oberer Landschitzsee, ObLAN, 2,076 m a.s.l.). These analyses were combined with autumn and spring temperature anomalies and ice-cover estimated from a diatom and chrysophyte cyst, thermistor-based regional calibration dataset and selected pollen markers published previously. Diatom-inferred pH (Di-pH) and DOC (Di-DOC) completed the multi-proxy approach, which, together with ordination techniques (PCA and RDA), helped (1) to confirm proposed climatic patterns and hypotheses, and (2) to disentangle the complex interactions between climatic and anthropogenic impacts. Shifts in chemical and physical weathering, erosion, production, lake stratification, redox potentials and air pollution were the major processes that have affected Oberer Landschitzsee in relation to climate, lake/catchment interactions, and human impact. Geochemistry supported the finding that the four waves of high-altitude land use (Early to Middle Bronze, ca. 1,800–1,300 B.C.; Late Bronze to Hallstatt, ca. 1,000–500 B.C.;

Celtic to Roman, ca. 300 B.C.–400 A.D.; and Medieval, ca. 1,000–1,600 A.D.) were coupled mainly with warm periods. Increased production, onset of lake stratification, and the deterioration of hypolimnetic oxygen conditions were the major changes governing in-lake processes during climate warming. They resulted in specific element assemblages associated with organic matter accumulation (Br), oxygen depletion (As, Ga, Cu, S), and changes in redox (Fe/Mn). The Se/Di-DOC ratio was introduced to track shifts between in-lake production and allochthonous sources. Nutrient loading from pastures, coupled with climate warming, could explain that in-lake production was highest during Roman and Medieval land use. Lithogenic elements mainly originated from chemical weathering of silicate bedrock and they increased when intense land-use was coupled with climate deterioration and/or increased humidity. These perturbations were highest during a High Medieval climate fluctuation around 1,000 A.D. The association of sand with LOI and C/N and the decoupling of sand from quartz and feldspar separates erosion from physical weathering. Di-DOC, S, and C/N showed hybrid characters in relation to climate and human impact. The mineral proportions indicated gradients in relation to weathering, snow-cover and running waters, as well as vegetation. Air pollution by metallurgic industries, starting during the High Medieval and culminating during the Late Medieval, caused lead accumulation and could have contributed to As and S enrichment. Corresponding

R. Schmidt (✉) · M. Roth · K. Weckström
Institute of Limnology, Austrian Academy of Sciences,
Mondseestraße 9, 5310 Mondsee, Austria
e-mail: roland.schmidt@oeaw.ac.at

R. Tessadri
Institute of Mineralogy and Petrography, University
of Innsbruck, Innrain 52, 6020 Innsbruck, Austria

features in the distribution of selected elements and pollen tracers, as well as changes in mineral proportions, supported the hypotheses of shifts in seasonal climate and an overall trend towards more continental climate conditions since Medieval times.

Keywords Alpine lake · Geochemistry and mineralogy · Pollen tracers · Diatom and chrysophyte cyst inference models · Air temperature anomalies · Ice-cover · PCA and RDA

Introduction

When high altitude land use established in the Austrian Alps during the Bronze Age (e.g. Kral 1971, 1985; Oeggl 1994; Schmidt et al. 2002; Drescher-Schneider 2003), climatic and anthropogenic impacts on alpine lakes and their catchments began to overlap. Causes and effects of the various processes are, however, complex and thus difficult to disentangle (e.g. Kamenik et al. 2000; Hausmann et al. 2002). With the construction of inference models for the quantitative reconstruction of climatic and environmental variables and the use of a multi-proxy approach, promising attempts were started for disentangling climatic and human impacts in the study area (southern Austrian Central Alps). Transfer functions based on a calibration data set of diatoms and chrysophyte cyst abundances and thermistor measurements from 45 lakes in the Niedere Tauern (NT) (Schmidt et al. 2004a; Kamenik and Schmidt 2005a) were constructed for the quantitative inference of lake mixing dates. These quantitative inference models, combined with pollen analysis of indicator plants, were applied to a sediment core of Oberer Landschitzsee (ObLAN) in the Austrian Central Alps (Schmidt et al. 2007). From the dates of spring and autumn mixing, temperature anomalies as well as ice-cover duration were estimated. This approach indicated that climate strongly determined high-altitude land use at Oberer Landschitzsee. Four waves of land use were determined during the last 4,000 years by pollen of anthropophytes. With the exception of the Late Medieval, they corresponded with periods of climate warming during Early to Middle Bronze (ca. 1,800–1,300 B.C.), Late Bronze to Hallstatt (ca. 1,000–500 B.C.), Celtic to Roman (ca. 300 B.C.–400 A.D.), and Medieval times (ca. 1,000–1,600 A.D.).

Spring temperature anomalies during Roman and Medieval times equalled or slightly exceeded the modern values. The four waves of alpine land use were separated by strong cooling periods with extended ice-cover, which occurred during the Little Ice-Age (LIA, ca. 1,600–1,850 A.D.), between ca. 700–400 B.C., and which culminated between ca. 1,300–1,100 B.C. The latter probably corresponds to a series of glacier advances in the Austrian Alps during the so-called Löss Oscillation (Patzelt and Bortenschlager 1973; Nicolussi and Patzelt 2000).

Additionally, the climate reconstructions indicated a long-term change in climate. From 2000 B.C. until Roman times, the two independently inferred autumn and spring temperatures were significantly correlated. As winter-precipitation in the southern part of the Austrian Alps commonly is influenced by Northern Mediterranean cyclones (Auer et al. 2005; Böhm 2006), it was interpreted that during this time autumn and spring cyclones have been similarly active resulting in the significant correlation of both temperatures. A decoupling of the trends in spring and autumn temperatures started during the Medieval; during LIA springs became colder than autumns. Changes in major circulation modes were hypothesised as possible driving forces (Schmidt et al. 2007). The North Atlantic Oscillation (NAO) influences winter climate in the Alps (e.g. Hurrell and van Loon 1997; Wanner et al. 2001; Beniston and Junco 2002). Casty et al. (2005) concluded that the Alps are situated in a band of varying influence of the NAO, and that other atmospheric circulation modes could have controlled Alpine temperature and precipitation variability through the Late-Holocene (Wanner et al. 2003; Luterbacher et al. 2004; Xoplaki et al. 2005).

The two major aims of the present study are (1) to confirm the described climatic patterns and hypotheses by the extension of the multi proxy approach (geochemistry, mineralogy, diatom-inferred pH and DOC, and additional pollen markers), and (2) by using these additional proxies to disentangle climatic and anthropogenic impacts.

Study site

The oligotrophic Alpine lake Oberer Landschitzsee (47°14'52" N/13°51'40" E, 2,076 m a.s.l., max depth 13.6 m, lake area 8.8 ha) is located on crystalline

bedrock with mica-schists and metamorphic carbonates at the southern slope of the NT, Lungau (location map illustrated in Schmidt et al. 2006). The lake is located slightly above the present tree line, which is formed by *Pinus cembra*. Scattered dwarf pine (*Pinus mugo*) extend above the timberline, which is formed by *P. cembra*, *Larix*, and *Picea* at about 1,900 m a.s.l. At locations with prolonged snow-cover, green alder (*Alnus viridis*) replaces *P. mugo*. Fir (*Abies*) is rare and beech (*Fagus*) is not present in the mountain forests of Lungau. The lake is surrounded by alpine meadows. The measured (autumn 1998) pH was 7.1, alkalinity was 130 $\mu\text{eq l}^{-1}$, and DOC was 0.69 mg l^{-1} . For details on lake-water chemistry, see Schmidt et al. (2004b; Kamenik and Schmidt 2005a). Thompson et al. (2005) showed that summer epilimnion-water temperatures of Oberer Landschitzsee followed the usual altitude/air temperature relation illustrated by Livingstone and Lotter (1998).

Material and methods

The sediment section from 0 to 156 cm core depth from ObLAN was sub-sampled (1 cm^3 of fresh material) in 1 cm intervals for geochemistry and mineralogy. For details on coring of ObLAN, AMS ^{14}C dating and preparation techniques see Schmidt et al. (2004a) and Kamenik and Schmidt (2005a, b). All given dates are calibrated calendar years before (B.C.) and after Christ (A.D.), calculated with the age/depth model established by Heegaard et al. (2005). A total of 156 sediment samples were analysed for bulk geochemistry, mineralogy and grain-size. Time series were smoothed by locally weighted regression (Cleveland and Devlin 1988) using the LOESS smoother implemented in the programme SigmaPlot 2000 (span for all diagrams = 0.1).

Element analyses, LOI and C/N ratios

The samples were dried at 105°C (used for LOI analysis) and ground with an agate ball mill. Selected major and trace elements (Al, As, Br, Ca, Cl, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Rb, S, Si, Sr, Ti, Y, Zn, Zr) were analysed from 0.5 to 1.5 g dried material with an energy-dispersive miniprobe multi-element analyser (advanced version of EMMA, for detailed description

see Cheburkin and Shotyk 1996; Cheburkin et al. 1997). Concentrations of major elements are given in weight percent and those of trace elements in $\mu\text{g/g}$. For Pb and As concentrations, additionally an enrichment factor (EF; Shotyk 1996) was applied based on Pb/Zr ratios of the pre-anthropogenic background >1,000 A.D (see Koinig et al. 2003).

Loss on ignition (LOI) was determined on dried material (105°C/24 h) after combustion at 500°C and presented as a percentage of dry weight. Weight constancy was obtained after an exposure time of 5 h (see Heiri et al. 2001). Total carbon (C) and nitrogen (N) were analysed (1–2 cm core sample distance) with a Carlo-Erba element analyser on dried material (105°C/24 h). These elements were presented as a weight ratio.

Mineralogy and grain-size analyses

Mineralogy was analysed on air-dried and powdered bulk samples using X-ray diffraction (XRPD, AXS-Bruker D8), calibrated with the Rietveld-based quantitative XRD-software Siroquant[®].

Grain-size fractions (clay <2 μm , silt 2–63 μm , and sand >63 μm) were determined on untreated bulk sediments suspended in Calgon[®] using a Laser-Particle-Analyser (Malvern Mastersizer2000[®]). Each result represents the mean of three single measurements obtained after 3 min ultrasonic disintegration and simultaneous stirring and pumping through the measurement cell.

Diatom and chrysophyte cyst-based climate and environmental reconstructions

Transfer functions were adopted for lake mixing dates (in Julian days) using diatoms and chrysophyte cysts as bio-indicators, continuous water temperature measurements, and weighted averaging regression techniques. The transfer functions were based on percentages of diatoms (surface sediments) and chrysophyte cysts (sediment traps) from 45 lakes in the NT (Austria) and contemporaneous epilimnetic water temperatures. Thermistors exposed in these calibration lakes were used for temperature measurements. The diatom-based “date of autumn mixing” (A_{mix}) and the chrysophyte cyst-based “date of spring

mixing" (S_{mix}) inference models were described in detail by Schmidt et al. (2004a) and Kamenik and Schmidt (2005a), respectively. Reconstructed A_{mix} and S_{mix} were converted into corresponding altitudes using simple empirical models that were derived from a lake survey on 45 mountain lakes (Schmidt et al. 2004a, b; Thompson et al. 2005). Altitudes were transformed into temperature anomalies assuming a constant lapse-rate of $5^{\circ}\text{C km}^{-1}$ (Agustí-Panareda and Thompson 2002); inferences for the surface sediments were used as reference temperatures. Ice-cover duration was estimated as the number of days between A_{mix} and S_{mix} ($365 - A_{\text{mix}} + S_{\text{mix}}$). The NT diatom calibration data set was also used for the inference of dissolved organic carbon (Di-DOC) and pH (Di-pH) (Roth 2006). The prediction power for S_{mix} was highest ($R_{\text{boot}}^2 = 0.85$, $\text{RMSEP}_{\text{boot}} = 9.6$ days), followed by Di-pH (0.72, 0.13) and $\log A_{\text{mix}}$ (0.71, 0.006), and, distinctly lower, Di-DOC (0.38, 0.12). For more details on the different models see Schmidt et al. (2004a, 2007) and Kamenik and Schmidt (2005a).

Pollen tracers

For the chemical treatment of pollen samples see Schmidt et al. (2004a). We used percentages of the indicator pollen *A. viridis*, *Fagus*, *P. cembra* and *Larix*, and anthropophytes. Schmidt et al. (2002, 2004a) assumed that a prolonged and high snow-pack lowers the flowering of *A. viridis*, which forms shrubs mainly on snow-protected slopes. According to Gams (1931/1932), *Fagus* is mainly excluded at present from the continental central Alps because of less humid and snow-rich conditions but increasing frost. The distribution of *Fagus* contrasts with that of *P. cembra* and *Larix*, which characterise continental central Alpine timberline areas that commonly are influenced by humans (e.g. Tranquillini 1979; Kilian et al. 1994). Pollen of *P. cembra* was distinguished according to Klaus (1972, 1975). Pollen of *Cirsium*, *Plantago* (*P. major/media* and *lanceolata* types), *Rumex*, *Urtica* and Chenopodiaceae are commonly used as indicators of human impact and thus were summarised as anthropophytes (Schmidt et al. 2007). Additional pollen-types could also have been related to land use at ObLAN (Schmidt et al. 2007, Fig. 6). However, because of their inconsistency over time

and uncertain relationship to land use, they were not included in the anthropophytes. As additional indicators of alpine meadows we used pollen percentages of Poaceae and the sum of non-arboreal-pollen (NAP).

Numerical procedures

Principal Components Analysis (PCA), an indirect linear ordination technique, was used to summarise major trends in all environmental variables (with the exception of C/N because of different sample intervals): major and trace elements and their ratios, LOI, grain-size fractions (clay, silt, sand), mineral components (quartz, feldspar, chlorite and biotite + illite), selected pollen tracers (*A. viridis*, *Fagus*, *Larix*, *P. cembra*, Poaceae, NAP), and Di-DOC and Di-pH.

Redundancy Analysis (RDA), a constrained linear ordination method, was run with all these variables and mean autumn (TA-Aut) and spring air temperature anomalies (TA-Spr), ice-cover duration (ice-cover), and anthropophytes as explanatory variables. The total explained variance (expressed as percentage) of these forward selected significant explanatory variables was calculated using variance partitioning (Borcard et al. 1992). Forward selection was associated with Monte Carlo permutation tests (999 unrestricted permutations, $p \leq 0.05$) and probability levels were adjusted for Bonferroni inequality. Both analyses were implemented using CANOCO version 4.5 (ter Braak and Šmilauer 2002).

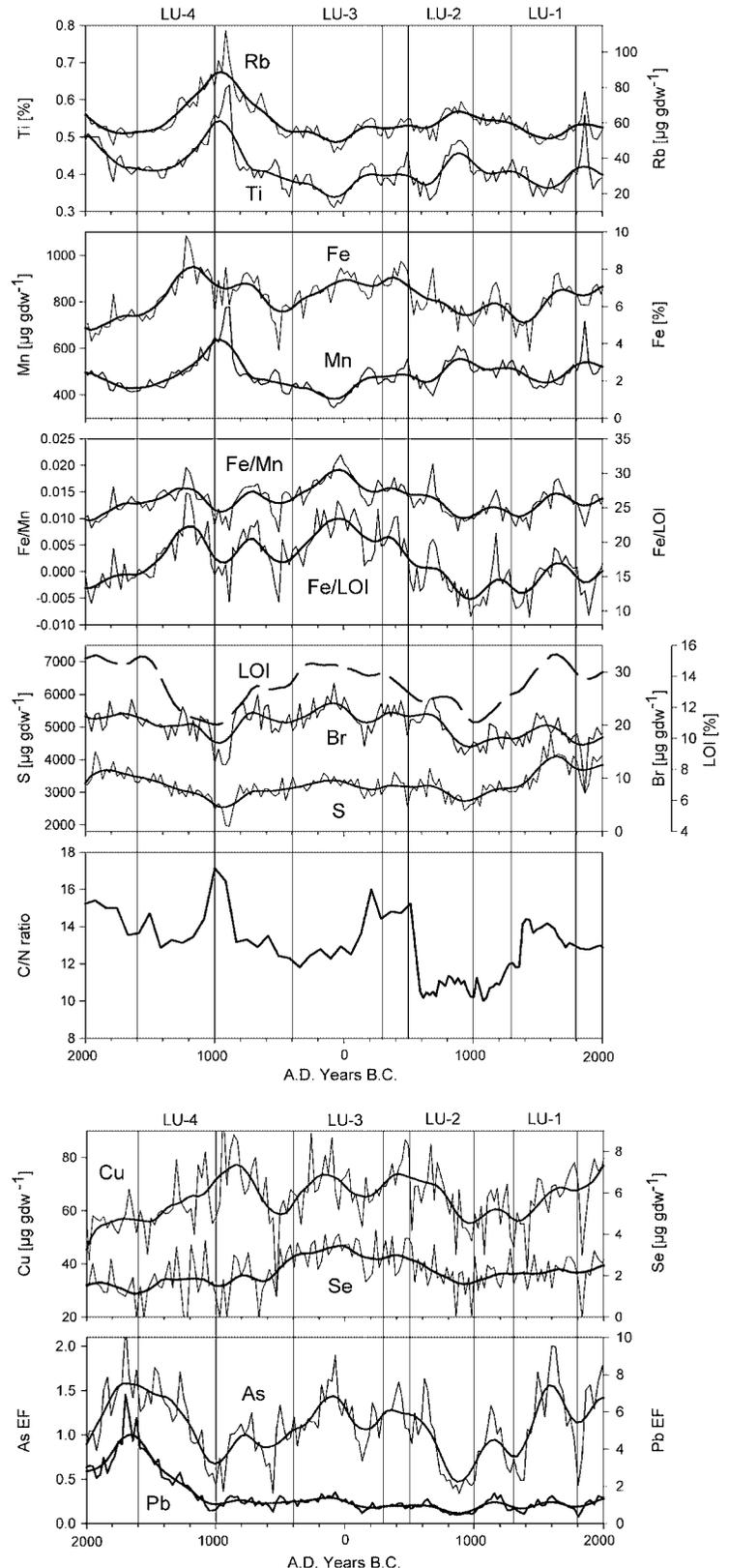
Results

Element analysis, LOI and C/N ratios (Fig. 1)

Variation in Rb ranged within 0.5%, that of Ti within $40 \mu\text{g gdw}^{-1}$. Both elements showed a marked peak around 1,000 A.D., lower peaks at about 800 and 1,900 B.C., and a more recent increase. The lowest value occurred at about 100 A.D.

Fe ranged within 6%. It was highest at about 1,200 A.D. Increasing trends occurred between 1,500 and 2,000 B.C. and between 1,000 B.C. and 400 A.D. Lower values occurred at ca. 1,400 B.C., at ca. 500 A.D., and between 1,500 A.D. and the present. Mn varied within $400 \mu\text{g gdw}^{-1}$. The highest Mn values

Fig. 1 From top to bottom: Concentrations of the selected lithogenic elements Rb and Ti; the percentage distribution of Fe and Mn; the Fe/Mn and Fe/LOI ratios; percentages of LOI (loss on ignition) in relation to concentrations of Br and S; and the C/N ratios in the sediment core ObLAN spanning the last 2,000 years before (B.C.) and after Christ (A.D.). The land-use (LU) phases 1–4 are added. Concentrations of Cu and Se (above) and As and Pb (below) using the enrichment factor (EF), in the sediment core ObLAN spanning the last 2,000 years before (B.C.) and after Christ (A.D.). The land-use (LU) phases 1–4 are added



occurred about 200 years before the marked peak in Fe. Smaller increases occurred between 200 to 600 and 800 to 1,000 B.C., as well as a short peak at ca. 1,900 B.C. The lowest value was at ca. 100 A.D. The Fe/Mn ratios peaked at about 1,200 and 800 A.D., at 0, ca. 700, 1,200 and 1,700 B.C. The Fe/LOI ratios mainly followed these patterns.

Br, S and LOI showed similar patterns with lowest values around 1,000 A.D. and 1,000 B.C., dividing increased plateaus with similar values. The maximum range in LOI was 10% and in Br $10 \mu\text{g gdw}^{-1}$. S ranged within $3,000 \mu\text{g}$.

The C/N ratios showed distinct peaks around 1,000 A.D., between 200–500 B.C., and between 1,300–1,600 B.C. The lowest values occurred between 500 and 1,100 B.C.

Cu showed four periods with series of short-term peaks between ca. 1,400 and 500 A.D., 400 A.D. and 200 B.C., 300 and 800 B.C., and between ca. 1,600 and 2,000 B.C. Maximum variation was $60 \mu\text{g gdw}^{-1}$.

Se showed an increasing trend between 400 A.D. and 800 B.C., and larger short-term variations between 1,000 and 1,400 A.D., with a maximum range of $4 \mu\text{g gdw}^{-1}$. When corrected by an enrichment factor (EF), As EF indicated increased values with short-term peaks between ca. 1,800 and 1,200 A.D., 200 A.D. and 100 B.C., 300 and 700 B.C., at about 1,100 B.C., and between 1,500 and 2,000 B.C. Pb indicated a distinct increase from 1,200 A.D., peaking between 1,600 and 1,700 A.D.

Mineralogy (Fig. 2) and grain-size analysis (Fig. 3)

The short-term variation in the percentage distribution of all mineral fractions exceeded the minor long-term changes. Median feldspar showed an overall slightly declining long-term trend from older to younger times, which is inverse to biotite + illite, especially during ca. 400–1,800 A.D. Quartz declined between ca. 1,600 and 1,800 A.D.

Variation of the three grain-size fractions (clay, silt, sand) was small. The clay fraction remained nearly constant and hence was not illustrated. Silt and sand showed variations within 20%. The sand fraction showed slightly increased values more recently, at about 300 A.D., and ca. 400 B.C.

Diatom and chrysophyte cyst-based climate and environmental reconstructions (Fig. 4)

The chrysophyte cyst-inferred mean spring temperature anomalies, which ranged between -0.3 and 0.1°C , indicated warm periods during Medieval (culminating between ca. 700 and 1,400 A.D.) and Roman times (culminating between ca. 100 and 400 A.D.). Minor additional warming periods occurred between ca. 500–1,000 B.C. and ca. 1,500–1,900 B.C.

Di-DOC mainly followed the spring warming trends. During the last millennium, inferred autumn temperatures were decoupled from spring temperatures. Di-pH remained nearly constant showing a slight decline (<0.1 units) between ca. 1,600 and 1,850 A.D.

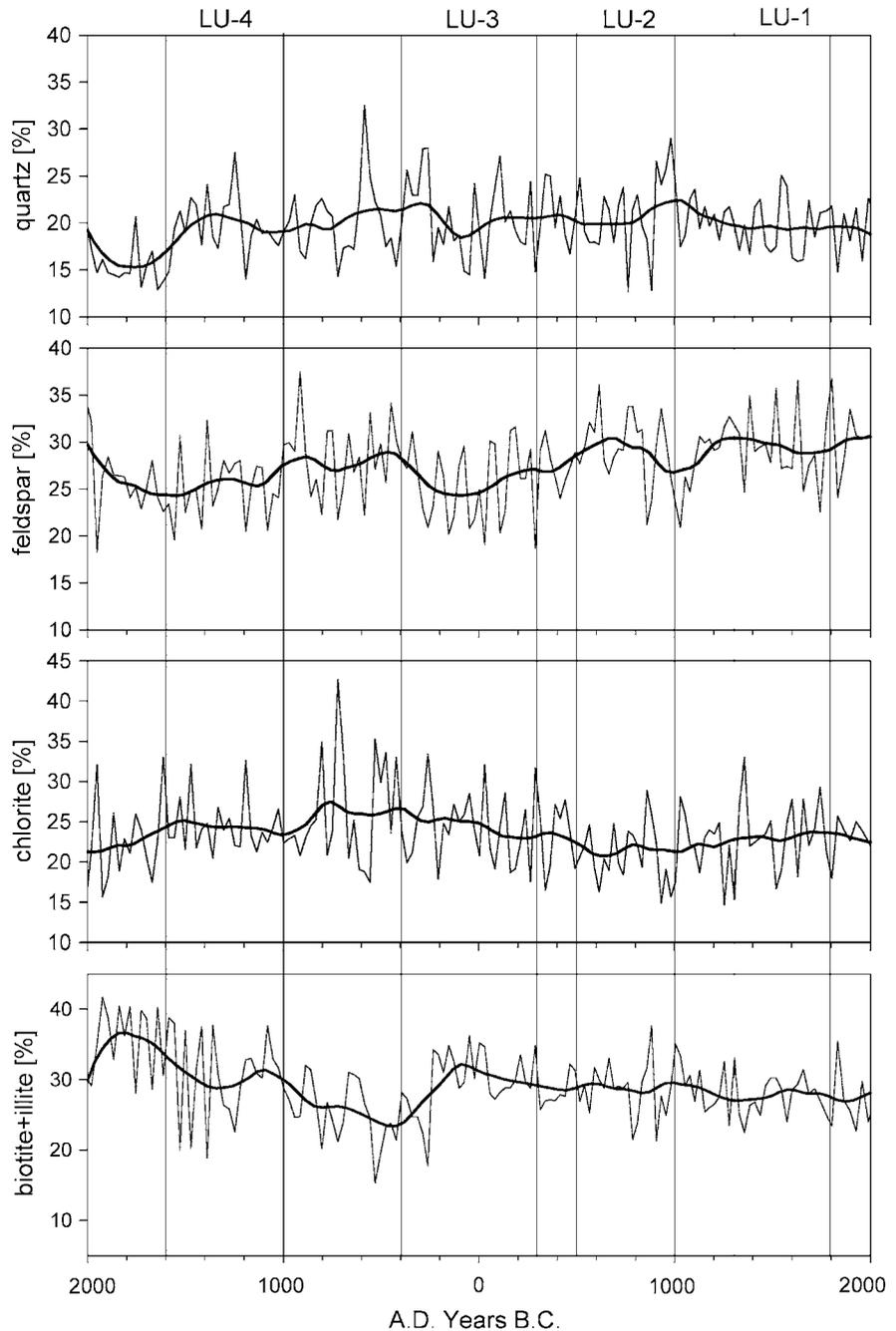
Pollen tracers (Fig. 4)

The four waves of anthropophytes (maximum 5.6%) mainly followed the warming trends. Pollen percentages of *P. cembra* (range within 0.5–6%) and *Larix* (maximum range 2.5%) showed a gradual increase over time, inverse to the long-term trend of *Fagus* (range within 0.5–12%), which declined towards the top. *A. viridis* (5–16%) showed peaks mainly between 1,200 and 1,600 A.D., 300 A.D. and 200 B.C., and between 600 and 1,000 B.C.

Numerical analyses (Fig. 5)

The PCA biplot (Fig. 5a) shows two ordination axes (1 and 2), which were statistically significant and accounted for 23.7% and 14.3% of variance in the variables, respectively. The ordination biplot indicated roughly four clusters of environmental variables: (1) lithogenic elements (K, Mn, Ti, Rb, Ca, Sr, Zr) that were strongly positively correlated with axis 1. Out of these, Rb and Ti were selected and illustrated in the stratigraphic plot (Fig. 1); (2) Fe/Mn, Br, Se, S, LOI, Cu and Fe were negatively correlated with axis 1; (3) Pb showed the strongest positive axis 2 score followed by Ga and As. The latter showed also a higher negative correlation with axis 1. This cluster assembles also pollen of timberline trees (*P. cembra* and *Larix*), associated with biotite + illite, and additionally alpine vegetation

Fig. 2 From top to bottom: Percentage distribution of quartz, feldspar, chlorite and biotite + illite in the sediment core ObLAN spanning the last 2,000 years before (B.C.) and after Christ (A.D.). The land-use (LU) phases 1–4 are added

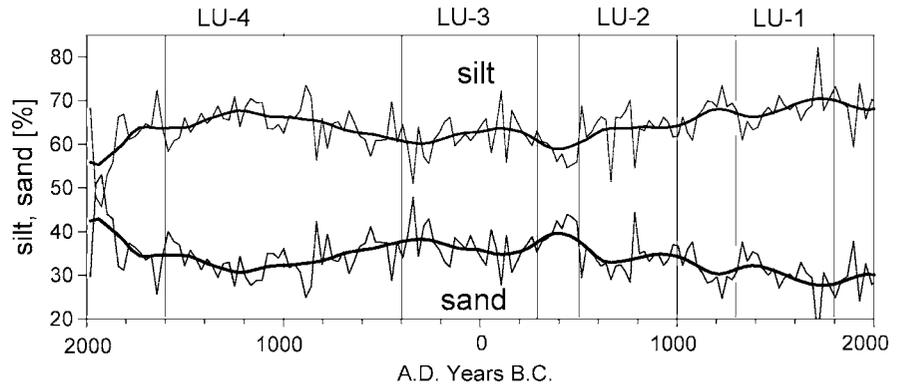


types affected by humans (*Larix*, Poaceae, NAP), which, however, showed also positive axis 1 scores (placed between axis 1 and 2); (4) Mn/Ti, pollen of *Abies*, *Fagus*, *A. viridis*, and feldspar and quartz were negatively correlated with axis 2. Also Di-DOC and Di-pH were associated with this cluster, whereas the

ratio Se/Di-DOC was ordinated with cluster (3). Generally, the grain-size fractions, Fe, Cu, Di-DOC and chlorite showed low ordination power.

The four explanatory variables (mean spring and autumn temperature anomalies, ice-cover duration, and anthropophytes) used in the RDA (Fig. 5b),

Fig. 3 Percentage distribution of the silt and sand fractions of ObLAN plotted against time. The land-use (LU) phases 1–4 are added



according to variance partitioning, explained 14.5% of the total variance. Most of the environmental variables were clustered between the four explanatory variables indicating hybrid characters in relation to them (for example *P. cembra*, *Larix*, and Poaceae between anthrop. and TA-Aut). Some of the variables that were formerly ordinated by PCA together within the four clusters, were now split (e.g. chlorite and illite + biotite along axis 2) or placed elsewhere (e.g. LOI, sand and S along axis 2).

Discussion

For disentangling climatic and anthropogenic impacts, we related the effects of the different processes and their indicators as follows:

Warm (dry) periods

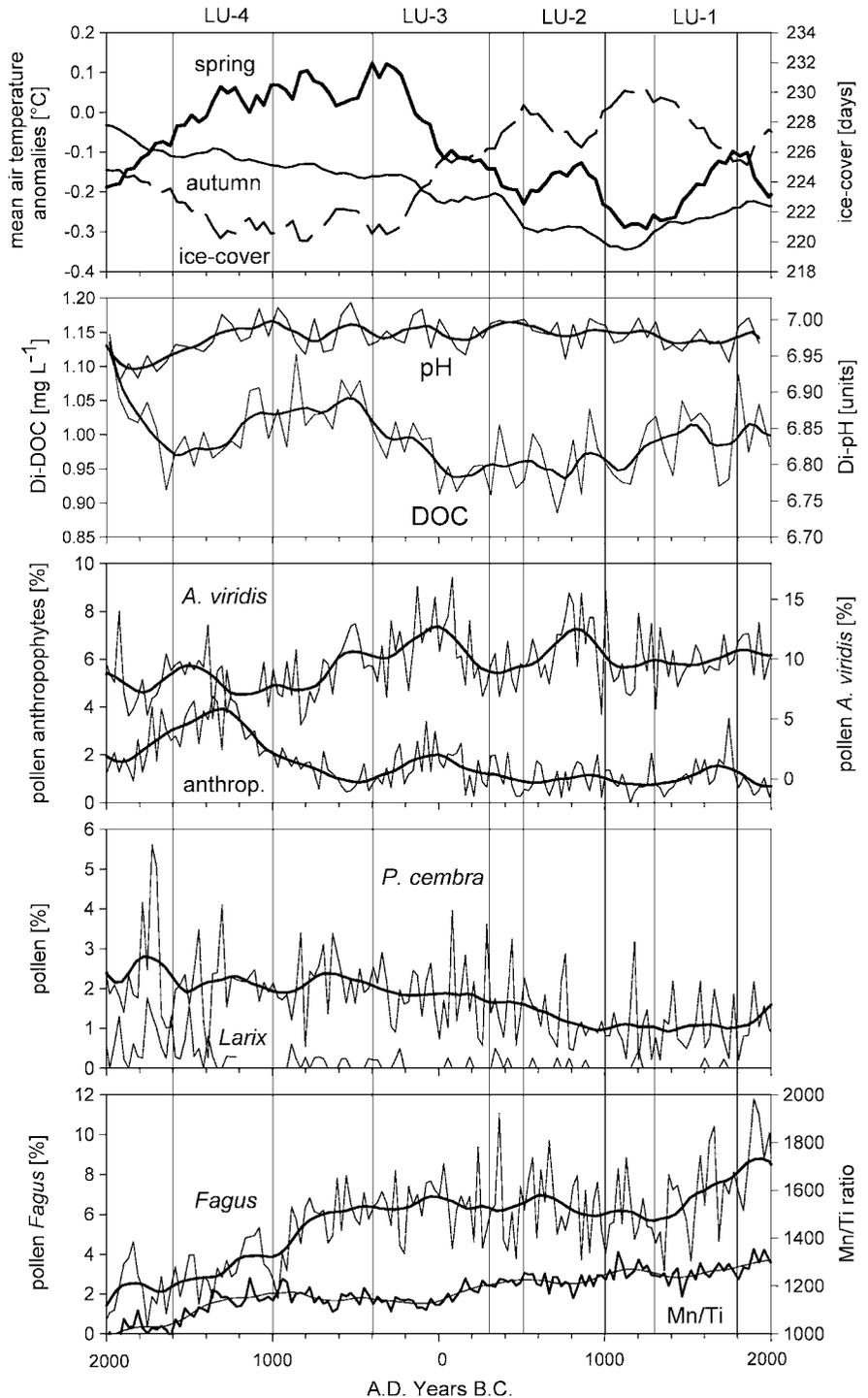
Climate warming during the four waves of alpine land use (Early to Middle Bronze = land-use phase 1, ca. 1,800–1,300 B.C.; Late Bronze to Hallstatt = 2, ca. 1,000–500 B.C.; Celtic to Roman = 3, ca. 300 B.C.–400 A.D.; Medieval times = 4, 1,000–1,600 A.D.) is supported by the geochemical record. Peaks in the Fe/Mn-ratios and As, Br and Cu mainly followed the inferred spring temperature curve indicating that increased spring temperatures influenced redox potentials. Ratios between Fe and Mn are commonly used as an indicator of palaeo-redox conditions (Wersin et al. 1991; Davison 1993; Stumm and Morgan 1996). Generally, the reduced form of Fe is less stable in the water column than that of Mn and consequently Fe/Mn ratios in the sediment

are high when the sediment becomes anoxic. Br is commonly adsorbed to organic matter (Lange 1970; Boyle 2001). Both organic matter flux during spring overturn as well as increased productivity during longer stratification periods could have lowered redox potentials. The significant ($p < 0.005$) correlation of the Fe/Mn ratio with that of Fe/LOI (Fig. 1) supports this assumption. The association of S with As, Cu, and Se fits the observation that sulphides played an important role in fixing trace elements under reducing conditions (e.g. Schaller et al. 1997; Huerta-Diaz et al. 1998). The association of As with Ga could indicate co-precipitation in similar minerals.

Temperature and productivity influenced DOC as shown by the similar curve of Di-DOC and TA-Spr, although inferred DOC concentrations generally were low ranging within the error of prediction. DOC in alpine lakes was shown to be related to altitude and thus to the altitude/temperature and vegetation/production gradients (Sommaruga et al. 1999). The positive ordination of the timberline-trees *P. cembra* and *Larix* and alpine herb vegetation with TA-Aut indicates their relationships with a prolonged growing season. The association of LOI with coarser grain-size showed, however, that catchment sources have also influenced organic matter formation as commonly observed in alpine lakes (Ariztegui et al. 1996). It could also explain the ambivalent patterns of Di-DOC shown by the increase during warm periods (Fig. 4) and the ordination of Di-DOC (Fig. 5b) with ice-cover (probably as a surrogate for snow accumulation and physical weathering).

When comparing the warm periods, Se showed a significant increase during Roman warming. Since Se is known to accumulate also in aquatic plants and food webs (e.g. Bowie et al. 1996), the Se increase

Fig. 4 From top to bottom: Chrysophyte cyst-inferred mean spring air temperature anomalies, diatom-inferred mean autumn temperature anomalies [in °C] and ice-cover duration [in days] (modified from Schmidt et al. 2007); diatom-inferred pH and dissolved organic carbon (DOC) (modified from Roth 2006); pollen percentage distribution of *A. viridis* and anthropophytes, of *P. cembra* and *Larix*, and of *Fagus* in relation to the Mn/Ti ratio in the sediment core ObLAN spanning the last 2,000 years before (B.C.) and after Christ (A.D.). The land-use (LU) phases 1–4 are added



could indicate an increase in in-lake production. The RDA ordination placed the Se/Di-DOC ratio between TA-Aut (=prolonged period of productivity) and ice-cover. Hence, it indicates shifts between

in-lake production and allochthonous sources. In our study, high ratios corresponded with the major warm periods during Roman and Medieval times and Early to Middle Bronze indicating increased in-lake

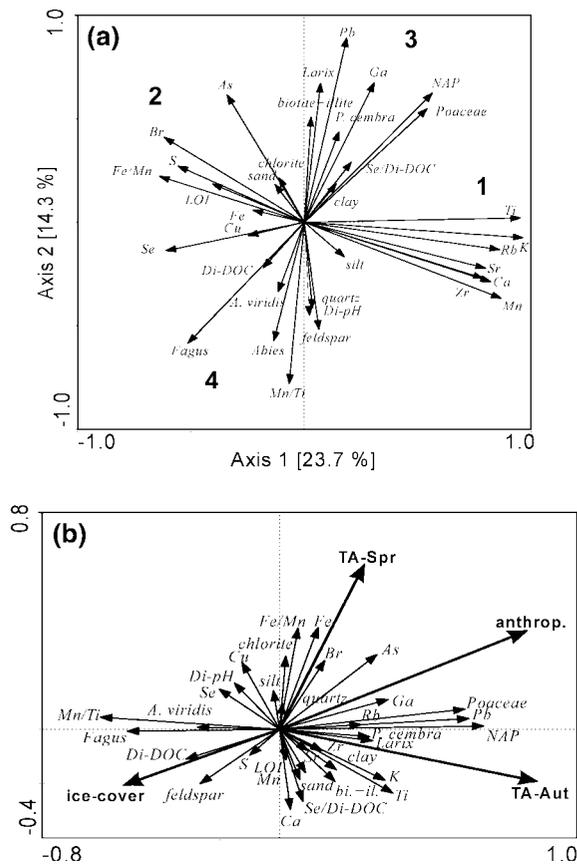


Fig. 5 (a) Principal Components Analysis biplot showing the ordination of selected variables along the first two significant axis, which both explain 38% of the total variance. The ordination indicates four clusters, which summarise lithogenic elements related to chemical weathering and which are positively correlated with axis 1 (1); variables related to organic matter and redox potentials which are negatively correlated with axis 1 (2); variables related to timberline, alpine vegetation and soil formation, in-lake productivity, and human impact, which are positively correlated with axis 2 (3); and variables related to humidity and physical weathering, which are negatively correlated with axis 2 (4). (b) Redundancy Analysis biplot showing the four forward-selected significant explanatory variables (mean spring = TA-Spr and mean autumn temperature anomalies = TA-Aut, ice-cover duration = ice-cover, and pollen percentage sum of anthropophytes = anthrop.), explaining 14.5% of total variance, in relation to selected variables along the two first significant axes

production, whereas the inferred periods of climate deterioration, LIA, the High Medieval fluctuation around 1,000 A.D., the Migration Period, and the cold period between ca. 1,500 and 1,100 B.C., showed lower Se/Di-DOC ratios. However, the land-use phase LU-2 (low values) and the period of climate deterioration between ca. 700 to 400 B.C.

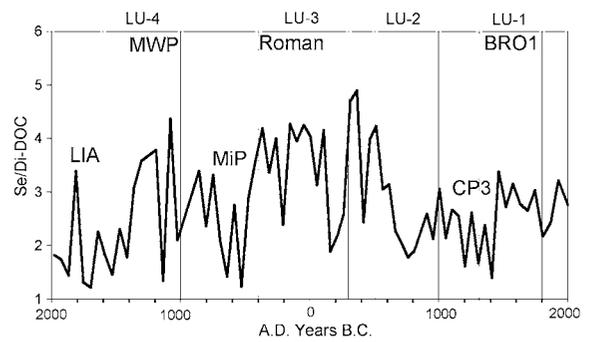


Fig. 6 Se/Di-DOC ratios plotted against time. The high values during Medieval and Roman warming, with the exception of the peaks between 600 and 300 B.C., indicate an increase in in-lake production, whereas predominantly Little Ice-Age = LIA, the short Medieval fluctuation, the Migration period = MiP, and the transition from the Early to Middle Bronze (BRO1) land-use phase LU-1 to the cold period CP3 indicates a shift to allochthonous sources (lower ratios)

(strong fluctuations between high and low) did not fit this distribution (Fig. 6). In the case of LU-2, the humid conditions which were inferred for Hallstatt (see below), could have lowered in-lake production. The cold period from ca. 700 to 400 B.C. indicate enhanced erosion (see below). Possible terrestrial plants enriched in Se were eroded thus explaining the increased ratios.

Warm and stable climate conditions probably forced soil formation. This can be characterised by the mineral composition of dominating biotite + illite (originating from the weathering of muscovite) associated with lithogenic elements indicating chemical weathering and progressing vegetation (timberline) dynamics.

Cold (wet) periods

Three marked climate-cooling periods (CP) with extended ice-cover were inferred (1, Little Ice-Age = LIA, ca. 1,600–1850 A.D.; 2 = ca. 700–400 B.C; 3 = ca. 1,300–1,100 B.C.). However, only during the Little Ice Age LOI and associated elements (As, Br, S) remained at high concentrations. The development of mature soils during the preceding Medieval warm periods (MWP) and the decoupling of warmer autumns from colder but less snow-rich springs during LIA could have caused mainly topsoil erosion. In contrast to LIA, the

mineralogenic content and also manganese loading from the catchment were higher during CP2 and CP3. This finding can be explained by less developed soils and/or more snow-rich/wet conditions during CP2 and CP3. Schmidt et al. (2006) assumed that extended and enhanced snow-pack during climate oscillations suppressed flowering of *A. viridis*. This pattern is visible for the marked cooling periods of CP2 and CP3, whereas during younger times this pattern became indistinct, probably due to clear-cutting of *A. viridis* shrubs and/or changes in climate. CP2 and CP3 correspond with periods of Middle-European high lake levels (Magny 2004). Lake-level increase during Episode 6 (1,500–1,100 B.C.) (=CP3) coincided with a cessation of Old Bronze Age villages (lake dwellings) around the subalpine lakes and Episode 5 (750–350 B.C.) (=CP2) showed a period of marked lake-level increase, distinctly exceeding the more recent lake level fluctuations (Magny 2004). The concurrent peaks in C/N and sand during CP2 indicate enhanced erosion.

Ohlendorf et al. (2000) showed for a Swiss high alpine lake that prolonged ice-cover resulted in strong anoxia. The Fe/Mn ratios of ObLAN showed, however, a lowering during all cold periods. This could indicate that anoxic conditions could not persist during the short summer open water seasons. Sulphur showed a hybrid character in relation to climate indicating either sulphide formation due to organic matter accumulation and reducing conditions during warm periods (see above), or in relation to increased ice-cover duration (Fig. 5b). The increase in sulphur during LIA could have been (i) the result of both topsoil erosion, which increased the oxygen demand for mineralisation of allochthonous organic matter, and (ii) the lowering of oxygen during prolonged ice-cover. Oxygen depletion probably caused the formation of insoluble FeS₂, as at low redox the mobilised reduced form of iron (Fe²⁺) re-precipitates commonly as FeS₂. Oxygen depletion could also have lowered organic matter decomposition thus explaining high LOI during the LIA. The combination of these different processes could explain the higher LOI levels when comparing LIA with the cold/wet periods CP2 and CP3.

The marked peak in As during LIA, similar to S, could be explained in different ways; (i) in relation to topsoil erosion (=humic layers from vascular plants and mature soils; Meyers and Lallier-Verges 1999)

resulting in organic matter accumulation and reducing conditions in the hypolimnion. Humic substances were shown to be as important as Fe and Mn oxides for binding trace elements (Tipping 1980; Ferdelman et al. 1991; Lofts and Tipping 1998) even when pH declines (Tessier et al. 1996). The diatom-inferred pH showed, however, only a slight declining trend (within the error of prediction) corresponding with the peak of Pb. The buffering of Oberer Landschitzsee by Ca⁺⁺, most likely originating from chemical weathering (see Ca clustering with lithogenic elements) of schists (Kamenik et al. 2001), could have counteracted pH decline caused by temperature lowering (Psenner and Schmidt 1992; Koinig et al. 1998) during LIA. The ordination of Di-pH either with quartz (PCA) or TA-Spr (RDA) indicates that pH was also related to snow-cover. This was also shown for pre-anthropogenic times of ObLAN (Schmidt et al. 2006). As a consequence, less influence by snow-melt could be a reason explaining the nearly constant Di-pH and the depression in quartz during LIA, and could suggest that the slight decline in Di-pH concurrent with the peak in Pb is mainly the result of pre-industrial air pollution (see below). In this case (ii), air pollution could have contributed also to high As and even to S enrichment (Rose and Juggins 1994). According to Kamenik and Schmidt (2005b) lead accumulation could affect the distribution of diatoms and chrysophytes at Unterer Landschitzsee. However, the slight pH decline should not have overwhelmed the climatic signals inferred from these proxies.

Long-term changes versus short-term fluctuation

The highly significant ($p < 0.001$) correlation between the decline of *Fagus* pollen and the Mn/Ti-ratio (Fig. 4) is notable in the context of long-term climate change. The finding suggests that external manganese loading from the catchment and changes in the distribution and flowering of *Fagus* could have been governed by a decline in humidity and snow-cover (see also the corresponding RDA ordination of *A. viridis* with *Fagus* and Mn/Ti associated with ice-cover; Fig. 5b). In contrast to *Fagus*, pollen percentages of *P. cembra* (timberline-tree favoured by continental climate conditions) increased. Although timberline (*P. cembra* and *Larix*), according to the

ordinations, was affected or even masked by human impact, these findings support the hypothesis of a long-term climate change in the study area towards more continental climate conditions since the Medieval (Schmidt et al. 2007). The long-term trend of slightly decreasing feldspar is in agreement with this hypothesis. During pre-anthropogenic times of ObLAN, increased feldspar indicated physical weathering during cold periods with increased snow accumulation (Schmidt et al. 2006).

As the short-term variation in mineral composition exceeded the range in long-term trends, peaks e.g. in quartz could indicate extreme events or episodes. During pre-anthropogenic times of ObLAN, peaks of quartz were commonly associated with the sand-fraction. This pattern was interpreted by Schmidt et al. (2006) to be caused mainly by melt-water transport from high and/or extended snow-pack. In our case, the ordination power by grain-size was, however, weak and sand was associated with organic matter (LOI) and decoupled from quartz and feldspar. These findings separate erosion from physical weathering. When explaining these findings with a general decline in snow-cover and with topsoil erosion during LIA, they are also in agreement with the hypothesis of a trend towards more continental climate conditions since the Medieval.

Anthropogenic versus climatic impacts

The element cluster associated with Ti and Rb and smaller grain-sizes (clay and silt) originated from chemically weathered silicate bedrock (White et al. 1999; Koinig et al. 2003). Rb and Ti peaked, however, at the beginning of the land-use phases 1, 2 and 4. The pollen signal indicated that human perturbation was highest during the High Medieval. Hence, they could indicate soil destabilisation due to anthropogenic impact. Marked peaks of lithogenic elements during pre-anthropogenic times of ObLAN were, however, also associated with cold climate oscillations (Schmidt et al. 2006). Low temperatures are commonly coupled with increased precipitation, which at higher elevations in the Alps falls as snow (Auer and Böhm 1994; Schöner et al. 2000). Snow accumulation during climate deterioration could explain that the marked peak of lithogenic elements around 1,000 A.D. showed a low content of sand and

a slight increase in silt, thus indicating low running water impact. Although the concurrent minor fluctuation in spring temperatures and ice-cover range within the error of prediction, they fit the variations in tree-ring densities and glacier extension in the Alps (Nicolussi and Patzelt 2000; Nicolussi et al. 2005; Frank and Esper 2005), indicating that MWP was interrupted by colder phases. Our results also fit the finding from Pla and Catalan (2005) of cold winters in the Pyrenees during 1,050–1,175 A.D., taking into account smaller dating uncertainties. Climate deterioration at ObLAN was, however, less severe than that for the LIA suggested by Pla and Catalan (2005), but similar to the time of the Migration Period (ca. 400–500 A.D.). Percentage increase in quartz, feldspar and chlorite, which resulted in a distinct decline of biotite + illite, indicate, however, wetter conditions for the time of the Migration Period than for the High Medieval climate fluctuation.

Since the land-use phase 2 (Late Bronze to Hallstatt) followed a marked cooling period (CP3), melt-waters from perennial snowfields could explain the increase in sand coupled with a peak in quartz during initial land use. Persisting wet conditions (Mandl 2003), together with soil destabilisation due to land use, similar to 1,000 A.D., could have resulted in the increase of lithogenic elements. Low Se/Di-DOC ratios (Fig. 6) support the assumption of allochthonous influx. However, C/N ratios were at lowest during land-use phase 2, which is in contrast to the marked C/N peak concurrent with increased lithogenic elements during the High Medieval climate fluctuation. The distinct cooling period of CP3 was likely to cause soil denudation (increased C/N at the beginning), whereas the Medieval climate fluctuation followed a warm period with enhanced soil development, which could explain this discrepancy.

Nutrient loading from pastures, coupled with climate warming, could explain the high in-lake production during Roman and Medieval land use (Fig. 6).

During the High Medieval, Pb concentrations exceeded the long-term background values and culminated during the Late Medieval. The onset corresponded with increased aerial lead deposition in European lakes due to increased mining and metal production in the 10th century (Renberg et al. 1994; Bränvall et al. 2001). Historical archives mentioned the extension of metallurgic industries in Lungau

during the Late Medieval (Mutschlechner 1967; Ortner and Sagmeister 1992). Since trace metals such as As and Pb can be accumulated by plants growing on arsenic and lead-enriched soils (e.g. Baker and Brooks 1989; Brooks 1998; Ma et al. 2001), fly-ashes from their combustion (e.g. Jackson and Miller 1999; Rose and Harlock 1998) could have increased As and Pb concentrations in the sediments of Oberer Landschitzsee. Since increased lead accumulation was also observed in the sediments of Unterer Landschitzsee (Kamenik et al. 2005), these findings point to regional pre-industrial air pollution.

Conclusions

Changes in chemical and physical weathering, erosion, production, lake stratification, redox potentials, and air pollution, were the major effects on Oberer Landschitzsee in relation to climate, lake/catchment interactions, and human impact during the last 4,000 years (summarised in Table 1).

The geochemical patterns mainly followed the inferred trends in spring temperature anomalies. They indicated two marked climate-cooling periods B.C. (CP2 and CP3), which probably have exceeded LIA in the duration of ice-cover. Warming culminated during Roman and Medieval times, with temperatures close to modern. Corresponding features in the distribution of selected elements and pollen tracers as well as changes in mineral patterns supported the hypotheses of shifts in seasonal climate and an overall trend towards more continental climate conditions since Medieval times. Differences in the lake environment during LIA when compared with CP2 and CP3 were explained by the decoupling of spring and autumn temperatures, less snow-rich conditions, and by topsoil erosion of mature soils that have formed during the preceding Medieval warming (MWP).

Geochemistry supported the finding that the four waves of alpine land use were coupled mainly with warm periods. Increase in productivity, onset of lake stratification, and the deterioration of hypolimnetic oxygen conditions were the major changes governing in-lake processes during climate warming. It resulted in specific element assemblages associated with organic matter accumulation (Br), oxygen depletion (As, Ga, Cu, S), and changes in redox potentials

(Fe/Mn). Sulphur enrichment occurred due to both organic matter accumulation and oxygen depletion, either during warm periods with increased production and lake stratification, or during climate deterioration with prolonged ice-cover and topsoil erosion (LIA).

Diatom-inferred DOC concentrations were generally low. Nevertheless, they indicated hybrid patterns either due to increased in-lake production during climate warming or due to catchment erosion, probably mainly by snow-melt. The Se/Di-DOC ratio was shown to be a new, promising, tool for tracking shifts between in-lake production and allochthonous sources. Nutrient loading from pastures, coupled with warming, could explain why in-lake production was highest during Roman and Medieval land use.

Lithogenic elements mainly originated from chemical weathering of silicate bedrock and they increased when intense land use was coupled with increased humid conditions (silt). These perturbations were highest during a High Medieval climate fluctuation around 1,000 A.D. The C/N ratios generally were high when mature soils were eroded. The association of sand with LOI and C/N, and the decoupling from quartz and feldspar, separated soil erosion from physical weathering.

Illite + biotite were counterparts of lithogenic elements, associated with chemical weathering and progressing climate-driven timberline and alpine vegetation. The latter is, however, masked by human impact. Feldspar indicated physical weathering under cold and snow-rich conditions during the Holocene, whereas quartz indicated running-water impact either by snow-melt or general humid conditions. Chlorite, along the gradient of wetness, appears to be placed between chemical and physical weathering.

Air pollution by metallurgic industries, which started during the High Medieval and culminated during the Late Medieval, caused lead accumulation and possibly a slight pH decline, and could also have contributed to As and S enrichment.

The inference of only two seasons (spring and autumn), a multi-dimensional scale between long-term climate changes and short-term variation where precipitation (snow-cover) was only indirectly inferred, and the hybrid characters of several variables, could be the major reasons why our explanatory variables only captured a relatively small part of the total variance in the measured geochemical, mineralogical, and vegetation variables (14.5%). The variance explained was,

Table 1 Short summary list of major causes and effects impacting ObLAN (indicators in brackets; those with hybrid characters are marked with an asterisk, *; decline <; increase >)

	Warm climate	Cold climate	Oceanic (humid, snow-rich)	Continental (dryer)	Human impact
Air	>Temperature (>TA-Spr, TA-Aut)	Cooling (<TA-Spr, TA-Aut)		(Decoupling of TA-Spr and TA-Aut since Medieval)	Pollution (Pb, As*?, S*?, <Di-pH)
Catchment	Vegetation >Timberline (<i>P. cembra</i>), denser alpine vegetation, >production	<Timberline, open vegetation (NAP*)	Lower altitude: > <i>Abies</i> , <i>Fagus</i> subalpine: <i>Alnus viridis</i>		Clearcutting of trees and shrubs, pastures (Anthropophytes, NAP*, Poaceae, <i>Larix</i>)
Catchment	Soil Formation (biotite + illite)	Destabilisation	Erosion > minerogenic material	Topsoil erosion > organic material (LOI*, C/N*)	Erosion (LOI + sand + C/N)* (>Lithogenic elements)
Catchment	Weathering Chemical (lithogenic elements, <grain-sizes)	Physical (>feldspar)	Physical (>quartz*, grain-sizes)		
Catchment	Snow Melt (>quartz*)	Accumulation	>Snow-pack (<flowering of <i>A. viridis</i> , >DOC*)		
Lake	Ice-cover <(Ice-cover)	>(Ice-cover)			
Lake water	Production In-lake (>DOC*, LOI*, Br, Se, >Se/DOC)	Allochthonous (<>Se/DOC)			>Nutrient loading?
Hypolimnion	Redox >Fe/Mn oxygen deplet. (org. matter) (>As*, Ga, Cu, S*)	Oxygen deplet. (ice-cover) (>S*)		Topsoil erosion FeS ₂ ?	
Lake water	Thermal Stratification	Mixing (early A _{mix} , late S _{mix})			

however, highly significant ($p \leq 0.001$). Nevertheless, the combined use of quantitative seasonal climate inference and a range of different proxies confirmed (1) climate patterns and hypotheses that were formerly proposed, and (2) helped to disentangle causes and effects of the complex interactions that have impacted Oberer Landschitzsee during the last 4,000 years.

Acknowledgements The investigations were funded by the Austrian Science Fund (FWF project No. P14912-B06) and by the Austrian Academy of Sciences research program “Alpenforschung” (project CLIM-LAND). We would like to thank A. Cheburkin and B. Shotyk (Univ. Heidelberg) for geochemical analysis, J. Knoll for technical assistance, R. Psenner (Univ. Innsbruck) and anonymous reviewers for critical comments.

References

- Agustí-Panareda A, Thompson R (2002) Reconstructing air temperature at eleven remote alpine and arctic lakes in Europe from 1781 to 1997 AD. *J Paleolimnol* 28:7–23
- Ariztegui D, Farrimond P, McKenzie JA (1996) Compositional variations in sedimentary lacustrine organic matter and their implications for high Alpine Holocene environmental changes Lake St. Moritz Switzerland. *Org Geochem* 24:453–461
- Auer I, Böhm R (1994) Combined temperature-precipitation variations in Austria during the instrumental period. *Theor Appl Clim* 49:161–174
- Auer I, Böhm R, Jurkovic A, Orklik A, Potzmann R, Schöner W, Ungersböck M, Brunetti M, Nanni T, Maugeri M, Briffa K, Jones P, Efthymiadis D, Mestre O, Moisselin JM, Begert M, Brazdil R, Bochnice O, Cegnar T, Gajic-Capka M, Zaninovic K, Majstorovic Z, Szalai S, Szentimrey T, Mercalli L (2005) A new instrumental precipitation dataset of the Greater Alpine region for the period 1800–2002. *Int J Clim* 25:139–166
- Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements A review of their distribution ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81–126
- Beniston M, Junco P (2002) Shifts in the distribution of pressure temperature and moisture and changes in the typical weather patterns in the Alpine region in response to the behaviour of the North Atlantic Oscillation. *Theor Appl Clim* 71:29–42
- Böhm R (2006) Reconstructing the climate of the 250 years of instrumental records at the northern border of the Mediterranean (The Alps). *Il Nuova Cimento* 29:13–19
- Borcard D, Legendre P, Drapeau P (1992) Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology* 73:1045–1055
- Boyle JF (2001) Inorganic geochemical methods in palaeolimnology. In: Last WM, Smol JP (eds) *Tracking environmental change using lake sediments*, vol 2, Physical and geochemical methods. Kluwer Academic Publishers, pp 83–142
- Bowie GL, Sanders JG, Riedel GF, Gilmour CC, Breitburg DL, Cutter GA, Porcella DB (1996) Assessing selenium cycling and accumulation in aquatic ecosystems. *Water Air Soil Pollut* 90:93–104
- Brännvall ML, Bindler R, Emteryd O, Renberg I (2001) Four thousand years of atmospheric lead pollution in northern Europe a summary from Swedish lake sediments. *J Paleolimnol* 25:421–435
- Brooks RR (ed) (1998) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. University Press, Cambridge, 394 pp
- Casty C, Wanner H, Luterbacher J, Esper J, Böhm R (2005) Temperature and precipitation variability in the European Alps since 1500. *Int J Clim* 25:1855–1880
- Cheburkin AK, Shotyk W (1996) An Energy-Dispersive Miniprobe Multielement Analyzer (EMMA) for direct analysis of Pb and other trace elements in peat. *Fresenius J Anal Chem* 354:688–691
- Cheburkin AK, Frei R, Shotyk W (1997) An Energy-Dispersive Miniprobe Multielement Analyzer (EMMA) for direct analysis of trace-elements and chemical age dating of single mineral grains. *Chem Geol* 135:75–87
- Cleveland WS, Develin S (1988) Locally-weighted regression an approach to regression analysis by local fitting. *J Am Stat Assoc* 83:596–610
- Davison W (1993) Iron and manganese in lakes. *Earth Sci Rev* 34:119–163
- Drescher-Schneider R (2003) Pollenanalytische Untersuchungen an einem Bodenprofil im Zusammenhang mit dem urgeschichtlichen Brandopferplatz auf dem Sölkpass (1780 m NN Niedere Tauern Steiermark). In: Mandl F (ed) *Sölkpass Ein 6000 Jahre alter Saumpfad über die Alpen*. ANISA, pp 89–112
- Ferdelman TG, Church TM, Luther GW (1991) Sulfur enrichment of humic substances in a Delaware salt marsh sediment core. *Geochim Cosmochim Acta* 55:979–988
- Frank DC, Esper J (2005) Characterization and climate response patterns of a high elevation multi species tree-ring network for the European Alps. *Dendrochronology* 22:107–121
- Gams H (1931/1932) Die klimatische Begrenzung von Pflanzenarealen und die Verteilung der hygrischen Kontinentalität in den Alpen. *Z Ges Erdkde*, Berlin, 9:321–346 and 10:52–56 and 178–198
- Hausmann S, Lotter AF, van Leuwen JFN, Ohlendorf C, Lemcke G, Grönlund E, Sturm M (2002) Interactions of climate and land-use documented in the varved sediments of Seebergsee in the Swiss Alps. *Holocene* 13:477–484
- Heegaard E, Birks HJB, Telford RJ (2005) Relationships between calibrated ages and depth in stratigraphical sequences an estimation procedure by mixed-effect regression. *Holocene* 15:612–618
- Heiri O, Lotter AF, Lemcke G (2001) Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments Reproducibility and comparability of results. *J Paleolimnol* 25:101–110
- Huerta-Diaz MA, Tessier A, Carignan R (1998) Geochemistry of trace metals associated with reduced sulfur in freshwater sediments. *Appl Geochem* 13:213–233

- Hurrell JW, van Loon H (1997) Decadal variations in climate associated with the North Atlantic Oscillation. *Clim Change* 36:301–326
- Jackson BP, Miller WP (1999) Soluble arsenic and selenium species in fly ash/organic waste-amended soils using ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 33:270–275
- Kamenik C, Schmidt R (2005a) Chrysophyte resting stages a tool for reconstructing winter/spring climate from Alpine lake sediments. *Boreas* 34:477–489
- Kamenik C, Schmidt R (2005b) Computer-aided SEM analysis of chrysophyte stomatocysts. *Nova Hedwig Beih* 128: 269–274
- Kamenik C, Koinig KA, Schmidt R (2005) Potential effects of pre-industrial lead pollution on algal assemblages from an Alpine lake. *Verh Int Verein Limnol* 29:535–538
- Kamenik C, Koinig KA, Schmidt R, Appleby PG, Dearing JA, Lami A, Thompson R, Psenner R (2000) Eight-hundred years of environmental changes in a high alpine lake (Gossenköllesee Tyrol) inferred from sediment records. *J Limnol* 59:43–52
- Kamenik C, Schmidt R, Kum G, Psenner R (2001) The influence of catchment characteristics on the water chemistry of mountain lakes. *Arct Alp Res* 33:404–409
- Kilian W, Müller F, Starlinger F (1994) Die forstlichen Wuchsgebiete Österreichs Eine Naturraumgliederung nach waldökologischen Gesichtspunkten. FBVA, Berichte 82, 60 pp
- Klaus W (1972) Saccusdifferenzierungen an Pollenkörnern ostalpiner *Pinus*-Arten. *Österr Bot Z* 120:93–116
- Klaus W (1975) Über bemerkenswerte morphologische Bestimmungsmerkmale an Pollenkörnern der Gattung *Pinus* L. *Linzer Biol Beitr* 7:329–369
- Koinig K, Schmidt R, Sommaruga-Wögrath S, Tessadri R, Psenner R (1998) Climate change as the primary cause of pH shifts in a high alpine lake. *Water Air Soil Pollut* 104:167–180
- Koinig KA, Shotyk W, Lotter AF, Ohlendorf C, Sturm M (2003) 9,000 years of geochemical evolution of lithogenic major and trace elements in the sediment of an alpine lake the role of climate vegetation and land-use history. *J Paleolimnol* 30:307–320
- Kral F (1971) Beiträge zur Geschichte der Almwirtschaft im Dachsteinmassiv auf Grund pollenanalytischer Untersuchungen. *Alm und Weide* 21:1–7
- Kral F (1985) Zur postglazialen Waldentwicklung in den südlichen Hohen Tauern mit besonderer Berücksichtigung des menschlichen Einflusses. *Sitzber Österr Akad Wiss Math-nat Kl Abt I* 194:247–289
- Lange J (1970) Geochemische Untersuchungen an Sedimenten des Persischen Golfes. *Contr Min Petr* 28:288–305
- Livingstone DM, Lotter AF (1998) The relationship between air and water temperatures in lakes of the Swiss Plateau a case study with paleolimnological implications. *J Paleolimnol* 19:181–198
- Lofts S, Tipping E (1998) An assemblage model for cation binding by natural particulate matter. *Geochim Cosmochim Acta* 62:2609–2625
- Luterbacher J, Dietrich D, Xoplaki E, Grosjean M, Wanner H (2004) European seasonal and annual temperature variability trends and extremes since 1500. *Science* 303: 1499–1503
- Ma LQ, Komer KM, Tu C, Zhang W, Lai Y (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409:579
- Magny M (2004) Holocene climate variability as reflected by mid-European lake-level fluctuations and its probable impact on pre-historic human settlements. *Quat Int* 113: 65–79
- Mandl F (2003) Almen im Herzen Österreichs Dachsteingebirge Niedere Tauern Salzkammergut Totes Gebirge. ANISA, 312 pp
- Meyers PA, Lallier-Vergès E (1999) Lacustrine organic matter records of Late Quaternary paleoclimates. *J Paleolimnol* 21:345–372
- Mutschlechner G (1967) Über den Bergbau im Lungau. *Mitt Ges Salzburg Landeskd* 107:129–168
- Nicolussi K, Patzelt G (2000) Untersuchungen zur Holozänen Gletscherentwicklung von Pasterze und Gepatschferner (Ostalpen). *Z Gletsch Glazialgeol* 36:1–87
- Nicolussi K, Kaufmann M, Patzelt G, van der Plicht J, Thurner A (2005) Holocene tree-line variability in the Kauner Valley Central Eastern Alps indicated by dendrochronological analysis of living trees and subfossil logs. *Veget Hist Archaeobot* 14:221–234
- Oeggl K (1994) The palynological record of human impact in highland zone ecosystems. In: Biagi P, Nandis J (eds) Highland exploitation in southern Europe, vol 20. *Monograf Nat Bresciana*, pp 107–122
- Ohlendorf C, Bigler C, Goudsmit GH, Lemcke G, Livingstone DM, Lotter AF, Müller B, Sturm M (2000) Causes and effects of long ice cover on a remote high Alpine lake. *J Limnol* 59:65–80
- Ortner F, Sagmeister R (1992) Lessach im Lungau Geschichte und Gegenwart eines Dorfes. *Gemeinde Lessach*, 383 pp
- Patzelt G, Bortenschlager S (1973) Die postglazialen Gletscher- und Klimaschwankungen in der Venedigergruppe (Hohe Tauern Ostalpen). *Z Geomorph N F Suppl* Bd 16:25–72
- Pla S, Catalan J (2005) Chrysophyte cysts from lake sediments reveal the submillennial winter/spring climate variability in the northwestern Mediterranean region throughout the Holocene. *Clim Dyn* 24:263–278
- Psenner R, Schmidt R (1992) Climate-driven pH control of remote alpine lakes and effects of acid deposition. *Nature* 356:781–783
- Renberg I, Wik Persson M, Emteryd O (1994) Pre-industrial atmospheric lead contamination detected in Swedish lake sediments. *Nature* 368:323–326
- Rose NL, Juggins S (1994) A spatial relationship between carbonaceous particles in lake sediments and sulphur deposition. *Atmos Environ* 28:177–183
- Rose NL, Harlock S (1998) The spatial distribution of characterized fly-ash particles and trace metals in lake sediments and catchment mosses in the United Kingdom. *Water Air Soil Pollut* 106:287–308
- Roth M (2006) Rekonstruktion Holozäner Umweltveränderungen in einem Alpenen See mittels Diatomeen und Chrysophyceen (Oberer Landschitzsee Niedere Tauern). Diplomarbeit Fakultät für Naturwissenschaften der

- Universität Salzburg und Institut für Limnologie, Österreichische Akademie der Wissenschaften, 72 pp
- Schaller T, Moor HC, Wehrli B (1997) Sedimentary profiles of Fe Mn V Cr As and Mo as indicators of benthic redox conditions in Baldeggersee. *Aquat Sci* 59:345–361
- Schmidt R, Kamenik C, Kaiblinger C, Hetzel M (2004a) Tracking Holocene environmental changes in an alpine lake sediment core application of regional diatom calibration geochemistry and pollen. *J Paleolimnol* 32:177–196
- Schmidt R, Kamenik C, Lange-Bertalot H, Klee R (2004b) *Fragilaria* and *Staurosira* taxa (Bacillariophyceae) from surface sediments of 40 lakes in the central Austrian Alps (Niedere Tauern) in relation to environmental variables. *J Limnol* 63:171–189
- Schmidt R, Kamenik C, Roth M (2007) Siliceous algae-based seasonal temperature inference and indicator pollen tracking ca. 4,000 years of climate/land use dependency in the southern Austrian Alps. *J Paleolimnol*. doi: [10.1007/s10933-007-9089-y](https://doi.org/10.1007/s10933-007-9089-y)
- Schmidt R, Kamenik C, Tessadri R, Koinig KA (2006) Climatic changes from 12,000 to 4,000 years ago in the Austrian Central Alps tracked by sedimentological and biological proxies of a lake sediment core. *J Paleolimnol* 35:491–505
- Schmidt R, Koinig KA, Thompson R, Kamenik C (2002) A multi proxy core study of the last 7000 years of climate and alpine land-use impacts on an Austrian mountain lake (Unterer Landschitzsee Niedere Tauern). *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 187:101–120
- Schöner W, Auer I, Böhm R (2000) Climate variability and glacier reaction in the Austrian eastern Alps. *Ann Glaciol* 31:31–38
- Shotyk W (1996) Peat bog archives of atmospheric metal deposition geochemical evolution of peat profiles natural variations in metal concentrations and metal enrichment factors. *Environ Rev* 4:149–183
- Sommaruga R, Psenner R, Schafferer E, Koinig KA, Sommaruga-Wögrath S (1999) Dissolved organic carbon concentration and phytoplankton biomass in high-mountain lakes of the Austrian Alps potential effects of climate warming on UV underwater attenuation. *Arct Alp Res* 31:247–253
- Stumm W, Morgan JJ (1996) Aquatic chemistry chemical equilibria and rates in natural waters. Wiley and Sons, New York, 1022 pp
- Tessier A, Fortin D, Belzile N, DeVitre RR, Leppard GG (1996) Metal sorption to diagenetic iron and manganese oxyhydroxides and associated organic matter narrowing the gap between field and laboratory measurements. *Geochim Cosmochim Acta* 60:387–404
- ter Braak C, Šmilauer P (2002) CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows User Guide Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Biometris, Wageningen and Česke Budejovice, 500 pp
- Tipping E (1980) The adsorption of aquatic humic substances by iron oxides. *Geochim Cosmochim Acta* 45:191–199
- Thompson R, Kamenik C, Schmidt R (2005) Ultra-sensitive Alpine lakes and climate change. *J Limnol* 64:139–152
- Tranquillini W (1979) Physiological ecology of the Alpine timberline tree existence at high altitudes with special reference to the European Alps. *Ecol Studies* 31. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Wanner H, Brönnimann S, Casty C, Gyalistras D, Luterbacher J, Schmutz C, Stephenson DB, Xoplaki E (2001) North Atlantic oscillation concepts and studies. *Surv Geophys* 22:321–382
- Wanner H, Luterbacher J, Casty C, Böhm R, Xoplaki E (2003) Variabilität von Temperatur und Niederschlag in den Europäischen Alpen seit 1500. *J Def* 61–74
- Wersin P, Hohener P, Giovanoli R, Stumm W (1991) Early diagenetic influences on iron transformations in a freshwater lake sediment. *Chem Geol* 90:233–252
- White AF, Blum AE, Bullen TD, Vivit DV, Schulz M, Fitzpatrick J (1999) The effect of temperature on experimental and natural chemical weathering rates of granitoid rocks. *Geochim Cosmochim Acta* 63:3277–3291
- Xoplaki E, Luterbacher J, Paeth H, Dietrich D, Steiner N, Grosjean M, Wanner H (2005) European spring and autumn temperature variability and change of extremes over the last half millennium. *Geophys Res Lett* 32:157–213

Short Research Note

Microcystin production by cyanobacteria in the Mwanza Gulf (Lake Victoria, Tanzania)

Baraka C. Sekadende¹, Thomas J. Lyimo² & Rainer Kurmayer^{3,*}

¹Tanzania Fisheries Research Institute, P.O. Box 90, Kigoma, Tanzania

²Botany Department, University of Dar es Salaam, P.O. Box 35060, Dar es Salaam, Tanzania

³Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria

(* Author for correspondence: Tel.: 0043-6232-312532; Fax: 0043-6232-3578; E-mail: rainer.kurmayer@oeaw.ac.at)

Received 5 March 2004; in revised form 28 July 2004; accepted 30 November 2004

Key words: eutrophication, phytoplankton composition, algal biovolume, nutrients, toxin analysis, health risk

Abstract

In order to investigate the potential for microcystin (MC) production by cyanobacteria in the Mwanza Gulf (Lake Victoria, Tanzania), nutrients, phytoplankton and microcystins were sampled inshore (3 m depth) and offshore (18 m depth) from May to August 2002. Significant differences in soluble reactive phosphorus (SRP) and nitrate concentrations between offshore and inshore indicated eutrophication via terrestrial runoff. Though the concentrations of SRP and nitrate ranged between 36–127 and 35–726 $\mu\text{g l}^{-1}$ each, the phytoplankton biovolume was generally low. The phytoplankton community was dominated by diatoms (*Nitzschia acicularis*), a number of cyanobacterial species (*Aphanocapsa* sp., *Anabaena* sp., *Planktolyngbya* spp., *Microcystis* sp.) and cryptomonads. The water column was completely mixed and *Nitzschia* peaked in abundance during July. All cyanobacteria were low in abundance during the entire study period (0.1–1.6 $\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$). Microcystins were analysed using high performance liquid chromatography coupled with diode array detection High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD) and in most samples no microcystins were detected. The highest concentration of [Asp³]-MC-RR was found in open water at the surface on July 2nd, 2002 (1 $\mu\text{g l}^{-1}$). MC concentrations did not pose a potential health risk in the Mwanza Gulf during the study period, however, it is possible that the period of higher cyanobacterial biovolumes has been missed during the sampling period of this study.

Introduction

The most abundant toxins that are found in the freshwaters of the temperate region are the microcystins. Microcystins are produced by a number of planktonic cyanobacterial genera (Sivonen & Jones, 1999). Microcystins are cyclic heptapeptides and share the common structure cyclo (-D-Ala⁽¹⁾-X⁽²⁾-D-MeAsp⁽³⁾-Z⁽⁴⁾-Adda⁽⁵⁾-D-Glu⁽⁶⁾-Mdha⁽⁷⁾), where X and Z are variable L-amino acids (e.g. microcystin (MC)-LR refers to leucine and arginine in the variable positions of this peptide), D-MeAsp is D-erythro- β -iso-aspartic

acid, Adda is (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid, and Mdha is N-methyl-dehydroalanine (Carmichael et al., 1988). Toxicity is mediated through the active transport of MC into hepatocytes by the bile acid organic anion transport system. This is followed by the inhibition of eukaryotic serine/threonine protein phosphatases 1 and 2A (Kuiper-Goodman et al., 1999). After the ingestion of MC-containing cyanobacteria, acute poisoning leading to death from massive hepatic haemorrhage has been reported in animals. A number of incidents of human illness have been attributed to microcystins in

drinking water or at recreational sites (Kuiper-Goodman et al., 1999). Chronic ingestion of sublethal doses has been further epidemiologically linked to primary liver cancer and colorectal cancer in humans (Zhou et al., 2002).

Lake Victoria and its catchments have undergone eutrophication over the last three decades (Verschuren et al., 2001). Based on microscopical numeration of phytoplankton, increased cyanobacterial abundances were reported (Ochumba & Kibaara, 1989; Lung'aiya et al., 2000). In 1984 massive fish kills were observed in the Nyanza Gulf of Lake Victoria, Kenya, which coincided with the occurrence of cyanobacteria (Ochumba, 1990). No efforts were made to identify microcystins. In the Lake Victoria region, 4% of all households in the Kisumu district have been estimated to use lake water for drinking purposes (Some & Omurwa, 1994). This study aimed at assessing the phytoplankton growth in relation to environmental factors, assessing whether the potential MC producers occur in the Mwanza Gulf and whether or not they produce MC.

Materials and methods

Sampling was performed weekly from May 21st until August 20th, 2002 in the Mwanza Gulf of Lake Victoria (Tanzania, surface 500 km², max. depth 18 m). One sampling site was inshore (3 m depth, 02 30.555 S, 32 53.863 E) near the confluence where the Mirongo River meets the lake. The river is known to carry municipal wastes from the town of Mwanza and from Bugando, the main governmental hospital. The other sampling site was offshore (18 m, 02 29.384 S, 32 35.210 E), which is thought to be less influenced by eutrophication.

A 4 l Van Dorn water sampler was used to obtain samples at a depth of 1 m and to integrate samples by collecting 2 l at 1 m intervals from the surface to the sediment. In the laboratory, samples for nutrient analysis were filtered using a water jet vacuum pump at low pressure through 0.45 µm membrane filters (VWR, Austria). For the analysis of microcystins 0.5 l of each sample was filtered onto glass fibre filters (GF/C, Whatman, UK). The filters were dried at 60 °C for several days and stored dry in a desiccator until analysis. The soluble reactive phosphorus (SRP) was determined

using the ammonium molybdate method (Wetzel & Likens, 2000). Nitrate (NO₃-N) was determined using the sodium-salicylate method (Müller & Wiedemann, 1955). The ammonium (N-NO₄) analysis was based on the formation of indophenol blue (Krom, 1982). Due to technical problems only the samples from the months of July and August were analysed for ammonia.

Phytoplankton was identified using the standard literature and the identification of cyanobacteria was achieved using the taxonomical criteria of Talling (1987) and Komarek & Kling (1991). At least 400 specimens of the few dominant species were counted from Lugol fixed samples following the methods of Utermöhl (1958). The species were counted as single cells (*Anabaena*, *Microcystis*, *Nitzschia*), filaments (*Planktolyngbya*) or colonies (*Aphanocapsa*). Measurements of cell length and width were determined from 20 randomly selected specimens from the dominant species and the volumes were calculated by assuming a geometric shape. The biovolume was then calculated by multiplying the mean cell volume by cell density (Wetzel & Likens, 2000).

The extraction of microcystins was performed according to Fastner et al. (1998) and the analysis was done using high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) as described (Kurmayer et al., 2003). Microcystins were identified by their characteristic absorption spectra (original spectrum and first order derivative) and retention times (Fastner et al., 1999). In addition, dried HPLC-fractions of putative MCs were analysed for their positive ion mass spectra using a matrix assisted laser desorption-time of flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) as described previously (Kurmayer et al., 2004). MC variants were identified by way of PSD fragment structure analysis (Fastner et al., 1999).

Results and discussion

The offshore water temperature (at 1 m depth) decreased slightly from 24.8 to 23.9 °C throughout the sampling period. The water column was never stratified. The decline in water temperature during the dry season may have resulted from the upwelling of cold water into the gulf from the deep

layers of the lake due to strong seasonal southeastern winds (Akiyama et al., 1977). The pH values ranged between 7.4 and 7.8 during the study period at both stations. Secchi depth (Fig. 1(a)) was significantly lower inshore (0.95–1.9 m) than offshore (1.1–3.4 m, Mann–Whitney Rank Sum Test, $p = 0.002$, $n = 12$). SRP and nitrate concentrations ranged between 36–127 and 35–726 $\mu\text{g l}^{-1}$ each, and it is concluded that phytoplankton growth was not limited by SRP or nitrate. The maximum nitrate concentration (726 $\mu\text{g l}^{-1}$) was recorded inshore in May directly after the rainy season (Fig. 1(b), (c)). Throughout the study period SRP and nitrate concentrations were significantly higher inshore than offshore (Mann–Whitney Rank Sum Test, $p = 0.036$, $n = 13$ for SRP and $p < 0.001$,

$n = 12$ for nitrate). The earlier investigations by Akiyama et al. (1977) showed much lower SRP values ($<15 \mu\text{g l}^{-1}$) and nitrate concentrations (mostly $<5 \mu\text{g l}^{-1}$). The results correspond to the general view of ongoing eutrophication in Lake Victoria throughout the last few decades. The higher values of SRP inshore as compared to the open water could be due to the contamination of the water by phosphate rich detergents since activities such as bathing and washing around the lakeshores were observed during the period of investigation. The highest nitrate concentrations that were found during the months of May and June immediately after the rainy season may be attributed to terrestrial run off as has been suggested by Ochumba & Kibaara (1989).

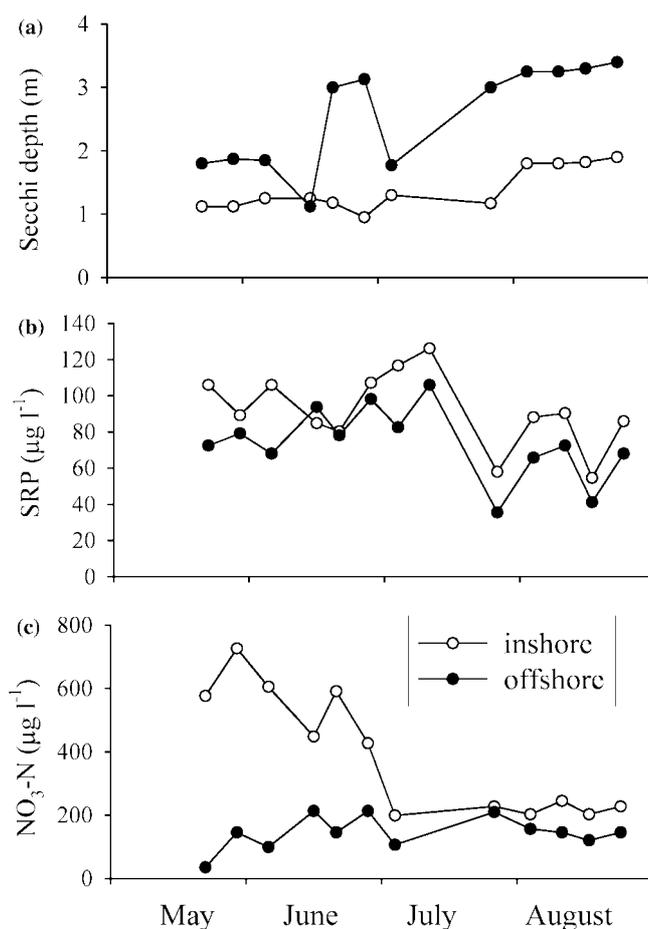


Figure 1. (a) Secchi disks readings during the sampling period inshore (white) and offshore (black) in Mwanza Gulf (Tanzania) from May until August 2002. (b) Concentrations of soluble reactive phosphorous (SRP). (c) Concentrations of nitrate ($\text{NO}_3\text{-N}$) during the same period.

In contrast to SRP and nitrate, the ammonium concentrations were significantly higher in the open water ($12.6\text{--}54.5\ \mu\text{g l}^{-1}$) than inshore ($0.4\text{--}11.6\ \mu\text{g l}^{-1}$, Mann–Whitney Rank Sum Test, $p = 0.008$, $n = 5$). The oxidation of $\text{NH}_4\text{-N}$ to $\text{NO}_3\text{-N}$ depends on the availability of dissolved oxygen, however oxygen was not limiting over the total water column (data not shown). Consequently, the upwelling phenomena of water from deeper layers with low oxygen values may not only cause a mixed water column water column, but also contribute to the higher $\text{NH}_4\text{-N}$ concentration offshore.

In general algal biovolume was low over the entire study period ($0.6\text{--}8.1\ \text{mm}^3\ \text{l}^{-1}$). Bacillariophyceae (*Nitzschia acicularis* (Kützing) W. Smith and undetermined centric diatoms being the most abundant species) contributed most of the biovolume of total phytoplankton with biovolumes ranging from $0.2\text{--}7.5\ \text{mm}^3\ \text{l}^{-1}$ (Fig. 2). *N. acicularis* dominated the phytoplankton biovolume frequently at both stations (5–90%). Cyanobacterial biovolume was higher at the beginning of the sampling period in May, decreased until June and started to increase again towards July. The genus *Planktolyngbya* contributed the largest proportion to total phytoplankton (3–37%). *P. undulata* J. Komarék & H. Kling and *P. circumcreta* G.S. West were the most abundant. *Aphanocapsa* sp. made up 1–39% of the total phytoplankton biovolume. The proportions of the genera known to produce microcystins *Microcystis* and *Anabaena* were 0–5% and 0–2.5%, each. Cryptomonads were mainly composed of *Cryptomonas* sp. in the size class $<10\ \mu\text{m}$ and made up 0–30% of the total phytoplankton. In general there were no significant differences in phytoplankton composition between the offshore and inshore and no accumulation of cyanobacteria was observed in the surface layers when compared with the total water column.

In contrast to the dominance of *N. acicularis*, Akiyama et al. (1977) found *Melosira*, *Nitzschia* and *Surirella* much more abundant in the Mwanza gulf. These results confirm the general species change in the phytoplankton composition in Lake Victoria (e.g. Verschuren et al., 2001). Within cyanobacteria, *Anabaena*, *Microcystis*, *Merismopedia*, *Aphanocapsa* and *Planktolyngbya* not only have been found in this study but have also been

reported from earlier investigations (Talling, 1966; Akiyama et al., 1977; Komarek & Kling, 1991). Notably the cyanobacterial cell numbers were rather low, although environmental factors in general were found to be suitable in favour of the growth of cyanobacteria. This indicates that the algal growth was probably limited by other factors apart from SRP, $\text{NO}_3\text{-N}$ and temperature. The mean depth of the lake is 40 m and it is speculated that the prevalence of the strong seasonal south-eastern winds not only prevented the water column from stratifying down to 40 m, but also kept the average light dose of the individual cell to a limiting level.

In most samples, no microcystins were detected. However in one sample from offshore on July 2nd, 2002 (at the surface) a MC with a retention time of 14.21 min was detected. The spectrum showed a close match with [Asp³]-microcystin-RR available from the spectrum library (data not shown). MALDI-TOF MS analysis of the fractionated peak also identified the MC as [D-Asp³]-MC-RR (molecular weight 1024 dalton) and with regard to the retention time in HPLC the MC was determined as [Asp³, Dhb⁷]-MC-RR. The concentration was 992 ng MC-LR equivalents l^{-1} . Both genera *Anabaena* and *Microcystis* have been shown to produce MC (Sivonen & Jones, 1999). Future work should also include the determination of MC cell quotas both from field samples and from isolates grown in culture. To exclude a possible bias due to the selective cultivation of specific genotypes (i) colonies may be directly isolated from the field and analysed using MALDI-TOF (Kurmayer et al., 2002) and/or (ii) samples with a higher biovolume of either *Microcystis* or *Anabaena* may be collected over the season and analysed for MC production. Talling (1966) observed the occurrence of the cyanobacterial maximum in Lake Victoria during November and January and Akiyama et al. (1977) observed that *Anabaena* cell numbers were extremely high in November 1973 at the surface, i.e. $5.6 \times 10^8\ \text{cells l}^{-1}$ as compared to $1.3 \times 10^6\ \text{cells l}^{-1}$ observed on July 24th at the surface in open water during this study. During the period from November to January, the water is calmer than during the period from May until August and cyanobacteria should be able to accumulate at

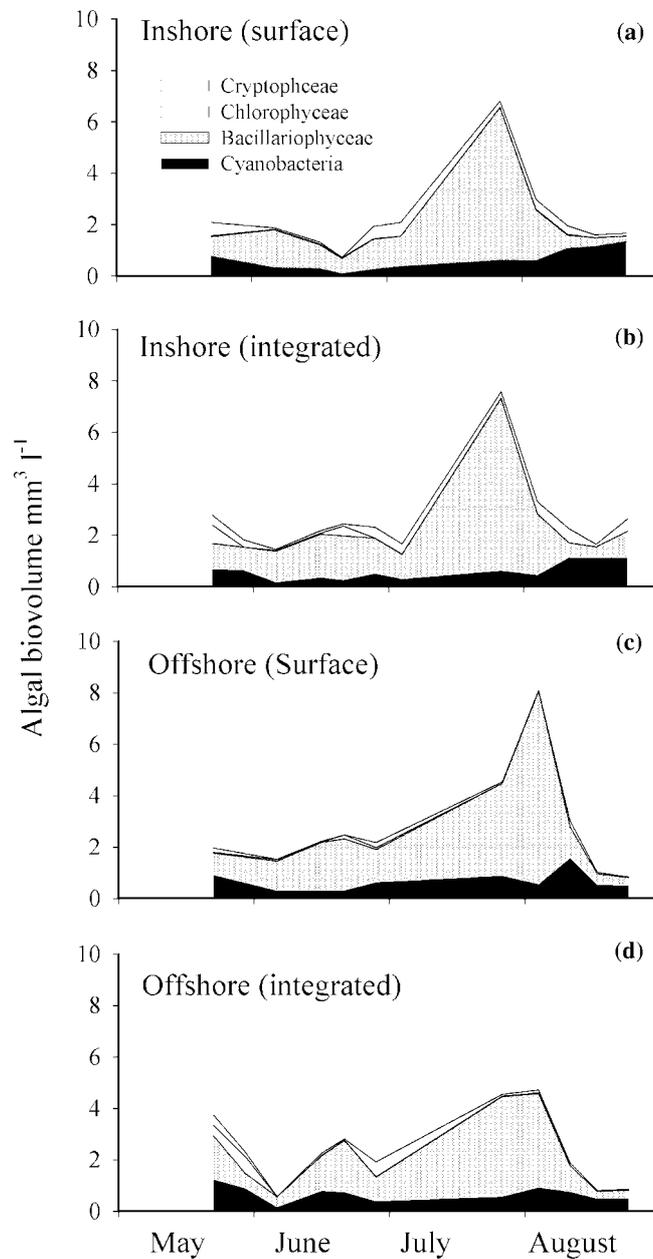


Figure 2. Phytoplankton biovolume and major algal composition at the surface inshore (a) and offshore (b) and integrated over the water column inshore (c) and offshore (d) in the Mwanza Gulf from May until August 2002. Only cyanobacteria (black), diatoms (hatched) and cryptomonads (white) contributed significantly to algal biovolume.

the surface due to their natural buoyancy and gain a selective advantage compared to other phytoplankton. It is possible that the period of higher cyanobacterial biovolumes has been missed during the sampling period of this study.

Acknowledgements

The data reported in this study originated from the MSc thesis submitted by B. C. S. to the International Institute for Infrastructural Hydraulic and

Environmental Engineering (IHE, Delft). We are grateful to Gerold Winkler and Sabine Wanzenböck for their outstanding organisation of the IPGL course at the Limnological Institute in Mondsee, Austria. This study was funded by the Austrian Academy of Sciences and by The Netherlands Fellowship Programme (NFP). We are grateful to one anonymous referee for his helpful suggestions. Special thanks goes to the centre director of TAFIRI (Tanzania Fisheries Research Institute) Mwanza, Mr Katunzi for making the facilities and accommodation at the institute available. Thanks to Wabeya and Jongo for their assistance during the fieldwork. B. C. S. would like to mention Ms Joyce Nyaugu, Angel, Sabintina, Mr Semvu, Sabuni, Mussa who made her stay rather comfortable in Mwanza. We are grateful to Jutta Fastner for the MALDI-TOF identification of microcystin.

References

- Akiyama, T., A. Kajumulo & S. Olsen, 1977. Seasonal variations of plankton and physicochemical condition in Mwanza Gulf, Lake Victoria. *Bulletin of Freshwater Fisheries Research Laboratory* 27: 49–60.
- Carmichael, W. W., V. Beasley, D. L. Bunner, J. N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K.-I. Harada, T. Krishnamurthy, Y. Min-Juan, R. E. Moore, K. Rinehart, M. Runnegar, O. M. Skulberg & M. Watanabe, 1988. Naming cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26: 971–973.
- Fastner, J., M. Erhard, W. W. Carmichael, F. Sun, K. L. Rinehart, H. Röncke & I. Chorus, 1999. Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Archiv für Hydrobiologie* 145: 147–163.
- Fastner, J., I. Flieger & U. Neumann, 1998. Optimised extraction of microcystins from field samples – a comparison of different solvents and procedures. *Water Research* 32: 3177–3181.
- Komarek, J. & H. Kling, 1991. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). *Algalogical Studies* 61: 21–45.
- Krom, M. D., 1982. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Bertholet reaction using salicylate and dichlorisocyanurate. *The Analyst* 105: 305–316.
- Kuiper-Goodman, T., I. Falconer & J. Fitzgerald, 1999. Human health aspects. In Chorus, I. & J. Bartram (eds), *Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. WHO, E & FN Spon, London: 113–153.
- Kurmayer, R., G. Christiansen & I. Chorus, 2003. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 787–795.
- Kurmayer, R., G. Christiansen, J. Fastner & T. Börner, 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp., *Environmental Microbiology* 6: 831–841.
- Kurmayer, R., E. Dittmann, J. Fastner & I. Chorus, 2002. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany), *Microbial Ecology* 43: 107–118.
- Lung'aya, H. B. O., A. M'Harzi, M. Tackx, J. Gichuki & J. J. Symoens, 2000. Phytoplankton community structure and environment in the Kenyan waters of lake Victoria. *Freshwater Biology* 43: 529–543.
- Müller, R. & O. Wiedemann, 1955. Die Bestimmung des Nitrations im Wasser. *Vom Wasser* 22: 247–271.
- Ochumba, P. B. O., 1990. Massive fish kills within the Nyanza Gulf of lake Victoria, Kenya. *Hydrobiologia* 208: 93–99.
- Ochumba, P. & D. Kibaara, 1989. Observations on blue-green algal blooms in the open waters of Lake Victoria, Kenya. *African Journal of Ecology* 27: 23–34.
- Sivonen, K. & G. Jones, 1999. Cyanobacterial toxins. In Chorus, I. & J. Bartram (eds), *Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. WHO, E & FN Spon, London: 41–112.
- Some, E. & T. Omurwa, 1994. Seasonality and community's satisfaction with sources of domestic water in the Lake Victoria basin. *Eastern African Medical Journal* 71: 39–41.
- Talling, J. F., 1987. The phytoplankton of Lake Victoria (East Africa). *Archiv für Hydrobiologie Beiheft Ergebnisse der Limnologie* 25: 229–256.
- Talling, J., 1966. The annual cycle of stratification and phytoplankton growth in Lake Victoria (East Africa). *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 51: 545–621.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 2: 1–38.
- Verschuren, D., T. C. Johnson, H. J. Kling, D. N. Edgington, P. R. Leavitt, E. T. Brown, M. R. Talbot & R. E. Hecky, 2001. History and timing of human impact on Lake Victoria, East Africa. *Proceedings of The Royal Society of London series B* 269: 289–294.
- Wetzel R. A. & G. E. Likens, 2000. *Limnological analysis*. 3rd edn. Springer Verlag, New York.
- Zhou, L., H. Yu & K. Chen, 2002. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences* 15: 166–171.

Mineral grains in caddisfly pupal cases and streambed sediments: Resource use and its limitation through conflicting resource requirements

Bernhard Statzner¹ and Sylvie Méricoux

CNRS-Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, Université de Lyon I, 69622 Villeurbanne Cedex, France

Maria Leichtfried

Biologische Station Lunz, A-3293 Lunz am See, Austria

Abstract

Sand and fine gravel in streambed sediments are considered to be an overabundant resource for caddisflies that build cases from it. However, larvae of *Rhyacophila* and *Hydropsyche* build pupal cases with material collected near the pupation site and typically attach these cases to cobbles in riffles, where the rapid flow facilitates respiration but decreases the availability of case-building material through erosion. Analyzing mineral grain sizes of the pupal cases and the streambed in samples taken from cobbles in a stream riffle, we found that the overall mass use in pupal cases of *Rhyacophila* and particularly *Hydropsyche* significantly increased with local mass availability of building material, indicating that mineral grains can be a limited resource for these taxa. In addition, the most abundant species (*Hydropsyche siltalai* Döhler) significantly changed the case architecture if the preferred grain fraction (2.5–3.15 mm) was a limited resource. Under resource limitation of the preferred fraction, *H. siltalai* used the 1.6–2-mm fraction instead, which could reduce the resistance of the cases to damage resulting from floods that move coarser bottom material. Our findings suggest that, in streams or near shores of lakes and oceans, water currents that modify grain availability can create conflicts in resource requirements for invertebrates, particularly if they need locally available fine grains for the building, coarse grains for attachment, and high oxygen renewal rates for metabolic needs.

There can be little doubt that resource limitations play a key role in the understanding of the biology and ecology of living systems. Therefore, resource limitations figure prominently in studies that address the potential role of intra- or interspecific competition for resources, which in turn determine niche dimensions, community composition, and diversity (e.g., Begon et al. 1986). Corresponding to the importance of the topic, recent research in limnology and oceanography focused on the question of how seemingly overabundant resources can be limited because subtle constraints interfere with their use. For example, dissolved inorganic carbon (C) in seawater is so abundant, but the discovery of carboxylating enzyme activities suggests that inorganic C may be limiting for marine algae (Buitenhuis et al. 2003; Rost et al. 2003). Likewise, there is growing evidence that the usability of overabundant organic C for aquatic bacteria, zooplankton, and fish depends on size, morphology, mineral composition, toxicity, and/or other biochemical features of the C source (Becker and Boersma 2003; Castillo et al. 2003; Holzman and Genin 2003; Strom et al. 2003). This paper contributes to the research on the subtleties in the use of overabundant resources in aquatic

systems, as it examines the use of seemingly large quantities of sand and fine gravel in streambed sediments by caddisfly larvae that build pupal cases from it.

Building tubes or cases from mineral or organic particles is a technique that is used by a taxonomically diverse group of aquatic animals (Dudgeon 1990). For example, protozoans, rotifers, molluscs, annelids (particularly polychaetes), and arthropods (crustaceans and insects) all have species that build such structures, and the degree of selectivity in the use of particles for building in relation to particle availability has been a major thread in studies of their biology and ecology (Dudgeon 1990). Among the insects, caddisfly larvae build cases from mineral or organic particles that are cemented with silk threads, and this ability is viewed to be a key for the evolutionary success of this order (Mackay and Wiggins 1979).

For a given development stage, the architecture of caddisfly cases is naturally often so typical that it can be used for the identification of families, genera, or even species (e.g., Waringer and Graf 1997). In experiments, however, larvae typically use case-building material that is as close as possible to the preferred one, if the preferred material is not available (Gorter 1931). For example, species building mineral cases will switch to grain sizes near the upper or lower range limit of the unavailable, normally preferred one (Hanna 1961; Tolkamp 1980). If the available grain sizes are too different from the preferred ones or mineral grains are not available in such experiments, the larvae build irregular silk constructions, or, if provided, some (but not all) species use plant material of appropriate size (Haller 1948; Hanna 1961; Tolkamp 1980). In addition, larvae that prefer a particular mineral material (e.g., travertine) may switch to a different

¹Corresponding author (statzner@biomserv.univ-lyon1.fr).

Acknowledgments

We thank Marie-Francoise Arens, Sylvain Dolédec, and Jean-Michel Olivier for help in the field, and particularly Marie-Noelle Truchet, who helped to sort the samples, fractioned them, and accurately determined the dry weight of thousands of grain fractions. We also thank Ferdy DeMoor, Bert Higler, Josef D. Ackerman, and two anonymous referees for comments that improved earlier versions of the manuscript.

mineral (e.g., quartzite) if the preferred one is unavailable (Gaino et al. 2002).

Given that lotic caddisflies in a certain development stage often build cases with a typical architecture, the availability of the preferred mineral case material has been viewed as a limiting factor at the scale of stream or habitat types (e.g., Hanna 1961; Tolkamp 1980). However, lotic larvae that carry their cases with them can migrate $\sim 1\text{--}4\text{ m d}^{-1}$ (Elliott 1971; Jackson et al. 1999) to locations containing the preferred grain size when building cases (Mackay 1977; Podgorny and Nepomnyashchikh 1999) and use few grains from those that are available in their natural habitats (Tolkamp 1980). Therefore, there is no solid evidence that suitable mineral case-building material is limiting to caddisflies in natural streams (Dudgeon 1990). In contrast with these mobile itinerant species, which acquire the building material for their cases where it can be found, other caddisfly species are more resident in that they depend on local grain availability. Among the latter, hydropsychid and rhyacophilid larvae construct an entirely new pupal case immediately before pupation, using sand and fine gravel in the neighborhood (i.e., near the building place; see Materials and methods), where they fix these grains to the surface of coarser particles (Haller 1948; Waringer and Graf 1997). Typically, species of *Hydropsyche* and *Rhyacophila* fix their pupal cases to cobbles in fast-flowing stream riffles (Sattler 1958; Lepneva 1970; Waringer and Graf 1997). Cobble habitats in stream riffles facilitate the provision of abundant oxygen (the fast flow facilitates oxygen uptake) and provide solid surfaces for case attachment, whereas the erosive flow forces prevailing near the bottom of cobbles reduce the amount of sand and fine gravel (Hynes 1970; Newbury and Gaboury 1993). Thus, *Hydropsyche* and *Rhyacophila* potentially have conflicting resource requirements, suggesting that finer mineral grains needed for the construction of the pupal cases could be a limited resource for them. To assess this potential resource limitation, we examined a riffle of a French stream that had abundant populations of *Hydropsyche* and *Rhyacophila* and analyzed mineral grain size in their pupal cases and the streambed (focusing on the most abundant species *H. siltalai* Döhler).

Materials and methods

Study site—We studied a riffle in the Furan River because it had an abundant, monospecific hydropsychid population (*H. siltalai*) that co-occurred with *Rhyacophila*. The studied riffle is described in detail by Statzner and Bretschko (1998) and Statzner et al. (1999). It is situated $\sim 22\text{ km}$ downstream of the principal source of the Furan River. Many groundwater sources feed the stream along its main channel, so the water temperature at the study site is stable and rather low during summer (mean $\sim 12^\circ\text{C}$). At baseflow, the riffle is $\sim 12\text{ m}$ wide and $\sim 0.3\text{ m}$ deep and has a relatively uniform near-bottom flow ($\sim 90\%$ of the near-bottom flow in the shear-stress range $0.8\text{--}2.3\text{ N m}^{-2}$, assessed with FST-hemispheres; Statzner et al. 1991). Previous to and during the period of this study (June to mid-August 1998), the discharge was high in April (maximum: $9\text{ m}^3\text{ s}^{-1}$) and returned to baseflow

in early May. It remained at baseflow until mid-August, so that the daily mean (± 1 standard error; SE) from the beginning of June until mid-August was $0.97 \pm 0.04\text{ m}^3\text{ s}^{-1}$.

The caddisflies: Identification and essentials of their biology—We identified immature pupae using the characteristics of the last larval instar (key: Waringer and Graf 1997) and mature ones using the structure of the genitalia (key: Malicky 1983). *H. siltalai* was the only hydropsychid at our site, whereas identifications of rhyacophilid pupae were difficult (see below).

Larvae of *Hydropsyche* migrate before they start to build their pupal cases, using the surface of larger particles (e.g., cobble) as foundations (i.e., bedplate). Observations by Haller (1948) and Sattler (1958) suggest that the larvae never leave their building site and collect the building material for the entire case from a surface of $\sim 15\text{ cm}^2$. However, Mogel et al. (1985) observed that larvae make short excursions into the neighborhood of their building site to collect sand and fine gravel. The larvae need $\sim 1\text{ d}$ to construct their pupal cases (Sattler 1958; Mogel et al. 1985). The final products are domed cases on larger bedplates, with the domes made of mineral grains that are cemented together with silk threads. Depending on the temperature, pupae emerge after $\sim 2\text{--}4$ weeks (Schuhmacher 1970).

We used data from our study site that were collected previously (Statzner and Bretschko 1998; Statzner et al. 1999) to obtain site-specific information on pupae of *H. siltalai*. In samples covering a gradient of near-bottom baseflow conditions, the pupal case density of *H. siltalai* increased with shear stress so that the highest pupal densities occurred across a shear-stress range of $\sim 1\text{--}2.5\text{ N m}^{-2}$. This shear-stress range is critical for sand and fine gravel, as it erodes mineral particles with an approximate diameter of <1 to $<2.5\text{ mm}$ (Newbury and Gaboury 1993). Inspecting pupal cases collected in these previous studies, we noticed variation of individual pupal case masses in individual samples, which was not caused by the sex of the pupae (*U*-test on 33 females vs. 33 males: $p = 0.63$). Assessing this variation using Monte Carlo simulations showed that it would require ≥ 10 cases to estimate mean case mass with an error $< 5\%$. Knowing that *H. siltalai* was always abundant at the study site (during our study, 250.0 ± 18.9 (mean ± 1 SE) pupal cases m^{-2}), ≥ 10 cases could be obtained by sampling a relatively small bottom area.

The two rhyacophilid species occurring in the Furan River are from the subgenus *Rhyacophila* sensu stricto, which build pupal cases resembling that of *Hydropsyche* (Waringer and Graf 1997). Confirmed species identifications of larvae are currently impossible in this subgenus (Waringer and Graf 1997), so it was impossible to assign prepupae or immature pupae (from the larval exuviae) to species using larval characteristics, and we refer to all pupae (including mature ones) as *Rhyacophila* spp. Among the mature pupae, $\sim 70\%$ were *Rhyacophila dorsalis* Curtis and the others were *Rhyacophila fasciata* Hagen. Prepupae and pupae of *R. dorsalis* and other *Rhyacophila* species can be found over many months of the year (Cereghino et al. 1997; Sangpradub et al. 1999). In our study, these two rhyacophilids had a mean density of 99.3 ± 7.2 pupal cases m^{-2} .

Beyond these hydropsychids and rhyacophilids, mineral pupal cases of other caddisflies species were found (mean density: 136.7 ± 12.6 pupal cases m^{-2}). These species were *Odontocerum albicorne* (Scopoli) (Odontoceridae), *Potamophylax cingulatus* (Stephens) (Limnephilidae), *Potamophylax luctuosus* (Piller and Mitterpacher), and *Silo nigricornis* (Pictet) (Goeridae). All these species pupate in their larval cases, which are built with material distant from the pupation site throughout later stages of their larval life (Lepneva 1971; Waringer and Graf 1997).

Sampling and analyses—To have a sufficient number of samples with large numbers of *H. siltalai* pupal cases, the riffle in the Furan River was stratified and cobble substrates with a shear stress >0.8 N m^{-2} (assessed with FST-hemispheres; Statzner et al. 1991) were randomly sampled. It is important to note that cobble substrate alone does not imply complete absence of finer sediments, as smaller patches of sand and finer gravel occurred locally among the cobbles. Fifty samples were taken on each of two occasions during the period of highest pupal density (16 June and 10 July 1998). Furthermore, 30 samples were collected during each of the three subsequent months, but only the samples collected on 7 August 1998 contained sufficient identifiable pupal cases to be included in our analyses.

The area of each sample was marked with a metal frame (0.3 m \times 0.2 m) and a net with a fine mesh size (0.1 mm²) was positioned downstream of the frame. The surface layer and approximately the first subsurface layer of cobbles were carefully removed from the frame (note that deeper layers had cobble interstices filled with finer sediments and lacked caddisfly pupal cases), and all finer sediments from these layers were retained with the net. Obviously, not all of these finer sediments were really accessible for caddisflies, which makes our tests of resource limitation more conservative. The silk of the pupal cases attaching them to the cobble surfaces was cut using sharp knives, so that the entire cases could be conserved in ethanol (70%).

In the laboratory, the pupal cases of each sample were sorted and identified. Fragments of empty pupal cases were also sorted and other case-bearing caddisflies were removed from the sample. The silk of the cases was dissolved using a NaOH solution and the case material was dried for 48 h at $105^{\circ}C$. Likewise, the remaining sediment of the sample was dried. The dried case material (pooling all cases per taxon and sample) and the dried remaining sediments were separated with a set of 13 sieves having a mesh size range of 5– 0.125 mm, and each fraction was weighted. We followed the suggestion of Leichtfried (1986) and transformed the mass values to the number of grains per sieved fraction assuming a grain density of 2.7 g cm^{-3} , a spherical grain shape, and a mean grain mass per fraction (as mean of the upper and lower size limit of the fraction). Both *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp. sometimes built their cases among larger gravel (using these as foundation for the case). Assuming that the larvae were unable to collect this larger gravel, we ignored the material >5 mm in our analyses.

We used all the remaining sediments of a sample, plus the fragments of empty pupal cases, plus half of the material used in the pupal cases of *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp.

to determine a building-material availability measure. The rationale for this calculation related to the observation that the pupal cases of both taxa in a sample could contain all development stages (larva to mature pupa). Thus, some of the cases were built shortly before sampling, whereas others were built weeks before sampling, i.e., the latter should have had material available for building that was unavailable for the former. Therefore, adding half of the material found in the pupal cases of *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp. to the available sediment quantities was an arbitrary correction for the temporal differences in building activities.

Overall, we could analyze sediment use and availability for 129 samples (we lost one sample through a mishap). However, when analyzing case architecture, we avoided additional scatter created by interindividual case variability (see above, Monte Carlo simulations) by reducing the data to samples having ≥ 10 pupal cases of *H. siltalai* (77 samples) or ≥ 8 pupal cases of *Rhyacophila* spp. (many samples had 8 cases, so that we could analyze 39 samples including them). We used Systat-10[®] for (1) Kruskal-Wallis tests in comparisons among sampling dates, (2) regression analyses of relations between material availability and use and of relations between the use of particular grain fractions, and (3) multiple stepwise forward regression to check if grain use by *H. siltalai* interfered with that by *Rhyacophila* spp. or vice versa (independent variables: availability of each grain fraction and its use by the other taxon). Normalized principal component analysis (PCA) (Thioulouse et al. 1997; ADE-4 2001 Release) served for the assessment of correlations among grain fractions in terms of availability or use.

Results

The overall quantities of mineral grains in the size range used in the pupal cases (Table 1) did not differ significantly among the three sampling dates in terms of grain availability (Kruskal-Wallis test, assuming a Chi-square distribution with 2 degrees of freedom here and below, and indicating the Kruskal-Wallis test statistic associated with the p -value; grain mass: $p = 0.31$, 2.36; number of grains: $p = 0.85$, 0.33), pooled grain use by *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp. ($p = 0.55$, 1.18; $p = 0.45$, 1.58), and grain use by *H. siltalai* ($p = 0.78$, 0.51; $p = 0.21$, 3.12). Whereas one would expect temporal variation in sediment availability and use for three sampling dates covering a period of ~ 2 months, the Furan River remained at baseflow throughout our study period (i.e., we had no sediment changes or pupal mortality through flood disturbances) and the relatively low summer temperature of the Furan River slowed the pupal development. Regardless, temporal differences of grain use by *Rhyacophila* spp. were significant for grain mass ($p = 0.02$, 7.51) but insignificant for the number of grains used ($p = 0.38$, 1.94). Given these findings, we pooled data from all three sampling dates for subsequent analyses.

Overall pupal case architecture and grain availability—On average, *Rhyacophila* spp. had heavier pupal cases than *H. siltalai* (Fig. 1a). Grains >2 mm contributed most to the mean case mass of both taxa. *Rhyacophila* spp. also used more grains in the pupal cases than *H. siltalai* (Fig. 1b), with

Table 1. Overall mass and number of mineral grains (mean \pm 1 SE) in the size range (0.125–5 mm) used in the pupal cases by *Hydropsyche siltalai* and *Rhyacophila* spp. on three sampling occasions in 1998.

	16 Jun ($n=50$)	10 Jul ($n=49$)	7 Aug ($n=30$)
Grain mass (kg m^{-2})			
Availability	1.708 \pm 0.127	1.656 \pm 0.127	1.932 \pm 0.153
Use by <i>H. siltalai</i>	0.121 \pm 0.014	0.124 \pm 0.014	0.112 \pm 0.020
Use by <i>Rhyacophila</i> spp.	0.081 \pm 0.009	0.049 \pm 0.005	0.062 \pm 0.007
Number of grains ($\times 10^7 \text{m}^{-2}$)			
Availability	1.6578 \pm 0.1990	1.6925 \pm 0.1943	1.8329 \pm 0.2694
Use by <i>H. siltalai</i>	0.0056 \pm 0.0008	0.0084 \pm 0.0010	0.0073 \pm 0.0016
Use by <i>Rhyacophyila</i> spp.	0.0039 \pm 0.0009	0.0023 \pm 0.0002	0.0047 \pm 0.0010

grains < 1 mm contributing most to the overall number of grains in the cases of both taxa.

On average, across the grain-size range used in the pupal cases by *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp., ~ 1.7 kg or $\sim 1.7 \times 10^7$ grains m^{-2} were available for them (Fig. 2). In terms of grain mass, $\sim 50\%$ each were available as grains < 2 or > 2 mm. In terms of number of grains, grains > 1 mm were rare compared with smaller grains (Fig. 2).

Grain availability and use: *H. siltalai* versus *Rhyacophila* spp.—The mass of grains used by *H. siltalai* increased significantly with the available mass of grains in the size range used in the pupal cases (Fig. 3a). Although mass use by *Rhyacophila* spp. also increased with mass availability, this relation was less meaningful (Fig. 3b). As illustrated by Fig. 1, the number of grains in finer fractions was high and rather variable in pupal cases of *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp., whereas the mass of these finer fractions was unimportant in their cases. Plotting use versus availability of the number of grains for all 129 samples (not shown here), the data scattered more in comparison with the mass plot (see Fig. 3), and the regression between use and availability of the number of grains had a relatively low significance level (*H. siltalai*: $F_{1,127} = 4.9$, $p = 0.03$, $r^2 = 0.04$) or was insignificant (*Rhyacophila* spp.: $F_{1,127} = 2.2$, $p = 0.14$, $r^2 = 0.02$). Thus, we focus the analyses in subsequent sections on grain

mass and assess the number of grains only in visualizations of case architectures.

The similarity of the cumulative distributions of mass use over grain size in *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp. (Fig. 1) suggests that both taxa potentially competed for similar building material. On average, *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp. used ~ 15 – 20% of the available mass of the 2.5–4-mm grain fraction in the pupal cases at elevated case densities (Fig. 4a). However, a certain (but unknown) proportion of the individuals of *Rhyacophila* spp. could have built the pupal cases before *H. siltalai* started to build theirs (see Materials and methods), i.e., we assume at least some temporal segregation of building activities between these two taxa.

Mass use of the various grain-size fractions by one of these two taxa was primarily related to grain-size availability and not ($p > 0.05$; multiple stepwise forward regressions with varying degrees of freedom) to grain-size use by the other taxon. Overall, however, we never observed an elevated grain mass use of both taxa at the same location (Fig. 4b), i.e., the grain mass in pupal cases of *Rhyacophila* spp. was high when that in the cases of *H. siltalai* was relatively low and vice versa.

Grain availability and case architecture—The mean total mass of *H. siltalai* pupal cases decreased with decreasing available mass case $^{-1}$ in the 77 samples having ≥ 10 cases. However, this decrease was not significant ($F_{1,75} = 1.5$, $p = 0.23$, $r^2 = 0.02$).

Analyzing grain-size fractions using the samples with ≥ 10 cases, normalized PCA illustrates that the mass per

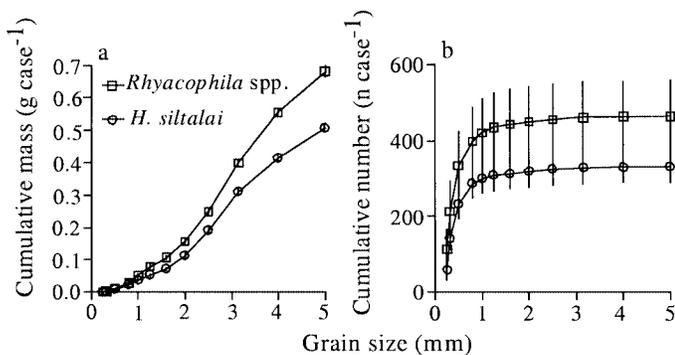


Fig. 1. Overall architecture of pupal cases of *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp., showing mean \pm 1 SE of the cumulative (a) mass and (b) number of grains for all samples each taxon was found (samples per taxon: *H. siltalai*: 110; *Rhyacophila* spp.: 121). Here and in subsequent figures, grain size indicates the upper size limit of a given fraction.

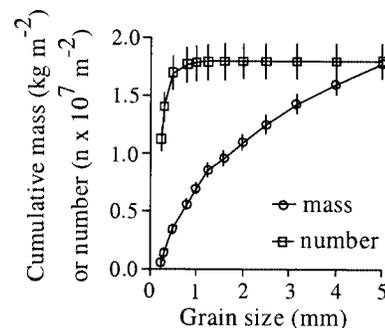


Fig. 2. Overall grain availability across the grain-size range used in the pupal cases (see Fig. 1), showing mean \pm 1 SE of the cumulative mass and number of grains for all 129 samples.

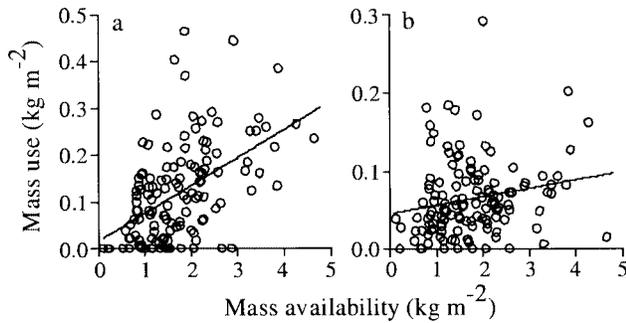


Fig. 3. Mass availability and use by (a) *H. siltalai* and (b) *Rhyacophila* spp. across the entire grain-size range (0.125–5 mm) used in the pupal cases (including all 129 samples; note the differently scaled y-axes). Statistics (± 1 SE) are: (a) $y = 16.8 \pm 17.3 + (0.059 \pm 0.009)x$, $F_{1,127} = 44.7$, $p < 10^{-9}$, $r^2 = 0.26$; and (b) $y = 45.6 \pm 9.4 + (0.011 \pm 0.005)x$, $F_{1,127} = 5.0$, $p = 0.03$, $r^2 = 0.04$.

grain fraction available for *H. siltalai* correlated more among fractions of similar grain size than among fractions of different grain size (Fig. 5a). Therefore, PCA ordinated the availability of fractions gradually in the order of grain size (Fig. 5a). In contrast, correlations among the mass of the grain fractions used by *H. siltalai* formed three distinct groupings (Fig. 5a), indicating a correlated use of grain fractions within each of them. The directions of the arrows in the three groupings illustrate that samples with an elevated mean mass in the grain size 2.5–5 mm had less mass in the size 1.25–2 mm and vice versa, whereas use in the size 0.25–1.25 mm was intermediately correlated with the two other groupings (Fig. 5a).

The correlated use of grain fractions within each of the three groupings illustrated by Fig. 5a suggests analyzing grain mass use versus availability for these three groupings. Alternatively, Fig. 5a indicates that one could focus on a representative fraction of each grouping, e.g., on the three fractions that were the most distant among each other in the PCA on grain use (2.5–3.15 mm; 1.6–2 mm; 0.315–0.5 mm). Here, we communicate the analyses on these three fractions, as they provided the most significant results and clearest patterns.

The relation between the mean used and available mass case⁻¹ for the 2.5–3.15-mm fraction was by far the most significant ($F_{1,75} = 22.9$, $p = 0.000008$, $r^2 = 0.23$) among all 12 individual fractions assessed by us. In this fraction, use increased logarithmically with availability (Fig. 5b). Likewise, use increased logarithmically with availability in the 0.315–0.5-mm fraction, but use of the 1.6–2-mm fraction was not related to availability (Fig. 5b), rather it decreased significantly in a linear relation with use of the 2.5–3.15-mm fraction (Fig. 5c). Furthermore, use of the 0.315–0.5-mm fraction increased linearly with use of the 1.6–2-mm fraction (Fig. 5c).

To translate these assessments of grain-fraction masses into a statistically based visualization of changes in case architecture, we used the relations shown in Fig. 5c, plus other relations between the use of other fractions and the use of the three fractions included in Fig. 5c. We solved this set of regression equations starting with the relation between use

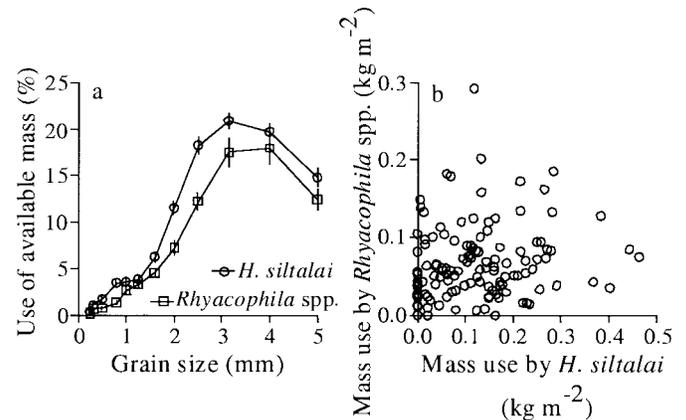


Fig. 4. (a) Mean (± 1 SE) percentage of available mass of grain fractions used in the pupal cases by *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp. if these were abundant (*H. siltalai* ≥ 10 cases per sample, i.e., $n = 77$; *Rhyacophila* spp. ≥ 8 cases per sample, i.e., $n = 39$). (b) Mass use by *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp. across the entire grain-size range (0.125–5 mm) used in the pupal cases (including all 129 samples; note the differently scaled axes).

and availability of the 2.5–3.15-mm fraction to obtain the mass of this fraction that was used at the lowest and highest availability shown in Fig. 5b. Based on these two extreme uses of the 2.5–3.15-mm fraction, we subsequently calculated the grain mass used in all other fractions. We transformed grain mass to number of grains, rounding decimals to the nearest integer. Using the median size of each fraction as grain diameter, we thus could visualize case architecture for the two situations by arranging the grains in a shape corresponding to that of a *Hydropsyche* pupal case (Fig. 6).

At both lowest and highest availability of the 2.5–3.15-mm fraction, *H. siltalai* used 265 grains of identical size from different grain fractions (Fig. 6). To these, it added two grains of the 2.5–3.15-mm fraction and one grain of the 3.15–4-mm fraction if the availability of the 2.5–3.15-mm fraction was the highest. At the lowest availability of that fraction, it added 29 smaller grains instead. As a result, if all grains would be in contact with other grains and finer grains would be arranged among coarser grains, the pupal case would be larger and would have a better mixture of coarser and finer grains at the highest if compared with the lowest availability of the 2.5–3.15-mm fraction (Fig. 6). Alternatively, for a similar case size, the gaps among the grains would be larger at the lowest if compared with the highest availability of the 2.5–3.15-mm fraction.

Given that *Rhyacophila* spp. included two species and that individuals of these species may have built their cases months before they were sampled (see above), it was foreseeable that finer analyses of the case architecture of this taxon would provide less evidence than for *H. siltalai*. Indeed, using the 39 samples with ≥ 8 pupal cases, normalized PCA on grain fraction availability and use by *Rhyacophila* spp. revealed very similar patterns (for both availability and use the pattern resembled the availability pattern shown in Fig. 5a for *H. siltalai*). Therefore, we do not communicate further analyses on grain availability and its use by *Rhyacophila* spp. here.

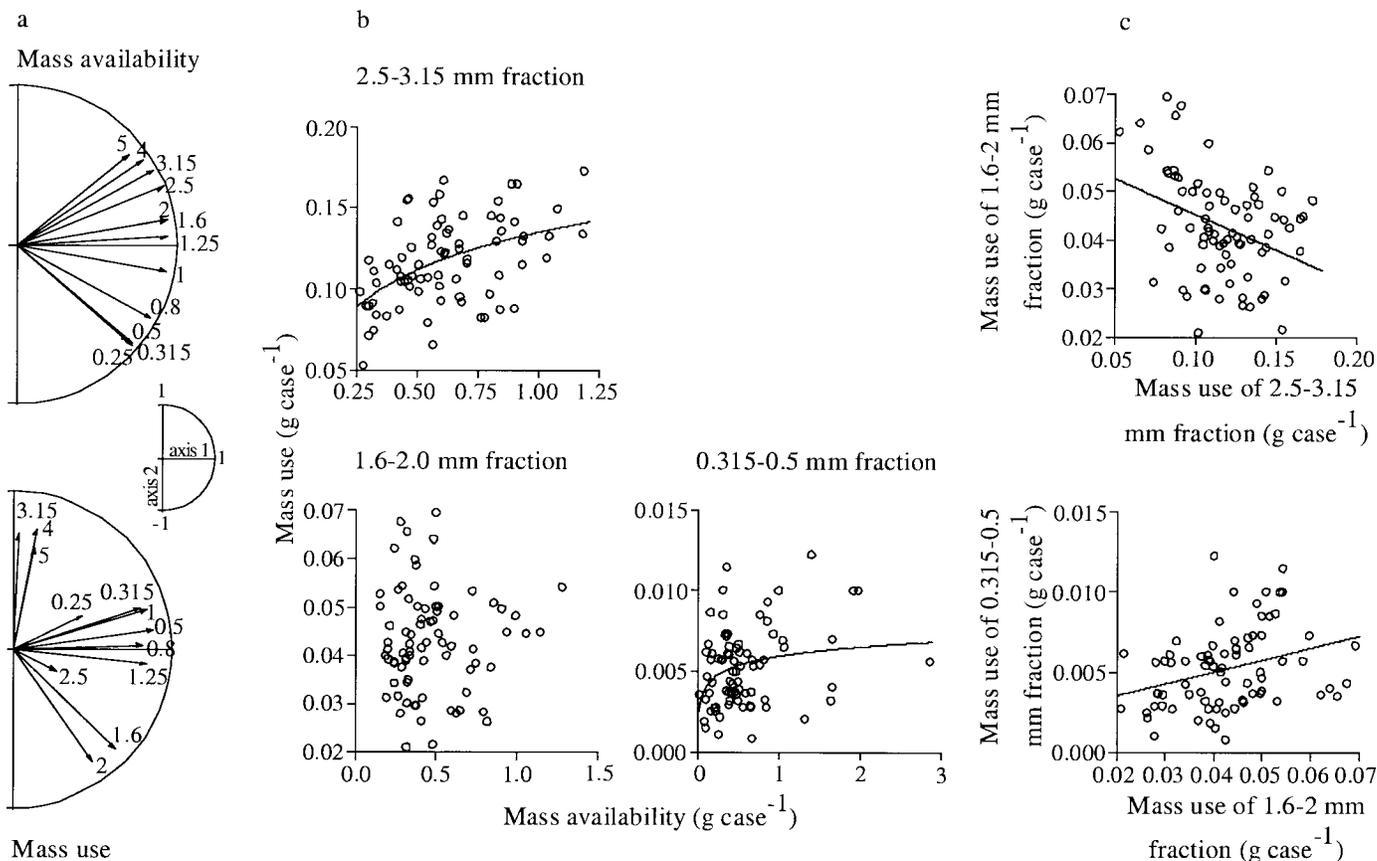


Fig. 5. Grain-fraction mass availability and use in the pupal cases by *H. siltalai* in the 77 samples having ≥ 10 cases per sample. (a) Results of normalized principal component analyses (PCA) of 12 grain fractions for the available and used mass (g case⁻¹), showing only half of the correlation circles (i.e., where the fractions were ordinated; see smaller half of the correlation circle for scales and axes). Long vectors in the same direction indicate positive correlations between fractions, whereas long vectors in the opposite direction indicate negative ones. Inertia related to the first/second axes were 69.4/19.8% for grain availability and 37.1/21.9% for grain use. (b) Relation between grain use and availability for the three size fractions that were the most distant among each other and thus the most representative for each of the three groupings of mass use in Fig. 5a. Statistics (± 1 SE) are: (2.5–3.15 mm) $y = 0.139 \pm 0.005 + (0.033 \pm 0.007) \ln x$, $F_{1,75} = 22.9$, $p = 0.000008$, $r^2 = 0.23$; (1.6–2.0 mm) $F_{1,75} < 0.1$, $p = 0.93$, $r^2 < 0.01$; and (0.315–0.5 mm) $y = 0.0059 \pm 0.0004 + (0.0008 \pm 0.0003) \ln x$, $F_{1,75} = 6.7$, $p = 0.01$, $r^2 = 0.08$. (c) Relations between the use of the three grain-size fractions included in Fig. 5b. Statistics are: (1.6–2.0 vs. 2.5–3.15 mm) $y = 0.060 \pm 0.005 - (0.147 \pm 0.044)x$, $F_{1,75} = 11.4$, $p = 0.001$, $r^2 = 0.13$; and (0.315–0.5 vs. 1.6–2.0 mm) $y = 0.002 \pm 0.001 + (0.074 \pm 0.025)x$, $F_{1,75} = 8.4$, $p = 0.005$, $r^2 = 0.10$.

Discussion

Stratifying our sample universe to cobbles and shear-stress conditions that were critical for sand and fine gravel (Newbury and Gaboury 1993), we assessed locations that were preferred by *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp.. These locations had less building material for their pupal cases in the bed sediments when compared with locations up- and downstream of our studied riffle or near its banks. Despite this shortage of finer sediments, the average availability in the grain-size range used in their pupal cases was $\sim 1.7 \times 10^7$ grains with a mass of ~ 1.7 kg m⁻². Whereas, this appears indeed to be an overabundant resource for the pupal cases of both taxa, at elevated pupal case densities, both taxa used ~ 15 – 20% of some grain fractions (Fig. 4a) and, in extreme cases, *H. siltalai* used even $>50\%$ of a fraction (e.g., 2.5–3.15-mm fraction in Fig. 5b). Given that our sampling technique overestimated grain availability and *Hydropsyche* lar-

vae collect grains from a very small surface in their neighborhood, these values suggest that *H. siltalai* may use certain grain fractions near the limit of their availability. Correspondingly, the increase of the overall mass of the pupal cases with the available mass of building material was more significant in *H. siltalai* than in *Rhyacophila* spp. (Fig. 3).

Thus, why did these larvae not build their pupal cases in slower flowing parts of the Furan River, where building material was very abundant? First, the foundation of the case of *H. siltalai* and *Rhyacophila* spp. is a larger, solid surface, which is typically found on cobbles in fast-flowing riffles. Second, the immobile prepupa of *H. siltalai* is unable to ventilate its case (Sattler 1958) and is a phase with high mortality rates (Schuhmacher 1970), suggesting that passive water renewal in the case is essential for the prepupa; this would also require fast flows near the case front. Because of these conflicting resource requirements, larvae of both

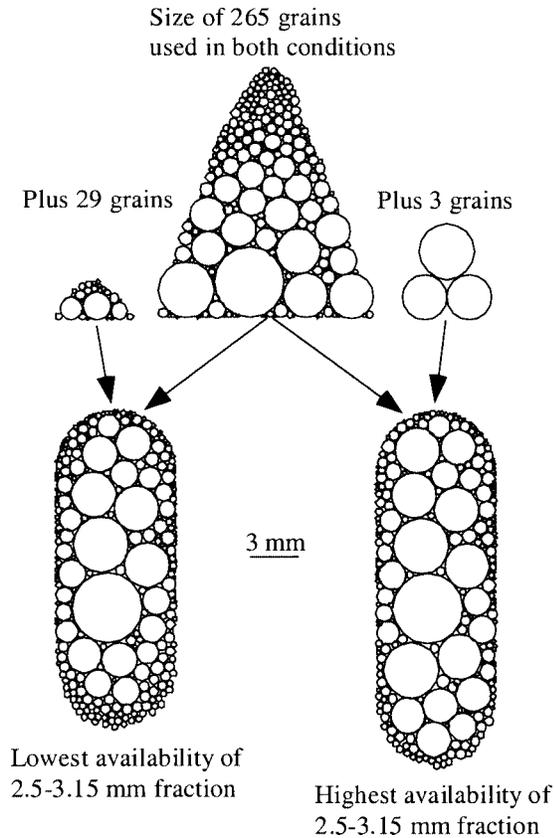


Fig. 6. Visualization of case-building material and case architecture of *H. siltalai* for the lowest and highest availability of the 2.5–3.15-mm grain fraction shown in Fig. 5b (see text for details on the visualization procedure).

taxa had to build pupal cases at locations where building material was rare because of the erosive flow forces, so that the overall case mass depended on the local availability of building material. Similarly, the abundance of lotic midge larvae using fine detritus to build tubes attached to the surface of stones depends significantly on the overall quantities of local building material (Brennan et al. 1978; Brennan and McLachlan 1979). In addition, the upper surfaces of stones and rocks provide other resources (e.g., algae for grazers) that are only temporarily exploited by stream invertebrates because they also have to use the interstitial space of the streambed to satisfy other resource requirements (reviewed in Statzner et al. 1988).

Hydropsyche and *Rhyacophila* larvae could avoid a shortage of building material by building their pupal cases prior to other conspecific larvae or to other species within these taxa, as is done by *R. dorsalis* and other species in this genus (see Cereghino et al. 1997; Sangpradub et al. 1999). Another possibility to avoid a shortage of building material would be to build the pupal case far from locations where other larvae are building pupal cases, which would explain the aggressive interactions between *Hydropsyche* larvae working too close to each other on their pupal cases (Mogel et al. 1985).

For elevated case densities, data on the overall mean case mass of *H. siltalai* do not indicate resource limitations, as mean total case mass did not significantly change with the

locally available mass of building material. In contrast, patterns of grain-size use by *H. siltalai* indicate resource limitations, as the mass of individual grain fractions in the pupal cases changed significantly with local grain availability. In comparison, the finer analysis of the case architecture of *Rhyacophila* spp., i.e., the taxon including two species, provided no evidence for resource limitations, suggesting that such subtle details may be missed if working with groups of species.

However, the changes in grain-size use by *H. siltalai* were not as simple as those reported from laboratory experiments, in which caddisfly larvae switch to grain sizes near the upper or lower range limit of the unavailable, normally preferred range (Hanna 1961; Tolkamp 1980). Clearly, *H. siltalai* used the mass of coarser (>2.5-mm) or intermediate (1.25–2-mm) grains as alternatives in the pupal cases (Fig. 5), but each of these alternatives required the use of finer grains (<1.25 mm, see the intermediate position of finer grains in Fig. 5a). Our data provide evidence that the 2.5–3.15-mm grain fraction was preferred over all other fractions by *H. siltalai*: this fraction (1) produced the steepest slope in the cumulative mass use distribution over grain size (Fig. 1); (2) was, in relation to mass availability, the most used among all fractions (Fig. 4a); and (3) had the most significant relation between mass use and availability case⁻¹ (Fig. 5b). Obviously, use of neighboring fractions (2–2.5 mm; 3.15–4 mm) had no strong negative correlation with the use of the preferred fraction (Fig. 5a). Thus, why did *H. siltalai* not switch to material in the neighboring fractions if the preferred fraction was rare at a location?

Our data provide three complementary answers to this question. First, at our field conditions, the availability of the preferred fraction was more correlated with the availability of its upper and lower neighboring fraction than with any other fraction (Fig. 5a), i.e., locations with a shortage in the preferred fraction also had less building material in the neighboring fractions. Second, the relation between the available number of grains in the upper neighboring fraction to the preferred fraction was ~1:2 (for samples with ≥10 cases), i.e., switching to the upper neighboring fraction would increase the effort to find and to transport these coarser grains (this argument does not hold for the grains in the lower neighboring fraction, which had about twice as many grains as the preferred fraction). Third, as mentioned before, the use of either coarser or intermediate grains required the use of finer grains.

Consequently, the more grain availability and use in the preferred 2.5–3.15-mm fraction indicated resource limitation (Fig. 5b), the more the larvae used the 1.6–2-mm fraction instead (Fig. 5c), which was an unlimited resource (Fig. 5b). It seemed that using more of the 1.6–2-mm fraction required more of the 0.315–0.5-mm fraction (Fig. 5c), which seemed to be another unlimited resource (available mass used only ~2%; Fig. 4a). Given that ~98% of the 0.315–0.5-mm fraction was not used, we consider the relation between use and availability of this fraction (Fig. 5b) as a spurious relation. If so, resource limitation of the preferred grain size 2.5–3.15 mm produced chained effects across other grain fractions, as the alternative use of the 1.6–2-mm fraction induced an increased use of the 0.315–0.5-mm fraction.

The visualization of the case architectures in Fig. 6 enables speculation about potential causes of these chained effects as well as about their potential biological significance. To achieve a grain arrangement that reduces gaps among the grains to the minimum, the use of a certain coarser grain size would require the use of a certain finer grain size (Fig. 6). This could have been a cause for these chained effects.

Concerning the biological significance of these effects, the amount of silk required to cement particles together increases with decreasing particle size (Smart 1976; Becker 2001), which increases the energetic costs for case construction (Dudgeon 1990). However, we cannot imagine that adding 29 finer grains (i.e., using more silk) instead of three coarser ones to 265 other grains would make a significant difference in the costs of the silk-thread production for a *Hydropsyche* specimen. First, larvae that have finished building their pupal case have their silk glands tightly filled with secretion (Haller 1948). Second, the production of silk threads by caddisfly larvae can correspond energetically to ~20% of their body tissue production (Huryn and Wallace 1988). Thus, through its entire life, a *Hydropsyche* larva uses plenty of silk for safety threads when moving or for frequently renewed larval retreats and filter nets (Sattler 1958; Schuhmacher 1970; Statzner et al. 1999). Third, forcing caddisflies in experiments to use plenty of silk prior to pupation causes only minor (though significant) decreases in the mass of the emerging adults in comparison with control groups (Stevens et al. 1999, 2000). Therefore, the additional silk required to add 29 finer instead of three coarser grains to the pupal case should be a marginal cost in the silk budget of a *H. siltalai* specimen. In contrast, we can imagine that the differences in case architecture at the lowest and highest availability of the preferred grain fraction would have consequences for the case stability, e.g., the resistance of the case to damage resulting from floods that move coarser bottom material. Obviously, these speculations need confirmation by solid data.

This is among the first examples of limitations in a seemingly overabundant resource used by lotic caddisflies to build mineral cases (Dudgeon 1990). Obviously, the constraints interfering in this resource limitation were quite subtle so that its discovery required a careful study design (guided by analyses of preliminary data) as well as some luck (patterns were not obscured by flood disturbances).

Generalizing our findings beyond the system examined by us, we focus on aquatic systems, mineral particles, and benthic invertebrate builders. First, the risk that mineral grains become a limited resource for aquatic invertebrates that use them to build cases or tubes should be related to the space that can be exploited during grain acquisition, i.e., this risk should be greater for resident builders (depending on local grain availability) than for mobile itinerant builders (acquiring grains where they can be found). Typical representatives of the former are polychaetes or amphipods in marine and insects (caddisflies, midges, moths) in freshwater systems (Dudgeon 1990). Second, particularly in streams but also near shores of lakes and oceans, water currents can create conflicts in the resource requirements for invertebrates building with mineral grains. Obviously, increasing flow facilitates respiration but also erodes mineral grains of increasing size, until the grains become so large that invertebrates can-

not use them, except for the attachment of their cases or tubes. This conflict of resource requirements is extreme for invertebrates that need locally available fine mineral grains for their cases or tubes, coarse grains to attach their cases or tubes, and high oxygen renewal rates (i.e., caddisflies, midges, and moths that attach their case or tube to stones in rapidly flowing stream riffles; Dudgeon 1990). For marine invertebrates that construct within finer sediments, this conflict should be less extreme, as they do not need large grains for firm attachment (Dudgeon 1990). Third, water currents in natural environments simultaneously create a shortage in mineral grain sizes that are in or near the grain-size range preferably used by an invertebrate builder. Thus, in contrast with experimental conditions, switching to grain sizes neighboring the preferred grain-size range is difficult in natural habitats.

References

- BECKER, G. 2001. Larval size, case construction and crawling velocity at different substratum roughness in three scraping caddis larvae. *Arch. Hydrobiol.* **151**: 317–334.
- , AND M. BOERSMA. 2003. Resource quality effects on life histories of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 700–706.
- BEGON, M., J. L. HARPER, AND C. R. TOWNSEND. 1986. *Ecology*. Blackwell.
- BRENNAN, A., AND A. J. MCLACHLAN. 1979. Tubes and tube-building in a lotic chironomid (Diptera) community. *Hydrobiologia* **67**: 173–178.
- , ———, AND R. S. WOTTON. 1978. Particulate material and midge larvae (Chironomidae: Diptera) in an upland river. *Hydrobiologia* **59**: 67–73.
- BUITENHUIS, E. T., K. R. TIMMERMANS, AND H. J. W. DE BAAR. 2003. Zinc-bicarbonate colimitation of *Emiliania huxleyi*. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1575–1582.
- CASTILLO, M. M., G. W. KLING, AND J. D. ALLAN. 2003. Bottom-up controls on bacterial production in tropical lowland rivers. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1466–1475.
- CEREGHINO, R., T. BOUTET, AND P. LAVANDIER. 1997. Abundance, biomass, life history and growth of six Trichoptera species under natural and hydropeaking conditions with hypolimnetic release in a Pyrenean stream. *Arch. Hydrobiol.* **138**: 307–328.
- DUDGEON, D. 1990. Functional significance of selection of particles and their use by aquatic animals in the construction of external structures, p. 263–288. *In* R. S. Wotton [ed.], *The biology of particles in aquatic systems*. CRC.
- ELLIOTT, J. M. 1971. Upstream movements of benthic invertebrates in a lake district stream. *J. Anim. Ecol.* **40**: 235–252.
- GAINO, E., F. CIANFICCONI, M. REBORA, AND B. TODINI. 2002. Case-building of some Trichoptera larvae in experimental conditions: Selectivity for calcareous and siliceous grains. *Ital. J. Zool.* **69**: 141–145.
- GORTER, F. J. 1931. Köcherbauversuche an Trichopterenlarven. *Z. Morph. Ökol. Tiere* **20**: 443–532.
- HALLER, P. H. 1948. Morphologische, biologische und histologische Beiträge zur Kenntnis der Metamorphose der Trichopteren (*Hydropsyche*). *Mitt. Schweiz. Entomol. Ges.* **21**: 301–359.
- HANNA, H. H. 1961. Selection of materials for case-building by larvae of caddis flies (Trichoptera). *Proc. R. Entomol. Soc. Lond. (A)* **36**: 37–47.
- HOLZMAN, R., AND A. GENIN. 2003. Zooplanktivory by a nocturnal coral-reef fish: Effects of light, flow, and prey density. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1367–1375.
- HURYN, A. D., AND J. B. WALLACE. 1988. Community structure of

- Trichoptera in a mountain stream: Spatial patterns of production and functional organization. *Freshw. Biol.* **20**: 141–155.
- HYNES, H. B. N. 1970. The ecology of running waters. Liverpool Univ. Press.
- JACKSON, J. K., E. P. McELRAVY, AND V. H. RESH. 1999. Long-term movements of self-marked caddisfly larvae (Trichoptera: Sericostomatidae) in a California coastal mountain stream. *Freshw. Biol.* **42**: 525–536.
- LEICHTFRIED, M. 1986. Räumliche und zeitliche Verteilung der partikulären organischen Substanz (POM—Particulate Organic Matter) in einem Gebirgsbach als Energiebasis der Biozönose. Ph.D. thesis, Univ. of Vienna.
- LEPNEVA, S. G. 1970. Larvae and pupae of Annulipalpia. Israel Program Sci. Translations.
- . 1971. Larvae and pupae of Integripalpia. Israel Program Sci. Translations.
- MACKAY, R. J. 1977. Behavior of *Pycnopsyche* (Trichoptera: Limnephilidae) on mineral substrates in laboratory streams. *Ecology* **58**: 191–195.
- , AND G. B. WIGGINS. 1979. Ecological diversity in Trichoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **24**: 185–208.
- MALICKY, H. 1983. Atlas of European Trichoptera. Junk.
- MOGEL, R., N. RIEDER, AND B. STATZNER. 1985. Ein Gerät zur Freilandbeobachtung des nächtlichen Verhaltens von benthischen Bachtieren, mit Befunden aus der Gattung *Hydropsyche* (Trichoptera, Insecta). *Carolina* **42**: 121–128.
- NEWBURY, R. W., AND M. N. GABOURY. 1993. Stream analysis and fish habitat design. Newbury Hydraulics.
- PODGORNYI, K. A., AND V. A. NEPOMNYASHCHIKH. 1999. Effects of behavioral variability on optimization of caddis fly (*Chaetopteryx villosa*) larvae behavior. *Adv. Curt. Biol.* **119**: 218–222 (in Russian, with English abstract).
- ROST, B., U. RIEBESELL, S. BURKHARDT, AND D. SÜLTEMEYER. 2003. Carbon acquisition of bloom-forming marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 55–67.
- SANGPRADUB, N., P. S. GILLER, AND J. P. O'CONNOR. 1999. Life history patterns of stream-dwelling caddis. *Arch. Hydrobiol.* **146**: 471–493.
- SATTLER, W. 1958. Beiträge zur Kenntnis von Lebensweise und Körperbau der Larve und Puppe von *Hydropsyche* Pict. (Trichoptera) mit besonderer Berücksichtigung des Netzbaues. *Z. Morph. Ökol. Tiere* **47**: 115–192.
- SCHUHMACHER, H. 1970. Untersuchungen zur Taxonomie, Biologie und Ökologie einiger Köcherfliegenarten der Gattung *Hydropsyche* Pict. (Insecta, Trichoptera). *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* **55**: 511–557.
- SMART, K. 1976. A progress report on the building motivation in the caddis larva, *Lepidostoma hirtum*. *Proc. 1st Int. Symp. Trichoptera.* **1974**: 185–186.
- STATZNER, B., M.-F. ARENS, J.-Y. CHAMPAGNE, R. MOREL, AND E. HEROUIN. 1999. Silk-producing stream insects and gravel erosion: Significant biological effects on critical shear stress. *Water Resour. Res.* **35**: 3495–3506.
- , AND G. BRETSCHKO. 1998. Net-building of caddis fly (*Hydropsyche siltalai*) in a French stream: Relations with larval density and physical conditions. *Arch. Hydrobiol.* **144**: 87–102.
- , J. A. GORE, AND V. H. RESH. 1988. Hydraulic stream ecology: Observed patterns and potential applications. *J. N. Am. Benthol. Soc.* **7**: 307–360.
- , F. KOHMANN, AND A. G. HILDREW. 1991. Calibration of FST-hemispheres against bottom shear stress in a laboratory flume. *Freshw. Biol.* **26**: 227–231.
- STEVENS, D. J., M. H. HANSELL, J. A. FREEL, AND P. MONAGHAN. 1999. Developmental trade-offs in caddis flies: Increased investment in larval defence alters adult resource allocation. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**: 1049–1054.
- , ———, AND P. MONAGHAN. 2000. Developmental trade-offs and life histories: Strategic allocation of resources in caddis flies. *Proc. R. Soc. Lond. B* **267**: 1511–1515.
- STROM, S., G. WOLFE, A. SLAJER, S. LAMBERT, AND J. CLOUGH. 2003. Chemical defense in the microplankton II: Inhibition of protist feeding by β -dimethylsulfoniopropionate (DMSP). *Limnol. Oceanogr.* **48**: 230–237.
- THIOULOUSE, J., D. CHESSEL, S. DOLÉDEC, AND J.-M. OLIVIER. 1997. ADE-4: A multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comput.* **7**: 75–83.
- TOLKAMP, H. H. 1980. Organism-substrate relationships in lowland streams. *Agric. Res. Rep. Wageningen* **907**: 1–211.
- WARINGER, J., AND W. GRAF. 1997. Atlas der österreichischen Köcherfliegenlarven unter Einschluß der angrenzenden Gebiete. *Facultas*.

Received: 16 April 2004.

Accepted: 7 October 2004.

Amended: 25 October 2004.

Obligate asex in a rotifer and the role of sexual signals

C.-P. STELZER

Institute for Limnology, Mondsee, Austria

Keywords:

aphid;
Brachionus;
 chemical communication;
 cyclical parthenogenesis;
Daphnia;
 evolution of sex;
 obligate parthenogenesis;
 sexual signals.

Abstract

Transitions to asexuality have occurred in many animals and plants, yet the biological mechanisms causing such transitions have often remained unclear. Cyclical parthenogens, such as cladocerans, rotifers or aphids often give rise to obligate asexual lineages. In many rotifers, chemical signals that accumulate during population crowding trigger the induction of sexual stages. In this study, I tested two hypotheses on the origin of obligate parthenogenesis in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: (i) that obligate parthenogens have lost the responsiveness to the sexual signal; and (ii) that obligate parthenogens have lost the ability to produce the sexual signal. Pairwise cross-induction assays among three obligate parthenogenetic strains and two cyclically parthenogenetic (sexual) strains were used to test these hypotheses. I found that obligate parthenogens can induce sexual reproduction in sexual strains, but not vice versa. This demonstrates that obligate parthenogens do still produce the sexual signal, but have lost responsiveness to that signal.

Introduction

Although asexual lineages have emerged in almost all major animal and plant groups, most of them are doomed to early extinction (Maynard Smith, 1978; Bell, 1982). The short evolutionary life of asexual lineages has been explained by a lack of recombination, which renders their genomes prone to the accumulation of deleterious mutations and/or less efficient for the fixation of adaptive mutations (e.g. reviews by Hurst & Peck, 1996; Rice, 2002). In addition, asexual lineages possibly lack the ability to generate sufficient genetic variation in short term to counter changing selection pressures, such as those posed by rapidly coevolving parasites. Despite the short evolutionary life of most asexual lineages, a dynamic equilibrium between sexual and asexual forms can result, e.g. if old asexual lineages are continuously replaced by new ones (Butlin *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2003; Paland *et al.*, 2005). Such repeated origins of asexuality have been documented in many animals (Simon *et al.*, 2003) and plants (Sharbel & Mitchell-Olds, 2001; van Dijk & Vijverberg, 2004). Understanding the

proximate causes for the origin of new asexual lineages remains a major challenge, as such causes determine the frequency of asexual transitions as well as the levels of genetic diversity within asexual populations (Simon *et al.*, 2003).

Repeated origins of obligate asexuality have been described in cyclical parthenogens, i.e. organisms that are capable of both sexual and parthenogenetic reproduction (Delmotte *et al.*, 2001; Paland *et al.*, 2005). A cyclical parthenogenetic life cycle enables organisms to cope with periodical changes in the environmental conditions, such as those observed during an annual cycle. During favourable periods, asexual reproduction allows cyclical parthenogens to quickly exploit resources and to build up large populations. Once environmental conditions indicate future deterioration, sexual stages are induced, and these often culminate in the production of diapausing stages (e.g. resting eggs). Interestingly, the proximate stimuli that induce sex often serve as direct or indirect cues of deteriorating future conditions, e.g. population crowding, declining food concentrations or a reduction in day length (Kleiven *et al.*, 1992; Stelzer & Snell, 2003). One hypothesis for an origin of new parthenogenetic lineages is that these fail to respond to the sex-inducing stimuli (Simon *et al.*, 2003). In this study, I tested this hypothesis using sexual (cyclical

Correspondence: Claus-Peter Stelzer, Institute for Limnology, Mondseestr. 9, A-5310 Mondsee, Austria.
 Tel.: +43 6232 3125 25; fax: +43 6232 3578;
 e-mail: claus-peter.stelzer@oeaw.ac.at

parthenogenesis) and asexual (obligate parthenogenesis) strains of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas.

Monogonont rotifers are small invertebrate metazoans of worldwide distribution represented by approximately 1500 described species and found mainly in freshwater habitats (Wallace *et al.*, 2006). Their close relatives, the bdelloid rotifers are one of the few asexual lineages for which there is substantial evidence for ancient asexuality (Mark Welch & Meselson, 2000; Mark Welch *et al.*, 2004). The monogonont life cycle involves cyclical parthenogenesis, an alternation of phases with asexual reproduction (amixis) and sexual reproduction (mixis). The asexual phase is characterized by rapid clonal propagation: amictic females produce diploid eggs by ameiotic parthenogenesis. The sexual phase is initiated when amictic females produce mictic female offspring. Mictic females produce haploid eggs that develop into haploid males if unfertilized. Fertilized mictic eggs, however, develop into diapausing eggs that can undergo extended periods of dormancy. Amictic females hatching from diapausing eggs initiate another phase of parthenogenetic reproduction, and the cycle starts again.

The induction of mixis is triggered by a chemical that is produced by the rotifers themselves and accumulates during population crowding, commonly at rotifer densities above 0.1 individuals per millilitre (Gilbert, 1963; Carmona *et al.*, 1993; Stelzer & Snell, 2003, 2006; Timmermeyer & Stelzer, 2006). This chemical cue is necessary and sufficient for the induction of mixis, unless the physiological state of the animals is disturbed by extreme environmental conditions (Snell, 1986). If females are exposed to the mixis chemical, they produce a certain fraction of mictic daughters (Gilbert, 2003a; Stelzer & Snell, 2006). This fraction is often clone-specific and typically ranges between 5% and 50% (Gilbert, 2003a). A recent study has shown that the mixis chemical of *Brachionus plicatilis* is a water-soluble protein (Snell *et al.*, 2006).

There have been several reports of obligate parthenogenetic strains in *Brachionus* sp. (e.g. Buchner, 1987; Bennett & Boraas, 1989; Fussmann *et al.*, 2003). Given the mode of chemical induction of mixis, there are two main possibilities by which a transition to obligate parthenogenesis can evolve. First, obligate parthenogens could have become insensitive to the mixis-inducing chemical. This could be caused, for instance, by a mutation in the receptor of the mixis chemical or at other sites in the downstream signalling cascade. Obligate parthenogens should have a demographic advantage and spread in the population, because they would produce amictic (i.e. nondiapausing) offspring even when population densities are high. Second, obligate parthenogens may have abandoned the production of the sex-inducing chemical. This by itself might not grant a demographic advantage, as other clones that still produce the mixis chemical might be present in the population. However, if the production of the sexual signal were energetically

costly, obligate parthenogens could use the spared resources for the production of more offspring. In this study, I used cross-induction assays with conditioned media, produced by cyclically parthenogenetic (hereafter sexual) and obligately parthenogenetic (hereafter asexual) strains of the rotifer *B. calyciflorus*. I found that mixis was induced in sexual strains when treated with conditioned medium of asexual strains, but not vice versa. This strongly suggests that asexuals do still produce the chemical signal that induces sex, but have lost responsiveness to that signal.

Methods

Study species

Five different strains of the rotifer *B. calyciflorus* were used in the experiments. Three strains of *B. calyciflorus* (TX, FL and GA) were supplied by J.J. Gilbert (Dartmouth College, Hanover, NH, USA), one strain (NY) was supplied by N.G. Hairston (Cornell University, Ithaca, NY, USA) and one strain (EG) was isolated in autumn 2006 from lake Egelsee, a small lake in the vicinity of the Institute for Limnology (Mondsee, Austria). Four of these strains were used in earlier studies (e.g. NY in Fussmann *et al.*, 2003; TX, FL and GA in Gilbert & Walsh, 2005). Three of the strains were obligate parthenogens (FL, GA and NY), i.e. they produced only amictic female offspring, irrespective of population density. The other two strains (EG and TX) were cyclical parthenogens, which produced a certain fraction of mictic females, males and sexual eggs. Sexual eggs are diapausing and take several weeks to develop (Hagiwara & Hino, 1989), whereas asexual eggs develop within about 8 h at 25 °C (Bennett & Boraas, 1989). Thus, in laboratory, where cultures are frequently inoculated or continuously diluted (such as in chemostats, see below), the sexual strains are also propagated clonally. During the course of this study, I did not observe any reduction in the investment into mictic offspring in the sexual strains (EG and TX). Rotifers were fed the alga *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (Strain: SAG11-32b, Sammlung für Algenkulturen, Göttingen, Germany). Both, rotifers and algae, were cultured in COMBO, an artificial freshwater medium enhanced with trace elements and vitamins (Kilham *et al.*, 1998).

Chemostat culturing

During the experiments rotifer populations were cultured in a two-stage chemostat system, in which they were kept in a dynamic equilibrium due to constant inflow of fresh food suspension and constant removal of animals and their waste products. The first stage of the chemostat system consisted of a large-volume algal chemostat (2100 mL), in which the food alga *C. reinhardtii* was cultured. The algal chemostat was continuously

illuminated by two daylight fluorescent bulbs (irradiation intensity: $\sim 200 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$) and operated at a dilution rate of 1.1 day^{-1} . The inflowing medium was $0.2\text{-}\mu\text{m}$ filtered COMBO medium, which was provided in a 20-L bottle that was exchanged once per week. Under these conditions, the algal chemostat entered a steady state with a relatively constant algal biovolume of $1.2 \times 10^8 \text{ fL mL}^{-1}$ (femto liter) ($\sim 750\,000 \text{ cells mL}^{-1}$). The second stage of the chemostat system consisted of 12 rotifer chemostats (each 380 mL volume). Food suspension was harvested from the algal chemostat with a peristaltic pump, mixed 1:1 with sterile COMBO medium in a small reactor vessel and the automatically distributed into the 12 rotifer chemostats using a 12-channel peristaltic pump. The rotifer chemostats were kept in a water bath at $24 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ and were illuminated continuously at a low light intensity ($\sim 5 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$). The outflow of the rotifer chemostats was collected in 1-L glass bottles, which were replaced every day. All components of the chemostat system (i.e. glass vessels, lids and tubing) were autoclaved and assembled in a stream of sterile air (provided by gas burner). Chemostats were continuously bubbled with filtered air ($0.2\text{-}\mu\text{m}$ PTFE filters). For each of the five rotifer clones there were two to three replicate chemostats (GA, FL and EG clones: two chemostats each; TX and NY clones: three chemostats each). In the beginning of the experiment, the rotifer chemostats were inoculated with 170 females of the respective clone. The dilution rate was set to 0.87 day^{-1} . This means that each rotifer population had to multiply at least by a factor of 2.38 day^{-1} to remain at a constant population density.

Chemostat sampling

The 12 chemostats were sampled daily to determine the population density of the rotifers. Samples were taken by withdrawing culture suspension directly into a 20-mL sterile test tube using vacuum; this test tube was exchanged with every sampling. Rotifers were counted alive or fixed with a drop of Lugol's solution for later counts using inverted microscopy. To facilitate comparisons of the population dynamics between different clones, I calculated the exponential growth rate r for the initial time periods when the populations were still growing and the average population density, for the time periods when the populations were not growing any more (i.e. an approximation of the 'carrying capacity'). The exponential growth rate was calculated as the slope of the regression line fitted through the natural logarithm of abundance vs. time for each replicate. For these calculations, I included all measurements up to the time point at which population size stopped to increase. All remaining time points of each replicate were used to calculate the mean population densities (carrying capacity).

On several occasions (days 5, 7, 10, 11, 12, 16 and 17), mixis rates in the chemostat populations were estimated from a sample of 48 young, non-egg-bearing females that were isolated individually in 48-well polystyrene plates, each well filled with $500 \mu\text{L}$ of food suspension. After 2 days of incubation, the reproductive type of the females was determined. Females were classified as mictic if they produced males or resting eggs or amictic if they produced females.

Mixis bioassay

A mixis bioassay similar to that described in Stelzer & Snell (2006) was used to test for cross-induction between asexual and sexual clones. In this bioassay, newborn females were presented with culture medium that had been conditioned by a dense population of another rotifer clone and the level of mixis induction was measured (per cent sexual daughters). Positive and negative controls were made with water conditioned by the focal clone itself and with unconditioned medium respectively. Conditioned medium was prepared fresh each day from the overflow of the rotifer chemostats (collected within a 24-h period). Rotifers were removed with a $30\text{-}\mu\text{m}$ sieve. After centrifugation for 30 min at $12\,000 \times g$ the supernatant was carefully decanted and filtered through Whatman GF/C glassfibre filters (Whatman, Maidstone, UK). For the negative controls, fresh COMBO medium was used.

In this study, five different clones were examined. Hence, there were 30 treatments, which included the 5×5 combinations of each focal clone and conditioned medium, plus five negative controls (one for each focal clone). For each treatment, eight to 12 replicate females were used, and on average five offspring of each replicate female were examined for their reproductive type (mictic or amictic). To provide amictic females for the experiments, 25 females of each clone were cultured at a low population density for at least three generations. Briefly, newborn females were introduced singly into 20 mL of food suspension in a polystyrene Petri dish. After 2 days, the first newborns hatched and one of them was used to start a new subculture. At the start of the bioassay, focal animals (juveniles hatched within a 8-h period) were introduced into a new Petri dish containing a mixture of 10 mL of conditioned medium and 10 mL of fresh algal suspension (final algal concentration: $\sim 40\,000 \text{ cells mL}^{-1}$). Everyday, focal animals were transferred to new dishes with freshly prepared conditioned medium. Any offspring that hatched within this 24-h period were isolated and individually transferred into the wells of a 48-well polystyrene plate, each well filled with 0.5 mL of food suspension. After 2 days, the reproductive type of these females was determined in the same way as in the bioassay used for the chemostat populations (see above). The mixis bioassay lasted from day 10 to day

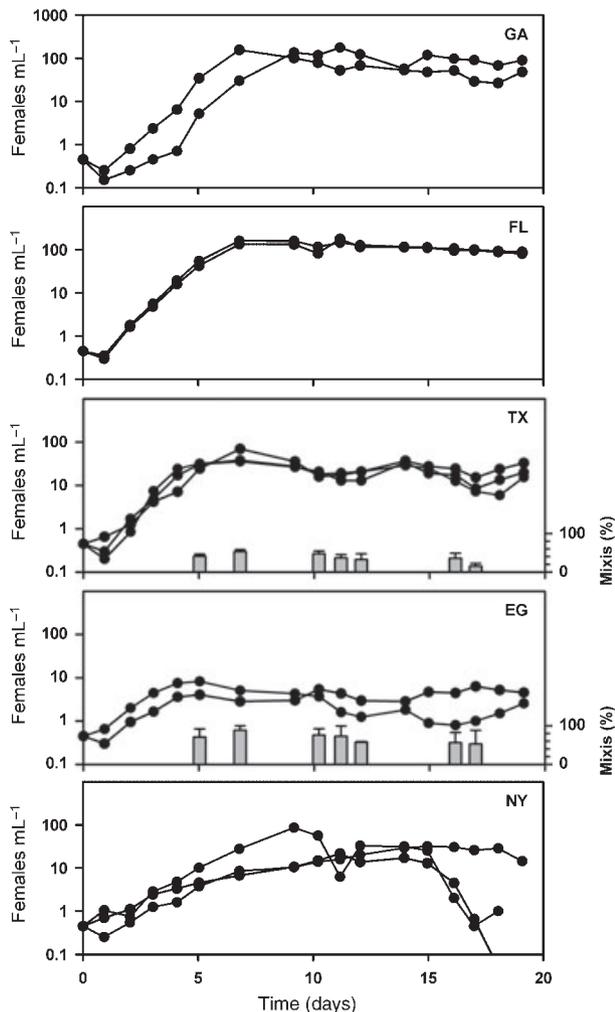


Fig. 1 Population dynamics (lines and filled circles) and mixis rates (grey bars) of the different rotifer strains in the chemostats. Note the logarithmic scaling on the left Y-axis. There were two replicate chemostats for the GA, FL and EG strains, and three replicate chemostats for the TX and NY strains. Mixis rates (i.e. per cent sexual females) for the sexual TX and EG strains are shown in the right Y-axis. Mixis rates were determined only on days 5, 7, 10, 11, 12, 16 and 17. The obligate parthenogenetic strains (GA, FL and NY) produced no mictic offspring at all.

14 of the chemostat trial (see Fig. 1). The data were analysed using the nonparametric Kruskal–Wallis test, corrected for ties, to compare the percentages of mictic offspring for each clone treated with different conditioned media. In those cases where the Kruskal–Wallis test yielded a significant value, pairwise comparisons were performed with the Conover–Inman test to identify homogeneous groups of treatments (Software: Stats-Direct Ltd., Altrincham, UK). Homogeneous groups were defined as the treatments that were not significantly different among each other, but differed significantly from other treatments ($P < 0.05$).

Results

Chemostat cultures

All rotifer populations in the chemostats showed an initial increase in population density followed by equilibria with more or less constant population density (Fig. 1). The two asexual clones, FL and GA, showed the highest population growth rates of all clones (Table 1). Note that Table 1 gives the population growth rates of the chemostat populations, which were subject to a constant dilution rate of 0.87 day^{-1} . Hence, the actual maximum growth rates of the FL and GA clone were 1.88 and 1.92 day^{-1} , respectively, under the experimental conditions. In other words, these two clones have the capacity to double in population size approximately every 8.7 h. The two obligate asexual clones, FL and GA, also reached the highest mean population densities (Table 1). Interestingly, the EG clone had the lowest mean population density of all clones (Table 1), which was likely caused by its tendency to induce the highest levels of mixis. The NY clone behaved somewhat differently from the other four clones. Its initial population growth was much slower than that of the other clones. In fact, it was still growing monotonically after day 7, when all the other clones had already reached their carrying capacities (Fig. 1). Towards the end of the experiment the NY clone was even washed out in two replicate chemostats, which indicates that this clone was close to its limits of growth under the set dilution rate.

Mixis bioassay

In the mixis assay, I tested whether conditioned medium from each of the five clones (GA, FL, TX, EG and NY) would induce mixis in others. Females of the asexual clones (NY, FL and GA) did not produce any sexual offspring at all during the experiment (Table 2). By contrast, the sexual clones that were treated with conditioned media produced high proportions of mictic offspring (Table 2). These levels of mixis were significantly higher than the negative control in most cases

Table 1 Population dynamical parameters of the different clones of *Brachionus calyciflorus*.

Clone	Exponential growth rate	Carrying capacity (day^{-1}) (individuals mL^{-1})
GA	1.01 (± 0.16)	79.7 (± 34.4)
FL	1.05 (± 0.01)	113.5 (± 2.6)
TX	0.87 (± 0.06)	20.7 (± 3.9)
EG	0.63 (± 0.01)	3.2 (± 1.4)
NY	0.41 (± 0.16)	23.7 (± 8.4)

Exponential growth rate during exponential growth after inoculation of the chemostats. Carrying capacity (i.e. mean population density), once the populations ceased to grow monotonically. Means and standard deviations ($n = 2-3$).

Table 2 Mixis induction among different clones of *Brachionus calyciflorus*.

Induced clone	Conditioned medium					
	GA	FL	TX	EG	NY	NEG
GA	0	0	0	0	0	0
FL	0	0	0	0	0	0
TX	21	5	12	30	27	3
EG	55	40	40	43	37	4
NY	0	0	0	0	0	0

Per cent mixis in offspring of the experimental animals. NEG, untreated culture medium. Asexual strains (GA, FL and NY); sexual strains (TX and EG).

Table 3 Statistical analysis of mixis induction in the TX and EG clones.

Induced clone	Kruskal–Wallis test		Groups after Conover–Inman test (conditioned media)
	<i>H</i>	<i>P</i>	
TX	17.64	0.0034	(NEG, FL, (TX), GA, NY, EG)
EG	13.04	0.023	(NEG), (NY, FL, TX, EG, FL)

Results of the Kruskal–Wallis test and *post hoc* Conover–Inman test on mixis induction of conditioned media from different clones (EG, FL, GA, NY and TX) and untreated culture medium (NEG). Groups of conditioned media that did not differ significantly ($P > 0.05$) from each other are clustered in brackets.

(Kruskal–Wallis test, $P < 0.05$, Table 3). The EG clone induced high levels of mixis (37–55%) with any of the conditioned media and there were no significant differences among them (Table 3). In the TX clone, mixis induction was more variable. The treatments with FL- and TX-conditioned medium resulted in rather low proportions of mictic offspring (5% and 17%), which were not significantly different from the negative control (3% mictic offspring). However, the other treatments (NY, GA and EG) induced mixis at levels that were significantly higher than the negative control. Overall, there were several cases of cross-induction, most notably those cases where medium conditioned by the asexual clones (NY, GA and FL) significantly induced mixis in the sexual clones TX and EG (Table 3).

Discussion

Obligate parthenogenesis in *B. calyciflorus* seems to be stably inherited; there was no indication of reversal to the cyclically parthenogenetic life style in any of the asexual clones. The NY, FL and GA clones produced no sexual offspring at all during the experiment, and neither did for several months afterwards (C.P. Stelzer, unpublished observation). During the experiment, the offspring of about 500 females of each clone were screened. In addition, daily light microscopical examination of the

chemostat populations did not reveal any signs of sexual reproduction, such as the presence of mictic females, males or diapausing eggs. By contrast, the two sexual clones (EG and TX) continuously produced mictic females, often at rates of 50% and higher.

The differences in mixis among the five rotifer clones are probably due to genetic differences and not due to differences in the environment. Several alternatives can be ruled out: first, direct environmental effects are unlikely, as the culture conditions of all five clones were basically identical: all rotifer cultures were fed from the same algal culture and were exposed to the same dilution rate, temperature and light conditions. Secondly, maternal effects can be ruled out, as the experiment lasted 3 weeks in total (~10 asexual generations), which greatly exceeds the time period such effects usually persist (Bernardo, 1996). Thirdly, differences in clonal age, i.e. the number of elapsed generations since the clones hatched from resting eggs, are not likely to be responsible for the differences in sex induction among the studied clones. Gilbert (2002) described a transgenerational effect by which rotifers remain relatively insensitive to the sexual signal for the first 12 generations after hatching from the resting egg. At the time of the experiments, all clones were older than 2 months since hatching, i.e. their clonal age was much larger than 12 generations. In fact, the youngest clone (EG clone, hatched in autumn 2006) showed the highest levels of mixis induction (up to 96% sexual offspring). The differences in sexual reproduction therefore seem to be an intrinsic property of each clone and are not caused by the environment.

The mixis assay provided strong evidence that asexual clones do still produce the sexual signal. Both sexual clones (TX and EG) induced mixis upon exposure to conditioned media of asexual clones (Table 2). There was one exception. The TX clone did not induce significantly when exposed to medium conditioned by the FL clone. However, the TX clone did overall induce lower levels of mixis than the EG clone. In fact, mixis induction with medium conditioned by the TX clone itself was slightly elevated, but not significantly higher than the negative control, which could have been caused by the low sample size. However, the fact that the TX clone did significantly induce mixis with all the other conditioned media was an evidence for cross-induction from asexual clones towards the TX clone. By contrast, the asexual clones (NY, FL and GA) never produced any sexual offspring, not even when treated with conditioned medium from the sexual clones. This suggests that they have lost their responsiveness to the signal that induces sexual reproduction.

An alternative explanation for why asexual clones failed to respond to the sexual clones might be a structural divergence of the mixis chemical between clones (Gilbert, 2003b; Stelzer & Snell, 2006). Such divergence could have happened during speciation and

would result in sexual isolation between diverged lineages (Gilbert, 2003b). It is true that some of the clones of *B. calyciflorus* represent separate lineages and may even belong to different members of a cryptic species complex (Gilbert & Walsh, 2005). Even provided there was divergence of the mixis signal, one would, however, expect sexual isolation in both directions: sexuals should be unable to induce asexuals and vice versa. This was clearly not the case, as asexual clones induced mixis in the sexual clones in most treatments. Clonal differences in the structure of the mixis chemical are therefore not a likely explanation for why asexual clones did not respond to the conditioned media of the sexual clones.

Another alternative explanation is that obligate asexual strains of *Brachionus* use a different cue for induction of sex (e.g. day length). This explanation is very unlikely, as each of the asexual strains evidently did respond to population crowding in the past. For instance, data on the NY strain is published in the study of Fussmann (2003). During the first weeks of that study, the NY strain was inducing mixis upon population crowding, as there was a significant positive relationship between population density and the proportion of mictic females (Fussmann *et al.*, 2003). For the other two strains, FL and GA, similar data exist, demonstrating that these strains also did induce mixis at high population densities in the past (Gilbert, 2003b).

Could the obligate asexual strains have merely evolved an increased threshold for mixis induction? This scenario is unlikely for two reasons. First, the population densities of the FL and GA strains in the chemostats were very high (79 and 113 individuals per millilitre, Table 1). Such densities are at the upper end of what rotifers will ever encounter in nature (Wallace *et al.*, 2006). Hence, even if the FL and GA strains would have evolved higher thresholds for mixis induction, e.g. in the range of several hundreds or thousands of individuals per millilitre, this would be equivalent to nonresponsiveness in ecological terms. Secondly, there seems to be a fundamental difference between obligate asexuals vs. sexuals in their response towards unconditioned medium (which should be a good approximation to a 'below-threshold' mixis signal): whereas the sexual strains sometimes produced a small, yet statistically insignificant number of sexual offspring (Tables 2 and 3), obligate asexuals never produced any sexual offspring at all (Table 2). This suggests that obligate asexuals are really asexual in a strict sense.

To sum up, the most plausible explanation for the origin of asexuality in *B. calyciflorus* is that obligate parthenogens have permanently lost the ability to respond to the mixis chemical. Interestingly, this loss seems to have happened independently in all the three asexual strains of this study (NY, FL and GA), as each derived from a different sexual ancestor. As there have been many other reports on the loss of sexual reproduc-

tion in *Brachionus* (e.g. Boraas, 1983; Bennett & Boraas, 1989; Fussmann *et al.*, 2003), heritable variation in the responsiveness to the sexual signal may not be uncommon. Interestingly, this variation may not necessarily rest on high genetic variation, such as in an outbred population, as several transitions to asexuality have been observed in cultures that were founded by one individual female (e.g. Bennett & Boraas, 1989; FL and GA clone of this study). Furthermore, it has recently been shown that several strains of *B. calyciflorus* can exhibit significant intraclonal variation in the propensity for sexual reproduction (Gilbert & Schröder, 2007). The mechanism behind such variation, however, still remains to be determined.

Two further important questions remain. First, is obligate parthenogenesis in monogonont rotifers of any significance in natural populations? A widely accepted model predicts intermediate rates of mixis to be optimal for long-term survival of populations, because there is a trade-off between asexual reproduction – which increases competitive ability and allows larger population sizes, and sexual reproduction – which contributes to population survival through harsh periods by diapausing resting eggs (Serra & King, 1999). However, Fussmann *et al.* (2003) pointed out that there should be periodic selection for obligate parthenogenesis during the growth season, because sexual offspring and diapausing eggs are reproductive dead ends in the sense that they do not contribute to the 'real-time' population dynamics. Overall, stable habitats may select for asexual reproduction and obligate parthenogens should be observed more frequently in such habitats. Unfortunately, to date, there are no studies that quantified the proportion of obligate asexual clones in natural populations of monogononts. Secondly, what are the molecular mechanisms involved in obligate parthenogenesis? This study suggests that such mechanisms should involve changes in the receptor molecule and/or changes in the downstream signalling pathway. A detailed comparison of the molecular characteristics of obligate parthenogens vs. their sexual ancestors would be a promising approach to explore the molecular mechanisms of loss of sex in monogononts.

Acknowledgments

I thank Maria Pichler for technical assistance during the experimental work, Hannes Höllerer for technical help in designing and manufacturing the chemostat culture system and Nelson G. Hairston and John J. Gilbert for sharing their cultures of *B. calyciflorus*. I also thank J.J. Gilbert and two anonymous reviewers for valuable comments on the manuscript.

References

- Bell, G. 1982. *The Masterpiece of Nature*. University of California Press, San Francisco, CA.

- Bennett, W.N. & Boraas, M.E. 1989. A demographic profile of the fastest growing metazoan: a strain of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Oikos* **55**: 365–369.
- Bernardo, J. 1996. Maternal effects in animal ecology. *Am. Zool.* **36**: 83–105.
- Boraas, M.E. 1983. Population dynamics of food-limited rotifers in two-stage chemostat culture. *Limnol. Oceanogr.* **28**: 546–563.
- Buchner, H. 1987. Untersuchungen über die Bedingungen der heterogonen Fortpflanzungsarten bei den Rädertieren III. Über den Verlust der miktischen Potenz bei *Brachionus urceolaris*. *Arch. Hydrobiol.* **109**: 333–354.
- Butlin, R.K., Schoen, I. & Martens, K. 1999. Origin, age and diversity of clones. *J. Evol. Biol.* **12**: 1020–1022.
- Carmona, M.J., Serra, M. & Miracle, M.R. 1993. Relationships between mixis in *Brachionus plicatilis* and preconditioning of culture medium by crowding. *Hydrobiologia* **255/256**: 145–152.
- Delmotte, F., Leterme, M., Bonhomme, J., Rispe, C. & Simon, J.-C. 2001. Multiple routes to asexuality in an aphid species. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **268**: 2291–2299.
- van Dijk, P.J. & Vijverberg, K. 2004. The significance of apomixis in the evolution of the angiosperms. In: *Regnum Vegetabile 142* (F. T. Bakker, L. W. Chatrou, B. Gravendeel & P. B. Pelsler, eds), pp. 101–116. Ganter Verlag, Rugell, Liechtenstein.
- Fussmann, G.F., Ellner, S.P. & Hairston, N.G. 2003. Evolution as a critical component of plankton dynamics. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **270**: 1015–1022.
- Gilbert, J.J. 1963. Mictic female production in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *J. Exp. Zool.* **153**: 113–124.
- Gilbert, J.J. 2002. Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: a multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshw. Biol.* **47**: 1633–1641.
- Gilbert, J.J. 2003a. Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: developmental and population biology. *Evol. Dev.* **5**: 19–24.
- Gilbert, J.J. 2003b. Specificity of crowding response that induces sexuality in the rotifer *Brachionus*. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1297–1303.
- Gilbert, J.J. & Schröder, T. 2007. Intraclonal variation for propensity to produce mictic daughters in the rotifer *Brachionus*: variation among replicate females and with maternal age. *Hydrobiologia*, in press.
- Gilbert, J.J. & Walsh, E.J. 2005. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. *Hydrobiologia* **546**: 257–265.
- Hagiwara, A. & Hino, A. 1989. Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* **186/187**: 415–421.
- Hurst, L.D. & Peck, J.R. 1996. Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 46–52.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Lynn, S.G., Goulden, C.E. & Herrera, L. 1998. COMBO: a defined freshwater medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147–159.
- Kleiven, O.T., Larsson, P. & Hobæk, A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos* **65**: 197–206.
- Mark Welch, D.B. & Meselson, M. 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* **288**: 1211–1215.
- Mark Welch, J.L.M., Mark Welch, D.B. & Meselson, M. 2004. Cytogenetic evidence for asexual evolution of bdelloid rotifers. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 1618–1621.
- Maynard Smith, J. 1978. *The Evolution of Sex*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Paland, S., Colbourne, J.K. & Lynch, M. 2005. Evolutionary history of contagious asexuality in *Daphnia pulex*. *Evolution* **59**: 800–813.
- Rice, W.R. 2002. Experimental tests of the adaptive significance of sexual recombination. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 241–251.
- Serra, M. & King, C.E. 1999. Optimal rates of bisexual reproduction in cyclical parthenogens with density-dependent growth. *J. Evol. Biol.* **12**: 263–271.
- Sharbel, T.F. & Mitchell-Olds, T. 2001. Recurrent polyploid origins and chloroplast phylogeography in the *Arabidopsis holboellii* complex (Brassicaceae). *Heredity* **87**: 59–68.
- Simon, J.C., Delmotte, F., Rispe, C. & Crease, T.J. 2003. Phylogenetic relationships between parthenogenes and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biol. J. Linn. Soc.* **79**: 151–163.
- Snell, T.W. 1986. Effect of temperature, salinity and food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis*. *Mar. Biol.* **92**: 157–162.
- Snell, T.W., Kubanek, J., Carter, W., Payne, A.B., Kim, J., Hicks, M. & Stelzer, C.P. 2006. A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Mar. Biol.* **149**: 763–773.
- Stelzer, C.P. & Snell, T.W. 2003. Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 939–943.
- Stelzer, C.P. & Snell, T.W. 2006. Specificity of the crowding response in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 125–130.
- Timmermeyer, N. & Stelzer, C.P. 2006. Chemical induction of mixis in the rotifer *Synchaeta tremula*. *J. Plankton Res.* **28**: 1233–1239.
- Wallace, R.L., Snell, T.W., Ricci, C. & Nogrady, T. 2006. *Rotifera 1: Biology, Ecology and Systematics*. Backhuys Publishers, Leiden.

Received 27 July 2007; revised 10 September 2007; accepted 14 September 2007

Multigene phylogenies of clonal *Spumella*-like strains, a cryptic heterotrophic nanoflagellate, isolated from different geographical regions

Thorsten Stoeck,¹ Steffen Jost^{1†} and Jens Boenigk²

Correspondence

Thorsten Stoeck
stoeck@rhrk.uni-kl.de

¹School of Biology, University Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger Str. 14, D-67663 Kaiserslautern, Germany

²Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestr. 9, A-5310 Mondsee, Austria

Many nanoflagellate morphospecies comprise an enormous variation of genotypes, probably indicating cryptic species. One of the best-investigated morphospecies with respect to molecular and ecophysiological variation are flagellates of the *Spumella* morphotype. Here, we have phylogenetically analysed three protein-coding genes (actin, alpha-tubulin, beta-tubulin), internal transcribed spacers (ITS1, ITS2) and the 5.8S rDNA of 17 *Spumella*-like strains isolated from soil, freshwater and marine samples in order to (i) test the validity of the current *Spumella*-like phylogenetic classification system based exclusively on small subunit (SSU) rDNA, (ii) elucidate the phylogenetic associations of SSU rDNA-unresolved strains and (iii) evaluate the validity of the assignment of ecophysiological adaptations to previously identified SSU rDNA sequence clades. All single-gene analyses show different patterns of support, are incongruent and identify a number of conflicting nodes. Likewise, a concatenation of all protein genes fails to recover specific SSU rDNA clades. However, a combined analysis of all genes confidently resolved the conflicts of the single genes and the protein-gene concatenations and resulted in a tree topology that is identical to the SSU rDNA analysis, but with enhanced phylogenetic resolution and decisively greater support. We conclude that, depending on the genes concatenated, a 'supergene' analysis minimizes artefactual effects of single genes and may be superior in its performance in phylogenetically analysing cryptic species. We confirm the validity of the SSU rDNA *Spumella*-like phyloclades and support the suggestion that these clades indeed seem to reflect certain ecophysiological adaptations.

INTRODUCTION

In protistology, species descriptions often pragmatically conform to the morphological species concept: microbial eukaryotes have traditionally been identified on the basis of their morphological diversity (Finlay *et al.*, 1996). In

[†]Present address: Austrian Academy of Sciences, Institute for Limnology, Mondseestr. 9, A-5310 Mondsee, Austria.

Abbreviations: ED, evolutionary distance; ITS, internal transcribed spacer; ML, maximum likelihood; PP, posterior probability; SSU, small subunit.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the SSU rDNA, ITS, alpha- and beta-tubulin and actin sequences reported in this paper are EF577164–EF577234, as detailed in Table 1 and Supplementary Table S1.

Details of GenBank accession numbers and further phylogenetic trees for the ITS locus, the actin gene, the alpha-tubulin gene and the beta-tubulin gene and concatenations of the actin, beta- and alpha-tubulin genes and the actin, beta-tubulin, alpha-tubulin and SSU rDNA genes are available as supplementary material with the online version of this paper.

general, such a concept seems to work well for a number of larger protists. However, numerous smaller species (nano- and picoeukaryotes) are morphologically indistinguishable (Coleman, 2002; Hackstein, 1997; Nanney, 2004), as evolution and speciation in microbial eukaryotes are not necessarily accompanied by a perceptible morphological change (Machelon *et al.*, 1984). As a consequence, distinct microbial eukaryote species are often classified as a single species (=cryptic species). The prevalence of such cryptic species impairs biodiversity estimates and analyses of spatial distribution patterns and ecological functions (Bickford *et al.*, 2006; Coleman, 2002; Hackstein, 1997).

A group of organisms that falls into this category are colourless chrysophytes often referred to as '*Spumella*-like' flagellates or *Spumella* spp. (Auer & Arndt, 2001; Cleven & Weisse, 2001; Weitere & Arndt, 2003). These organisms account for a substantial proportion of the heterotrophic nanoflagellate (HNF) biomass, especially in freshwater systems (Domaizon *et al.*, 2003; Felip *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2003), and play a major role in microbial ecology as

they contribute significantly to carbon transfer through freshwater food webs (Arndt *et al.*, 2000; Boenigk & Arndt, 2002; Sherr & Sherr, 1994). Field investigations and food web models have so far been focused primarily on HNFs as a functional group (Bojanic *et al.*, 2006; Gasol *et al.*, 1995; Weitere & Arndt, 2002). However, merging different taxa into 'black boxes' is insufficient to describe specific interactions and pathways within microbial food webs. Therefore, an increasing effort to focus on species- or taxon-specific investigations has arisen (Cleven & Weisse, 2001).

The advent of DNA sequencing techniques has given biologists a new tool for the identification of such cryptic microbial eukaryotes (Darling *et al.*, 2004; Hausmann *et al.*, 2006; Scheckenbach *et al.*, 2006; Slapeta *et al.*, 2006). Recently, Boenigk *et al.* (2005) took advantage of this technique and analysed 28 *Spumella*-like strains from different geographical regions. The authors discovered sequence dissimilarities in the 18S (small subunit; SSU) rDNA of up to 10% between the different strains and identified numerous distinct genotypes. In subsequent studies, they identified endemic patterns (Boenigk *et al.*, 2006) and specific ecotypes (Boenigk *et al.*, 2007) based on SSU rDNA phylogenetic clades. However, this SSU rDNA phylogeny is characterized by some shortcomings: (i) four out of six identified major *Spumella*-like phylogenetic clades are not supported, (ii) none of the subclades in the most prominent clade (C clade) are supported, (iii) the SSU rDNA failed to resolve several *Spumella*-like isolates from different geographical regions and (iv) several strains are characterized by unusually long branches, hampering phylogenetic reconstruction (Felsenstein, 1978). As a result, the discussion of SSU rDNA *Spumella*-like phylogenetic clades in the context of ecological adaptation (ecotypes) and biogeography could lead to premature and erroneous pictures.

Based on the idea that slowly evolving markers, such as SSU rDNA, may be insufficient to resolve the phylogenetic relations of closely related taxa (Avise, 2004; Rosselló-Mora & Amann, 2001; Schlegel & Meisterfeld, 2003; Tsuchiya *et al.*, 2003) and inadequate to detect ecophysiological differences between populations of the same morphospecies (Lowe *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2005), we used multigene analyses to evaluate the validity of (i) the current *Spumella*-like phylogenetic classification system and (ii) the ecological and biogeographical conclusions that are based on this classification. To this end, we sequenced three different protein-coding genes (actin, alpha-tubulin and beta-tubulin) and fast-evolving ribosomal internal transcribed spacer (ITS) fragments of 17 *Spumella*-like flagellate strains isolated from freshwater and soil habitats. Additionally, we included a novel marine strain. Our phylogenetic analyses were based on single genes and concatenations of different genes.

METHODS

Isolation and culturing of strain Got220. We applied a modified filtration-acclimatization method (Hahn *et al.*, 2004) for the isolation of strain Got220. Briefly, 20 ml sample water from the Gotland Deep in the

Baltic Sea was filtered through 5 µm pore-size filters (Minisart syringe filters; Sartorius) and collected in sterile Erlenmeyer flasks. After 24 h acclimatization at room temperature, subsamples of 5 ml were stepwise diluted (three subsequent 1:1 dilutions) with sterile-filtered sample water. After 2–4 h, the flagellates were counted using a Sedgewick–Rafter chamber and a subsample was diluted to a final flagellate abundance of 0.5–1 flagellates ml⁻¹ and subsequently transferred to a 24-well cell culture plate. Wells were supplemented with food bacteria (*Listonella pelagia*) at a concentration of 3–5 × 10⁶ bacteria ml⁻¹. Wells were checked every second day for a period of at least 2 weeks for positive growth under the microscope using a total magnification of ×200. When flagellate growth was detected, the medium was transferred to a 50 ml Erlenmeyer flask containing Schmalz–Pratt medium (l⁻¹: 0.01 g K₂HPO₄ · 3H₂O, 0.1 g KNO₃, 1.45 g CaCl₂ · 2H₂O, 6.92 g MgSO₄ · 7H₂O, 5.51 g MgCl₂ · 6H₂O, 0.67 g KCl and 28.15 g NaCl) and fresh food bacteria. After 2–6 days, the subsamples were further diluted to final concentrations of 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 flagellates ml⁻¹ and supplemented with fresh food bacteria at a concentration of 15–25 × 10⁶ bacteria ml⁻¹. Each of these dilutions was transferred to wells of sterile 24-well cell-culture plates (1 ml per well) and incubated at room temperature. Screening of the wells for the growth of flagellates was again performed by direct microscope investigation every second day. Finally, flagellates were transferred to an Erlenmeyer flask containing fresh Schmalz–Pratt medium and food bacteria. This procedure was repeated until pure cultures were established, but at least four times. Pure cultures were acclimatized to 15 °C and transferred to permanent culture. During permanent culture, the flagellate strains were held on a mixed bacterial community on a wheat grain at 16 °C. Based on light and electron microscope investigations, strain Got220 was identified as a *Spumella*-like morphotype (data not shown).

Even though the Baltic Sea sample from which we isolated strain Got220 was characterized by a salinity of only 20‰, optimal growth conditions were only achieved in a medium with a salinity of 30‰. Growth at 20‰ was only marginal. Under freshwater conditions, the strain did not survive. Thus, despite its origin from a brackish water environment, it is reasonable to assume that Got220 is indeed a marine taxon, which might have entered the Baltic Sea via saline deep currents from the North Sea.

Origin of freshwater and soil strains and culture conditions. In addition to the marine strain Got220, 16 further flagellate strains affiliated with the *Spumella* morphotype (Boenigk *et al.*, 2006) were selected for in-depth investigation (Table 1). Rather than use a virtually meaningless binomen resulting from the current confusion regarding the classification of 'Spumella-like' flagellates, we will refer to them as *Spumella* sp. throughout this document. The selection comprised flagellates affiliated with different SSU rDNA sequence clades as defined earlier (C1, C2, C3 and E; Boenigk *et al.*, 2005, 2006). Further selection criteria were the place of origin (strains from distant sampling sites), different habitat types (soil, freshwater) and different temperature tolerances (Boenigk *et al.*, 2006). Details of the strains used in this study along with their temperature adaptation traits (Boenigk *et al.*, 2007) are shown in Table 1. Based on light and electron microscope investigations, these strains all belong to the same morphospecies (data not shown; Boenigk *et al.*, 2004).

We used NSY inorganic basal medium for cultivation of freshwater and soil strains (Hahn *et al.*, 2003). The gammaproteobacterium *Listonella pelagia* (= *Vibrio pelagius*) strain CB5 (Hahn & Höfle, 1998) was supplied as a food source. The bacteria were also grown in NSY medium (3 g organic matter per litre; Hahn *et al.*, 2003). During permanent culture, the flagellate strains were held on a mixed bacterial community on a wheat grain at 16 °C.

All flagellate strains are available at no cost from the culture collection at the Institute of Limnology of the Austrian Academy of Sciences (contact authors J. B. and S. J.). The accession codes of the strains are identical to the names of the strains.

Table 1. Origin of strains used in this study and SSU rDNA sequence GenBank accession numbers

Isolate names are identical to strain accession numbers in the *Spumella* culture collection of the Institute of Limnology (Austrian Academy of Sciences), Mondsee, Austria. Optimum growth temperatures ($T_{opt.}$) were taken from Boenigk *et al.* (2007). NA, Not available.

Isolate	Accession number	Place of origin	Latitude/longitude	$T_{opt.}$ (°C)
JBAF32	AY651076	Uganda, freshwater	0° 37' N 30° 16' E	33.4
JBNA45	DQ388541	USA, Hawaii, freshwater	19° 33' N 154° 53' W	26.7
JBC07	AY651097	China, Taihu, freshwater	31° 30' N 120° 20' E	33.0
JBCS24	AY651082	China, Shanghai, soil	31° 6' N 121° 22' E	27.3
JBCS23	AY651081	China, Badaling, soil	40° 20' N 115° 58' E	24.9
JBNZ41	AY651075	New Zealand, Aviemore, freshwater	44° 40' S 170° 22' E	32.3
JBNZ39	AY651088	New Zealand, Karangarua, freshwater	43° 37' S 169° 46' E	32.7
JBM10	AY651074	Austria, Mondsee, freshwater	47° 52' N 13° 20' E	34.3
JBM08	AY651098	Austria, Mondsee, freshwater	47° 52' N 13° 20' E	NA
JBM18	AY651092	Austria, St. Gilgen, freshwater	47° 47' N 13° 23' E	19.9
JBL14	AY651086	Austria, Lunz, freshwater	47° 51' N 15° 3' E	22.7
Got220	EF027354	Baltic Sea, Gotland Basin, marine	57° 18' N 19° 0' E	30.1
1031	DQ388563	Antarctica, Signy Island, freshwater	60° 42' S 45° 36' W	11.8
1006	DQ388558	Antarctica, Signy Island, soil	60° 42' S 45° 36' W	17.7
194f	DQ388551	Antarctica, Alexander Island, freshwater	71° 00' S 68° 00' W	16.4
391f	DQ388557	Antarctica, Davis Valley, freshwater	82° 27' S 51° 21' W	13.2
376hm	DQ388553	Antarctica, Davis Valley, freshwater	82° 28' S 50° 56' W	17.7
199hm	DQ388552	Antarctica, Davis Valley, freshwater	82° 28' S 50° 56' W	16.2

Nucleic acid extraction, PCR amplification, cloning and sequencing. Samples (50 ml) of each clonal culture (5×10^4 cells ml⁻¹) were centrifuged, the supernatant was discarded and genomic DNA was extracted using the DNeasy Tissue kit (Qiagen) according to the protocol of the manufacturer. PCR primers for SSU rDNA, ITS1–5.8S–ITS2 fragment, alpha-tubulin, beta-tubulin and actin are given in Table 2. Each PCR contained 10–20 ng DNA template, 2.5 U HotStar *Taq* DNA polymerase (Qiagen) in the manufacturer-provided reaction buffer [Tris/HCl (pH 8.7), KCl and (NH₄)₂SO₄], 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP and 0.5 µM of each oligonucleotide primer. The final volume was adjusted to 50 µl with sterile water. The PCR protocol consisted of an initial hot-start incubation (15 min at 95 °C) followed by 30 identical amplification cycles of denaturing at 95 °C for 45 s, annealing for 1 min (temperatures for specific primer sets are outlined

in Table 2) and extension at 72 °C for 2.5 min and a final extension at 72 °C for 7 min. The resulting PCR products were purified (PCR MinElute kit; Qiagen) and cloned into a vector (TA Cloning kit; Invitrogen). Plasmids were isolated (Qiaprep Spin Miniprep kit; Qiagen) from overnight cultures and reamplified by PCR using primers M13F and M13R to screen for inserts of the expected sizes. Positive clones for each strain and amplified gene were sequenced (M13F and M13R primers) using an Applied Biosystems ABI 3730 DNA Stretch Sequencer, with the XL Upgrade and the ABI Prism BigDye Terminator version 3.1 cycle sequencing ready reaction kit. By bidirectional sequencing, we obtained twofold coverage of each gene and clone. Prior to sequence assembly, we performed Phred20 processing of the sequences using the program CodonCode Aligner (CodonCode Corp.) to ensure high-quality sequences. SSU rDNA sequences for freshwater

Table 2. PCR primer sequences and corresponding annealing temperatures in PCRs used in this study

Mixed-base sites (wobble positions) are denoted by standard IUB nomenclature: D, G/A/T; M, A/C; R, A/G; W, A/T; Y, C/T. Euk, Eukaryote-specific SSU rDNA primer; F, forward; R, reverse.

Primer	Sequence (5'–3')	Annealing temperature (°C)	Reference
ActinF	GGCCTGGAARCAATTNCGRTGNAC	56	Harper <i>et al.</i> (2005)
ActinR	TGGGAYGAYATGGARAARATHTGG		
Alpha-Tubulin-F	CGCGGCCTCARGTNGGNAAYGCNTGYTGCGGA	62	Harper <i>et al.</i> (2005)
Alpha-Tubulin-R	CGCGCCATNCCYTCNCCNACRTACCA		
Beta-Tubulin-F	GCCTGCAGGNCARTGYGGNAAYCA	59	Harper <i>et al.</i> (2005)
Beta-Tubulin-R	TCCTCGAGTRAAYTCCATYTCRTCCAT		
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	53	White <i>et al.</i> (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
EukA (F)	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	56	Medlin <i>et al.</i> (1988)
EukB (R)	TGATCCTTCTGCAGGTTCCACTAC		

and soil strains were obtained from the GenBank database (accession numbers in Table 1; details of other accession numbers are given in Supplementary Table S1, available in IJSEM Online), while that for the marine strain Got220 was obtained in this study.

Phylogenetic analyses. A total of eight CLUSTAL_X alignments (Chenna *et al.*, 2003) were subjected to phylogenetic analyses. Five of these were the respective alignments for the unique genes. The three remaining alignments were concatenations of different genes. One was a concatenation of all protein-coding genes, the second was a concatenation of the protein-coding genes and the SSU rDNA and a third was a concatenation of all genes. The alignments were refined manually in MacClade (Maddison & Maddison, 1992) using phylogenetically conserved regions. The alignments are available from the authors upon request. Subsequently, the program MODELTEST (Posada & Crandall, 2001) was applied to choose the model of DNA substitution that best fitted our dataset from among 56 possible models. We calculated both an evolutionary distance (ED) and a maximum-likelihood (ML) tree for each dataset using the PAUP software package 4.0b10 (Swofford, 2002) and also a Bayesian inference tree using MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). We assessed the relative stability of tree topologies using 1000 bootstrap replicates for the ED and ML trees. Heuristic searches for bootstrap analyses employed stepwise addition: starting trees with simple addition of sequences followed by tree bisection-reconnection (TBR)

branch-swapping. Settings for bootstrap analyses were chosen according to the MODELTEST output. The parameters used to calculate the 'best' trees are given in the legends of the respective figures. For the concatenations, we only calculated ED and Bayesian trees.

For the Bayesian tree, we ran two simultaneous, completely independent analyses starting from different random trees. The analyses also employed GTR+I+G as the DNA substitution model with the gamma distribution shape parameter, the proportion of invariable sites, base frequencies and a rate matrix for the substitution model as assessed by MrBayes. Metropolis coupling with three heated chains and one 'cold' chain was employed to improve the Markov chain Monte Carlo sampling of the target distribution. We ran 1 000 000 generations and sampled every 1000th generation, resulting in 1001 samples from the posterior probability (PP) distribution. For further analysis, the first 250 trees generated were discarded (burnin).

RESULTS

Single-gene phylogenies

In accordance with previous analyses, the strains investigated in this study group into four different SSU rDNA

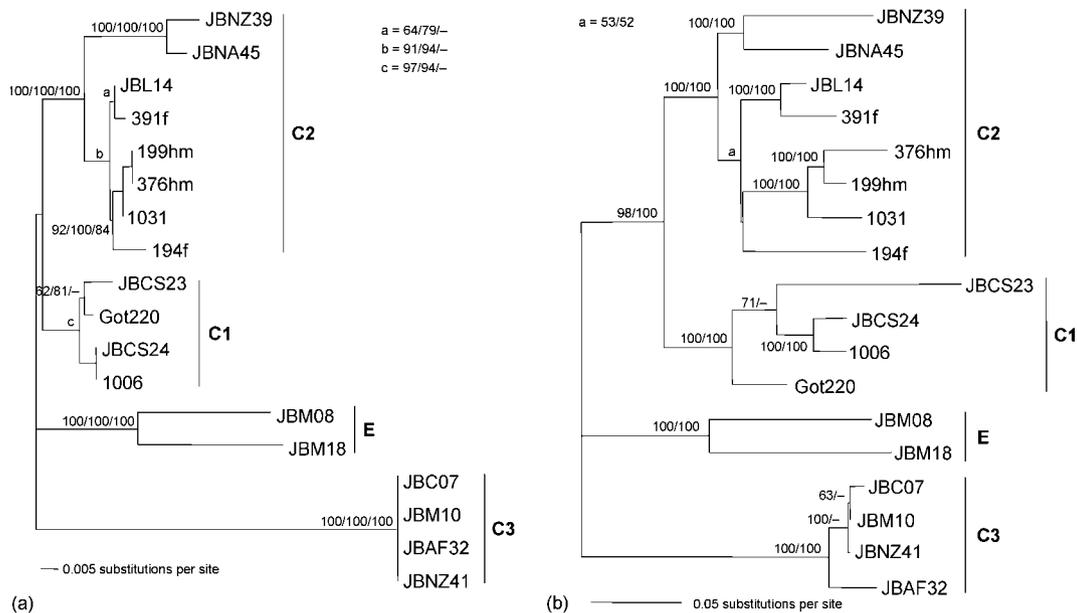


Fig. 1. (a) Minimum-evolution SSU rDNA phylogenetic tree of *Spumella*-like flagellate strains. The tree was constructed under ML criteria by using a GTR+I+G DNA substitution model with the variable-site gamma distribution shape parameter (G) at 0.5340, the proportion of invariable sites (I) at 0.7032 and base frequencies and a rate matrix for the substitution model as suggested by MODELTEST (Posada & Crandall, 2001), based on 1675 unambiguously aligned positions. (b) Minimum-evolution phylogenetic tree of *Spumella*-like flagellate strains based on a concatenation of sequences for three protein-coding genes (alpha-tubulin, beta-tubulin and actin) and rDNA fragments (SSU rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2). The tree was constructed under ML criteria by using a GTR+I+G DNA substitution model with the variable-site gamma distribution shape parameter (G) at 0.8404, the proportion of invariable sites (I) at 0.5401 and base frequencies and a rate matrix for the substitution model as suggested by MODELTEST (Posada & Crandall, 2001), based on 4356 unambiguously aligned positions. In (a), support values are shown for nodes that received support over 50% and are (left to right) evolutionary-distance bootstraps (1000 replicates)/maximum-likelihood bootstraps (1000 replicates)/Bayesian posterior probabilities (1001 sampled trees). In (b), support values are shown for nodes that received support over 50% and are evolutionary distance bootstraps (1000 replicates)/Bayesian posterior probabilities (1001 samples trees). Because the position of the root is unclear, both trees are drawn with a basal trichotomy.

clades (C1, C2, C3 and E; Fig. 1a). The two Austrian freshwater strains, JBM08 and JBM18, fall into clade E and branch as sister to the subclade C3, consisting of the freshwater strains JBC07, JBM10, JBAF32 and JBNZ41. These four strains are from different geographical locations (China, Austria, Uganda and New Zealand, respectively), but their SSU rDNA genes are identical, resulting in unresolved relations between these strains. Clades E and C3 are characterized by unusually long branches. Subclade C1 includes two strains isolated from soil in China (JBCS23 and JBCS24) and one from Antarctica (1006) as well as the marine strain (Got220) isolated from an oxygen-depleted basin in the Baltic Sea. Strains JBCS24 and 1006, which comprise one of the two clusters in the subclade C1, cannot be distinguished from each other based on their SSU rDNA sequences. Interestingly, in this analysis, the Chinese strains S23 and S24 are more similar to the marine Got220 and the polar strain 1006, respectively, than to each other. However, the support for the cluster S23 and Got220 is low and cluster JBCS24 and 1006 is unsupported (ED/ML/PP <50%). Also, subclade C2, consisting entirely of freshwater strains, is split into three clusters: (i) JBL14 from Austria and 391f from Antarctica, with a very low support (64/79/-), (ii) strains 199hm and 376hm from Antarctica, which cannot be discriminated based on SSU rDNA, as well as the Antarctic strains 1031 and 194f, and (iii) two freshwater strains, JBNZ39 from New Zealand and JBNA45 from Hawaii, which are highly supported (100/100/100).

The ITS and the actin, alpha- and beta-tubulin genes resolved larger numbers of strains than SSU rDNA (Supplementary Figs S1–S4, available in IJSEM Online). Interestingly, different genes failed to discriminate different strains: JBC07 and JBM10 are unresolved in the ITS phylogeny (Supplementary Fig. S1), JBL14 and JBNA45 in the actin phylogeny (Supplementary Fig. S2) and JBM08 and JBM18 in the beta-tubulin phylogeny (Supplementary Fig. S4). All strains can be discriminated using alpha-tubulin as a marker gene (Supplementary Fig. S3). Additionally, these single-gene trees have higher statistical support compared with the SSU rDNA tree. However, they are incongruent and identify a number of conflicting nodes. For example, the branching orders within the ITS subclades C1 and C2 (Supplementary Fig. S1) are distinctively different from the respective SSU rDNA subclades (Fig. 1a). In the actin tree (Supplementary Fig. S2), strains JBNZ39 and JBNA45 branch within the actin clades C1 and C2, respectively, while in the SSU rDNA phylogeny both strains branch in C2 with high support. Furthermore, strain JBAF32, branching in the SSU rDNA clade C3, is unassigned and characterized by an extremely long branch in the actin phylogeny (Supplementary Fig. S2). In the alpha-tubulin tree (Supplementary Fig. S3), the Antarctic freshwater strain 194f and the New Zealand freshwater strain JBNZ39 do not cluster with the other freshwater strains in subclade C2 as in the SSU rDNA phylogeny, but rather in the soil/marine subclade C1. Also,

the beta-tubulin phylogeny (Supplementary Fig. S4) fails to recover the SSU rDNA subclades C1 and C2.

Concatenated gene phylogenies

All multiple gene concatenations succeeded in resolving all strains (Fig. 1b and Supplementary Figs S5 and S6). It is conspicuous that, in the concatenated protein-gene tree, strains JBNZ39 and JBNA45 are assigned to subclades C1 and C2, respectively (Supplementary Fig. S5), whereas they seem genetically related to one another in the SSU rDNA tree and clearly assigned to subclade C2 (Fig. 1a).

Adding data for SSU rDNA, 5.8S rDNA, ITS1 and ITS2 to the concatenated protein dataset yielded a tree (Fig. 1b) with topology that was different from that of the protein-gene concatenation (Supplementary Fig. S5) but essentially identical to that of the SSU rDNA tree (Fig. 1a) with some qualitative improvements: a decisive overall increase for the support of clade C2 and a slight increase for the support of C1, no exceptionally long branches stand out in the concatenated supergene tree compared with the SSU rDNA gene tree and all strains can be easily distinguished.

DISCUSSION

Single-gene analyses

Our 18S (SSU) rDNA phylogeny is largely congruent with data published previously (Boenigk *et al.*, 2005, 2006). Our data support the separate position of the tropical freshwater strains JBNZ39 (New Zealand) and JBNA45 (Hawaii) within the subclade C2 (Boenigk *et al.*, 2006). These strains, together with *Spumella obliqua* (see Boenigk *et al.*, 2006), seem to be a basal sister group within or to the subclade C2.

As a rule, protists in marine and non-marine environments are largely distinct (Richards *et al.*, 2005; von der Heyden & Cavalier-Smith, 2005; von der Heyden *et al.*, 2004). Numerous major taxa are restricted to one or other habitat type. For example, radiolarians, pelagophytes, phaeodarians and xenophyophoreans are exclusively marine. In contrast, other taxa like mycetozoa are never marine. Even in groups where habitat shifts have occurred, several substantial subclades seem to be exclusive to one or other (e.g. bodonids and *Goniomonas*; Koch & Ekelund, 2005; von der Heyden & Cavalier-Smith, 2005; von der Heyden *et al.*, 2004). Interestingly, the novel marine strain isolated from the Baltic Sea clusters in the subcluster C1 that contained, so far, mainly isolates from soil (Boenigk *et al.*, 2007). This result is supported by all other gene phylogenies conducted in this study, leaving no doubt about its accuracy.

On present evidence, the fraction of protist lineages able to live in both marine and non-marine habitats is very small. Yet the potential capacity of some *Spumella*-like flagellates to switch rapidly between marine and non-marine

environments might greatly facilitate a global dispersal of at least some clades. Unfortunately, to date, no further marine isolates are available to test this hypothesis. Thus, concerted efforts are in order to collect marine *Spumella*-like flagellates and shed light on their phylogenies and distribution.

Both the ITS1–5.8S rDNA–ITS2 fragment and the protein-coding genes analysed in this study resolve all investigated *Spumella*-like strains that are unresolved in the SSU rDNA tree. The SSU rDNA is highly conserved, with a relatively low evolutionary rate (Hillis & Dixon, 1991). Thus, this gene is generally well suited to the resolution of taxa that separated relatively early in eukaryote evolution. However, evidence is accumulating to show that the SSU rDNA often has insufficient resolving power to guarantee the delimitation of protistan species. For example, as pointed out earlier (Massana *et al.*, 2004), within eukaryotic microorganisms, cultures that share more than 99.5% of the SSU rDNA sequence have been classified as belonging both to different species (Medlin *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 2006) and the same species (Montresor *et al.*, 2003).

A marker with a higher evolutionary rate is the ITS locus (Coleman & Mai, 1997), with mutation rates in protists of about 0.5–1% per million years (e.g. Lajeunesse, 2005). Thus, this highly variable locus has attracted attention as a potential marker for the resolution of closely related taxa in different protists (Diggles & Adlard, 1997; Katz *et al.*, 2004; Pelandakis *et al.*, 2000; van Hoek *et al.*, 1998). Also, the protein-coding genes we evaluated in this study (actin, alpha- and beta-tubulin) are known as fast-evolving in a range of different protist taxa (Kim *et al.*, 2004; Nishi *et al.*, 2005). Considering the wide geographical distribution of strains that cluster in a single SSU rDNA clade (e.g. in clade C3), a high evolutionary rate in functional genes may be ecologically advantageous while conquering new habitats.

Yet, our analyses revealed an unsatisfactory resolution of all strains under study regardless of the marker gene used. Unexpectedly, this also includes the ITS locus. This finding may question the widely held belief that the ITS locus belongs to the most variable regions in protist genomes and, thus, is most useful for high-resolution phylogenetic studies at a low taxonomic level. As speculated earlier by Coleman (2007), protists seem to present the most difficult choice of locus to sequence. The reasoning of the author is the broad and ancient variety of cell types, which is greater than in fungi, animals or plants. As a consequence, the quest for a single common nuclear locus that is most useful in protist phylogeny remains a challenge.

Nevertheless, all trees show a high degree of congruence regarding the recovery of the same taxa in clade E and subclade C3. However, the analyses also reveal some conflicting nodes and topologies with different statistical support. These incongruences are restricted to clades C2 and C1. Inconsistencies in phylogenetic reconstruction using different marker genes are not uncommon in protists (Edgcomb *et al.*, 2002; Nishi *et al.*, 2005; Philippe &

Adoutte, 1996; Shalchian-Tabrizi *et al.*, 2006a, b) and highlight fundamental difficulties in phylogenetic reconstruction (Philippe & Adoutte, 1996). Firstly, evolutionary rates of different genes may be highly variable within the genes as well as between different organisms, resulting in different tree topologies (Philippe *et al.*, 2000). Secondly, in contrast to ribosomal genes, which usually evolve in concert (Hillis & Dixon, 1991), ancient duplication and rearrangements of protein-coding genes may result in two or more gene loci (Henikoff *et al.*, 1997; Kondrashov *et al.*, 2002). The protein-gene copies in these loci might have evolved independently from each other over time, resulting in paralogous genes (Kondrashov *et al.*, 2002; Maddison, 1997). As a matter of fact, the tubulin gene family (Baroin-Tourancheau *et al.*, 1998; Edlind *et al.*, 1996) as well as the actin gene (Carlini *et al.*, 2000) may have several paralogous copies within an individual organism. However, in yeast and some alveolates, actin is encoded by a single gene (Cupples & Pearlman, 1986; Hightower & Meagher, 1986; Reece *et al.*, 1992). While at higher taxonomic levels paralogues do not hamper phylogenetic reconstruction severely, this does not hold true at a low taxonomic level (Baroin-Tourancheau *et al.*, 1998). Thus, even though we succeeded in resolving the taxa that were identical in the SSU rDNA phylogeny, none of the single-gene trees clearly identified the most likely tree topology, resolved conflicting nodes or identified the relations of all *Spumella*-like strains and phyloclades.

Combined supergene analyses

Recently, combined phylogenetic analyses using two or more genes have become increasingly popular when single genes do not provide sufficient resolution or offer conflicting results (Gontcharov *et al.*, 2004). The reasoning for such multigene phylogenies is that a larger number of characters improves phylogenetic accuracy and resolution when the number of alignable and informative nucleotides in single-gene analyses is too limited or the rates of sequence evolution are too different (Poe & Swofford, 1999). This approach has been successful in minimizing difficulties based on single protein-coding gene evolution in plants (Bowe *et al.*, 2000; Karol *et al.*, 2001; Mallatt & Winchell, 2002), animals (Mallatt & Winchell, 2002), various groups of algae (Gontcharov *et al.*, 2004; Hoef-Emden *et al.*, 2002; Nozaki *et al.*, 2000) and the radiation of eukaryotes (Baldauf *et al.*, 2000; Parfrey *et al.*, 2006). The combination of seven different genes seems to minimize any potential bias in phylogenetic reconstruction of *Spumella*-like strains that is caused by single genes in single taxa. Including 4356 aligned nucleotides in phylogenetic analyses of the 'supergene' increased the relative fraction of evolutionary informative positions distinctively ($n=1045$, compared with 175 in the SSU rDNA alignment).

A concatenation is no panacea in phylogenetic reconstruction, because a strong bias in evolutionary rates (leading to long-branch attraction) may still persist and even increase

when more and more characters are added (Sanderson & Shaffer, 2002). However, this was not the case with the data presented here. The resulting phylogeny was superior to all single-gene analyses when the statistical support of internal branches is considered. Specifically, the concatenations resolved the major conflict between the SSU rDNA tree and the protein-gene trees in subclades C2 and C1 in favour of the SSU rDNA analysis. Our approach ensures that conflicts between single-gene topologies are probably derived from different patterns of sequence evolution between the genes, as also observed in other protist taxa like green algae (Gontcharov *et al.*, 2004). Several branches that, in single-gene analyses, were unresolved or weakly supported obtained greater significance in the combined analysis.

One could argue that the consistency in the topology between the concatenated supergene tree and the SSU rDNA tree is due to a significant influence of the relatively long SSU rDNA fragment itself. However, as the combined protein-gene data contribute to a larger extent to the fraction of informative positions in the 'supergene' than the SSU rDNA, we do not ascribe this result to a major influence of the SSU rDNA. Thus, it is the concatenation of as many genes as possible that leads to the 'most optimal' tree (as defined by statistical support, number of resolved branches and branch lengths).

Because phylogenetic supergene analyses confirmed the validity of the SSU rDNA *Spumella*-like phylogenies (Boenigk *et al.*, 2005, 2006), we support the suggestion that these clades indeed seem to reflect certain ecophysiological adaptations which may, however, be overlaid by a geographical pattern.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank two anonymous reviewers and the editor for helpful comments on this manuscript. We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), which supported this study with a grant to T.S. (STO414/2-2), and the German Society for the Promotion of Young Scientists in Protozoology (DGP-F), which contributed to this study with a grant to S.J.

REFERENCES

- Arndt, H., Dietrich, D., Auer, B., Cleven, E. J., Graefenhahn, T., Weitere, M. & Mylnikov, A. P. (2000). Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems. In *The Flagellates*, pp. 240–268. Edited by B. S. C. Leadbeater & J. C. Green. London: Taylor & Francis.
- Auer, B. & Arndt, H. (2001). Taxonomic composition and biomass of heterotrophic flagellates in relation to lake trophy and season. *Freshw Biol* **46**, 959–972.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I. & Doolittle, W. F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972–977.
- Baroin-Tourancheau, A., Villalobo, E., Tsau, N., Torres, A. & Pearlman, R. E. (1998). Protein coding gene trees in ciliates: comparison with rRNA-based phylogenies. *Mol Phylogenet Evol* **10**, 299–309.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K. & Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* **22**, 148–155.
- Boenigk, J. & Arndt, H. (2002). Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 465–480.
- Boenigk, J., Stadler, P., Wiedroither, A. & Hahn, M. W. (2004). Strain-specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5787–5793.
- Boenigk, J., Pfandl, K., Stadler, P. & Chatzinotas, A. (2005). High diversity of the 'Spumella-like' flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environ Microbiol* **7**, 685–697.
- Boenigk, J., Pfandl, K., Garstecki, T., Harms, H., Novarino, G. & Chatzinotas, A. (2006). Evidence for geographic isolation and signs of endemism within a protistan morphospecies. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5159–5164.
- Boenigk, J., Jost, S., Stoeck, T. & Garstecki, T. (2007). Differential thermal adaptation of clonal strains of a protist morphospecies originating from different climatic zones. *Environ Microbiol* **9**, 593–602.
- Bojanic, N., Solic, M., Krstulovic, N., Sestanovic, S., Gladan, Z. N., Marasovic, I. & Brautovic, I. (2006). The role of ciliated protozoa within the microbial food web in the eutrophicated part of the Kastela Bay (middle Adriatic Sea). *Sci Mar* **70**, 431–442.
- Bowe, L. M., Coat, G. & dePamphilis, C. W. (2000). Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4092–4097.
- Carlini, D. B., Reece, K. S. & Graves, J. E. (2000). Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda). *Mol Biol Evol* **17**, 1353–1370.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. & Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the CLUSTAL series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**, 3497–3500.
- Cleven, E. J. & Weisse, T. (2001). Seasonal succession and taxon-specific bacterial grazing rates of heterotrophic nanoflagellates in Lake Constance. *Aquat Microb Ecol* **23**, 147–161.
- Coleman, A. W. (2002). Microbial eukaryote species. *Science* **297**, 337.
- Coleman, A. W. (2007). Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* **35**, 3322–3329.
- Coleman, A. W. & Mai, J. C. (1997). Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. *J Mol Evol* **45**, 168–177.
- Cupples, C. G. & Pearlman, R. E. (1986). Isolation and characterization of the actin gene from *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5160–5164.
- Darling, K. F., Kucera, M., Pudsey, C. J. & Wade, C. M. (2004). Molecular evidence links cryptic diversification in polar planktonic protists to Quaternary climate dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7657–7662.
- Diggles, B. K. & Adlard, R. D. (1997). Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*. *J Eukaryot Microbiol* **44**, 25–32.
- Domaizon, I., Viboud, S. & Fontvieille, D. (2003). Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy – importance of mixotrophy. *FEMS Microbiol Ecol* **46**, 317–329.

- Edgcomb, V. P., Simpson, A. G., Zettler, L. A., Nerad, T. A., Patterson, D. J., Holder, M. E. & Sogin, M. L. (2002). Pelobionts are degenerate protists: insights from molecules and morphology. *Mol Biol Evol* **19**, 978–982.
- Edlind, T. D., Li, J., Visvesvara, G. S., Vodkin, M. H., McLaughlin, G. L. & Katiyar, S. K. (1996). Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogenet Evol* **5**, 359–367.
- Felip, M., Bartumeus, F., Halac, S. & Catalan, J. (1999). Microbial plankton assemblages, composition and biomass, during two ice-free periods in a deep high mountain lake (Estany Redó, Pyrenees). *J Limnol* **58**, 193–202.
- Felsenstein, J. (1978). Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst Zool* **27**, 401–410.
- Finlay, B. J., Corliss, J. O., Esteban, G. & Fenchel, T. (1996). Biodiversity at the microbial level: the number of free-living ciliates in the biosphere. *Q Rev Biol* **71**, 221–237.
- Gasol, J. M., Simons, A. M. & Kalff, J. (1995). Patterns in the top-down versus bottom-up regulation of heterotrophic nanoflagellates in temperate lakes. *J Plankton Res* **17**, 1879–1903.
- Gontcharov, A. A., Marin, B. & Melkonian, M. (2004). Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and *rbcL* sequence comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta). *Mol Biol Evol* **21**, 612–624.
- Hackstein, J. H. (1997). Eukaryotic molecular biodiversity: systematic approaches for the assessment of symbiotic associations. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**, 63–76.
- Hahn, M. W. & Höfle, M. G. (1998). Grazing pressure by a bacterivorous flagellate reverses the relative abundance of *Comamonas acidovorans* PX54 and *Vibrio* strain CB5 in chemostat cocultures. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1910–1918.
- Hahn, M. W., Lünsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Höfle, M. G., Boenigk, J. & Stadler, P. (2003). Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1442–1451.
- Hahn, M. W., Stadler, P., Wu, Q. L. & Pockl, M. (2004). The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J Microbiol Methods* **57**, 379–390.
- Harper, J. T., Waanders, E. & Keeling, P. J. (2005). On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 487–496.
- Hausmann, K., Selchow, P., Scheckenbach, F., Weitere, M. & Arndt, H. (2006). Cryptic species in a morphospecies complex of heterotrophic flagellates: the case study of *Caecitellus* spp. *Acta Protozool* **45**, 415–431.
- Henikoff, S., Greene, E. A., Pietrovski, S., Bork, P., Attwood, T. K. & Hood, L. (1997). Gene families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* **278**, 609–614.
- Hightower, R. C. & Meagher, R. B. (1986). The molecular evolution of actin. *Genetics* **114**, 315–332.
- Hillis, D. M. & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol* **66**, 411–453.
- Hoef-Emden, K., Marin, B. & Melkonian, M. (2002). Nuclear and nucleomorph SSU rDNA phylogeny in the Cryptophyta and the evolution of cryptophyte diversity. *J Mol Evol* **55**, 161–179.
- Karol, K. G., McCourt, R. M., Cimino, M. T. & Delwiche, C. F. (2001). The closest living relatives of land plants. *Science* **294**, 2351–2353.
- Katz, L. A., McManus, G. B., Snoeyenbos-West, O. L. O., Pirog, K., Griffin, A. & Foissner, W. (2004). Reframing the microbial ‘everything is everywhere’ debate: evidence for high gene flow and diversity in ciliate morphospecies. *Aquat Microb Ecol* **41**, 55–65.
- Kim, O. T., Yura, K., Go, N. & Harumoto, T. (2004). Highly divergent actins from karyorelictean, heterotrich, and litostome ciliates. *J Eukaryot Microbiol* **51**, 227–233.
- Koch, T. A. & Ekelund, F. (2005). Strains of the heterotrophic flagellate *Bodo designis* from different environments vary considerably with respect to salinity preference and SSU rRNA gene composition. *Protist* **156**, 97–112.
- Kondrashov, F. A., Rogozin, I. B., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2002). Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biol* **3**, doi:10.1186/gb-2002-3-2-research0008
- Lajeunesse, T. C. (2005). “Species” radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene-Pliocene transition. *Mol Biol Evol* **22**, 570–581.
- Lowe, C. D., Day, A., Kemp, S. J. & Montagnes, D. J. S. (2005). There are high levels of functional and genetic diversity in *Oxyrrhis marina*. *J Eukaryot Microbiol* **52**, 250–257.
- Machelon, V., Genermont, J. & Dattee, Y. (1984). A biometrical analysis of morphological variation within a section of the genus *Euplotes* (ciliata, hypotrichida), with special reference to the *E. vannus* complex of sibling species. *Orig Life Evol Biosph* **13**, 249–267.
- Maddison, W. P. (1997). Gene trees in species trees. *Syst Biol* **46**, 523–536.
- Maddison, W. P. & Maddison, D. R. (1992). MacClade: analysis of phylogeny and character evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Mallatt, J. & Winchell, C. J. (2002). Testing the new animal phylogeny: first use of combined large-subunit and small-subunit rRNA gene sequences to classify the protostomes. *Mol Biol Evol* **19**, 289–301.
- Massana, R., Castresana, J., Balague, V., Guillou, L., Romari, K., Groisillier, A., Valentin, K. & Pedros-Alio, C. (2004). Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3528–3534.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S. & Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* **71**, 491–499.
- Medlin, L., Lange, M. & Baumann, M. (1994). Genetic differentiation among three colony-forming species of *Phaeocystis*: further evidence for the phylogeny of the Prymnesiophyta. *Phycologia* **33**, 199–212.
- Montresor, M., Lovejoy, C., Orsini, L. & Procaccini, G. (2003). Bipolar distribution of the cyst-forming dinoflagellate *Polarella glacialis*. *Polar Biol* **26**, 186–194.
- Nanney, D. L. (2004). No trivial pursuit. *Bioscience* **54**, 720–721.
- Nishi, A., Ishida, K. & Endoh, H. (2005). Reevaluation of the evolutionary position of opalinids based on 18S rDNA, and alpha- and beta-tubulin gene phylogenies. *J Mol Evol* **60**, 695–705.
- Nozaki, H., Misawa, K., Kajita, T., Kato, M., Nohara, S. & Watanabe, M. M. (2000). Origin and evolution of the colonial volvocales (Chlorophyceae) as inferred from multiple, chloroplast gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* **17**, 256–268.
- Parfrey, L. W., Barbero, E., Lasser, E., Dunthorn, M., Bhattacharya, D., Patterson, D. J. & Katz, L. A. (2006). Evaluating support for the current classification of eukaryotic diversity. *PLoS Genet* **2**, e220.
- Pelandakis, M., Serre, S. & Pernin, P. (2000). Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* **47**, 116–121.
- Philippe, H. & Adoutte, A. (1996). The molecular phylogeny of protozoa: solid facts and uncertainties. In *Evolutionary Relationships among Protozoa*, pp. 25–52. Edited by G. H. Coombs, K. Vickerman, M. A. Sleigh & A. Warren. London: Kluwer Academic.
- Philippe, H., Lopez, P., Brinkmann, H., Budin, K., Germot, A., Laurent, J., Moreira, D., Müller, M. & Le Guyader, H. (2000). Early-

- branching or fast-evolving eukaryotes? An answer based on slowly evolving positions. *Proc Biol Sci* **267**, 1213–1221.
- Poe, S. & Swofford, D. L. (1999).** Taxon sampling revisited. *Nature* **398**, 299–300.
- Posada, D. & Crandall, K. A. (2001).** Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst Biol* **50**, 580–601.
- Reece, K. S., McElroy, D. & Wu, R. (1992).** Function and evolution of actins. *Evol Biol* **26**, 1–34.
- Richards, T. A., Vepritskiy, A. A., Guliamova, D. E. & Nierzwicki-Bauer, S. A. (2005).** The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages. *Environ Microbiol* **7**, 1413–1425.
- Rodriguez, F., Derelle, E., Guillou, L., Le Gall, F., Vaultot, D. & Moreau, H. (2005).** Ecotype diversity in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Environ Microbiol* **7**, 853–859.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003).** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
- Rosselló-Mora, R. & Amann, R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 39–67.
- Sanderson, M. J. & Shaffer, H. B. (2002).** Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. *Annu Rev Ecol Syst* **33**, 49–72.
- Scheckenbach, F., Wylezich, C., Mylnikov, A. P., Weitere, M. & Arndt, H. (2006).** Molecular comparisons of freshwater and marine isolates of the same morphospecies of heterotrophic flagellates. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6638–6643.
- Schlegel, M. & Meisterfeld, R. (2003).** The species problem in protozoa revisited. *Eur J Protistol* **39**, 349–355.
- Schmidt, S. L., Bernhard, D., Schlegel, M. & Fried, J. (2006).** Fluorescence in situ hybridization with specific oligonucleotide rRNA probes distinguishes the sibling species *Stylonychia lemnae* and *Stylonychia mytilus* (Ciliophora, Spirotrichea). *Protist* **157**, 21–30.
- Shalchian-Tabrizi, K., Eikrem, W., Klaveness, D., Vaultot, D., Minge, M. A., Le Gall, F., Romari, K., Throndsen, J., Botnen, A. & other authors (2006a).** *Telonemia*, a new protist phylum with affinity to chromist lineages. *Proc Biol Sci* **273**, 1833–1842.
- Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M. A., Cavalier-Smith, T., Nedreklepp, J. M., Klaveness, D. & Jakobsen, K. S. (2006b).** Combined heat shock protein 90 and ribosomal RNA sequence phylogeny supports multiple replacements of dinoflagellate plastids. *J Eukaryot Microbiol* **53**, 217–224.
- Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (1994).** Bacterivory and herbivory: key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *Microb Ecol* **28**, 223–235.
- Slapeta, J., Lopez-Garcia, P. & Moreira, D. (2006).** Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. *Mol Biol Evol* **23**, 23–29.
- Swofford, D. L. (2002).** PAUP*: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other methods). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tsuchiya, M., Kitazato, H. & Pawlowski, J. (2003).** Analysis of internal transcribed spacer of ribosomal DNA reveals cryptic speciation in *Planoglabratella opercularis*. *J Foraminiferal Res* **33**, 285–293.
- van Hoek, A. H., van Alen, T. A., Sprakel, V. S., Hackstein, J. H. & Vogels, G. D. (1998).** Evolution of anaerobic ciliates from the gastrointestinal tract: phylogenetic analysis of the ribosomal repeat from *Nyctotherus ovalis* and its relatives. *Mol Biol Evol* **15**, 1195–1206.
- von der Heyden, S. & Cavalier-Smith, T. (2005).** Culturing and environmental DNA sequencing uncover hidden kinetoplastid biodiversity and a major marine clade within ancestrally freshwater *Neobodo designis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2605–2621.
- von der Heyden, S., Chao, E. E., Vickerman, K. & Cavalier-Smith, T. (2004).** Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomemid flagellates and the evolution of euglenozoa. *J Eukaryot Microbiol* **51**, 402–416.
- Weitere, M. & Arndt, H. (2002).** Water discharge-regulated bacteria/heterotrophic nanoflagellate (HNF) interactions in the water column of the river Rhine. *Microb Ecol* **44**, 19–29.
- Weitere, M. & Arndt, H. (2003).** Structure of the heterotrophic flagellate community in the water column of the river Rhine (Germany). *Eur J Protistol* **39**, 287–300.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, pp. 315–322. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White. San Diego: Academic Press.
- Zhao, Y., Yu, Y., Feng, W. & Shen, Y. (2003).** Growth and production of free-living heterotrophic nanoflagellates in a eutrophic lake – Lake Donghu, Wuhan, China. *Hydrobiologia* **498**, 85–95.

Chemical induction of mixis in the rotifer *Synchaeta tremula*

NADINE TIMMERMEYER[†] AND CLAUS-PETER STELZER^{*‡}

INSTITUTE OF ECOLOGY AND EVOLUTION, UNIVERSITY OF MUNSTER, HÜFFERSTR 1, 48149 MUNSTER, GERMANY

[†]PRESENT ADDRESS: ANIMAL EVOLUTIONARY ECOLOGY, UNIVERSITY OF TÜBINGEN, AUF DER MORGENSTELLE 28, 72076 TÜBINGEN, GERMANY

[‡]PRESENT ADDRESS: INSTITUTE FOR LIMNOLOGY OF THE AUSTRIAN ACADEMY OF SCIENCES, MONDSEESTRASSE 9, 5310 MONDSEE, AUSTRIA

*CORRESPONDING AUTHOR: claus-peter.stelzer@oeaw.ac.at

Received April 12, 2006; accepted in principle August 4, 2006; accepted for publication September 26, 2006; published online September 27, 2006

Communicating editor: R.P. Harris

In rotifers of the genus Brachionus, a chemical factor that accumulates during population crowding is necessary and sufficient to trigger sexual reproduction (mixis). In other monogonont rotifer species, field data and some laboratory studies indicate that mixis is density-dependent; however, to date it is unknown whether this reaction is chemically mediated as in Brachionus. Here we provide experimental evidence that mixis in the rotifer Synchaeta tremula is both density-dependent and chemically mediated. S. tremula cultured at high population densities (10 individual mL⁻¹) produced 15.4% mictic offspring, whereas those cultured at low population densities (0.25 individual mL⁻¹) produced only 0.3% mictic offspring. Conditioned water isolated from exponentially growing mass cultures induced significantly higher levels of mixis in the offspring of individually cultured females, when compared with untreated control medium (15.7 versus 1.4% mixis). In S. tremula, the propensity of females to respond to the mixis chemical decreased strongly with age. The highest proportion of mictic offspring (up to 63%) was produced by females of the youngest adult age class (~24–48 h old). Females older than 3 days were virtually unresponsive to the mixis stimulus.

INTRODUCTION

Phenotypic plasticity in the life cycle of zooplankters is often mediated by infochemicals (Larsson and Dodson, 1993). Examples are predator kairomones that induce defensive structures or changes in the timing of development (Tollrian and Harvell, 1999; Lass and Spaak, 2003) or chemicals that suppress growth and reproduction (Folt and Goldman, 1981; Conde-Porcuna, 1998; Burns, 2000; Lüring *et al.*, 2003). The induction of sexual life cycle stages is another important component that can be influenced by chemicals, and this applies for zooplankters with heterogonic life cycles, such as cladocerans or rotifers. In both groups, population crowding can induce the production of sexual stages (Gilbert, 1963, 2004; Kleiven *et al.*, 1992). In rotifers of the genus *Brachionus*, crowding chemicals that accumulate at high population densities are necessary and sufficient to elicit the production of sexual females (Stelzer and Snell, 2003, 2006).

The life cycle of monogonont rotifers involves an alternation between parthenogenetic and sexual reproduction (mixis). During induction of mixis, parthenogenetic (amic) females produce sexual (mictic) daughters, which then produce either resting eggs or males, depending on whether they have been fertilized or not. Three proximate factors for mixis induction have been identified so far. In several *Asplanchna* species, dietary α -tocopherol induces mixis as well as morphological changes (Gilbert, 1980). In *Notomata*, a change in the photoperiod can induce mixis (Pourriot and Clement, 1981). Finally, in *Brachionus* spp. mixis is induced by a density-dependent chemical (Gilbert, 1963; Stelzer and Snell, 2003, 2006). Although these are the proximate factors that trigger the mixis response, its actual magnitude may depend on other factors as well. For example, the level of mixis is often genotype-dependent, with some clones consistently showing higher or lower levels of mixis (Gilbert, 2003a). Another potentially

important factor is ‘delayed mixis’, meaning that females tend to be less responsive to the mixis stimulus for a few generations after hatching from resting eggs (Gilbert, 2002; Schröder and Gilbert, 2004; Serra *et al.*, 2005). Finally, environmental factors such as unfavourable conditions (low food, extreme salinity and toxicants) tend to suppress the response to the mictic stimulus (Snell, 1986).

The adaptive significance of density-dependent mixis in *Brachionus* is well understood. The association of sexual reproduction with high population densities is probably related to the fact that *Brachionus* males cannot locate females from a distance and rely solely on chance encounters (Snell and Garman, 1986). Hence, density-dependent mixis induction increases the probability of male–female encounters and maximizes the production of resting eggs (Serra and King, 1999; Gilbert, 2003a; Serra *et al.*, 2004). Theoretically, these arguments should apply for other monogonont rotifer species as well.

In other monogonont rotifer species, field studies indicate that mixis is often associated with population peaks (Carlin, 1943; Zimmermann, 1974; Schröder, 2001; Virro, 2001). Additionally, a recent experimental study provided direct evidence for density-dependence of mixis in two non-brachionid rotifers (Schröder and Gilbert, 2004). However, so far it is not known whether chemical induction is the mechanism behind this response. In this study, we test the hypothesis that mixis induction in the rotifer *Synchaeta tremula* is both density-dependent and chemically mediated. More specifically, we test (i) whether females show elevated mixis rates if kept at high population densities and (ii) whether individually cultured females induce mixis if kept in conditioned medium (i.e. medium conditioned by dense populations).

METHOD

Synchaeta tremula was isolated in early spring 2005 from a shallow pond close to the Institute of Evolution and Ecology in Münster (North-West Germany). We established a monoclonal culture from one individual stem female. Rotifers were maintained in 0.45- μm filtered pond water (GFF, Whatman) that was mixed 1:1 with Marine Biological Laboratory (MBL) medium (Guillard, 1975). We used *Cryptomonas erosa* as food algae (kindly provided by W. Lampert), which was cultured in pure MBL medium. Food concentrations were 3 mg C L⁻¹ ($\sim 20\,000$ cells mL⁻¹). The algal and rotifer cultures were maintained at 16°C and at a photoperiod of light : dark 12:12 h. Stock cultures of algae and rotifers were maintained in sterile Erlenmeyer flasks. In the experiments, rotifers were cultured in polystyrene Petri dishes or in the concavities of tissue culture plates (6-wells or 24-wells).

Pre-cultures

To provide amictic females for the two experiments, we pre-cultured females individually in 20 mL medium in polystyrene Petri dishes. Each time their first offspring hatched (i.e. after ~ 48 h), the new generation was transferred into fresh medium. Under these conditions, *S. tremula* reproduces exclusively asexually (Timmermeyer, personal observation). After culturing the animals for at least three generations under these conditions, juvenile offspring (age 0–2 h) were collected from different mothers and randomly assigned to the different experimental treatments.

Crowding experiment

The first experiment addressed the question whether population crowding can induce sexuality in *S. tremula*. Experimental females were assigned to two treatments. A high-density treatment contained five replicates and was initiated with each 10 juveniles (taken from the pre-cultures) per 1 mL culture medium (i.e. 10 individual mL⁻¹). A low-density treatment contained 10 replicates with five juveniles in 20 mL culture medium (i.e. 0.25 individual mL⁻¹). Because *S. tremula* release their eggs directly into the medium, we had to use a special transfer procedure. Experimental females and culture medium were transferred to new wells/dishes in the morning and in the evening during the 5 consecutive days of the experiment. After the transfers of the females, algae were added from dense cultures to replenish grazed food. The emptied wells/dishes were filled with fresh medium and incubated for another day until all offspring had hatched. Subsequently, offspring were sorted individually into the concavities of 24-well tissue culture plates (1 mL medium), cultured for an additional two days and then typed as mictic or amictic female, depending on the offspring type they produced. For statistical analysis, we pooled data of two randomly chosen pairs of dishes of the low-density treatment, to ensure that our estimates of the mixis rates in both treatments were based on approximately the same number of analysed offspring. We used the Mann–Whitney *U*-test on the percentage of mictic offspring per well/dish as a dependent variable. Differences in the mixis rates among consecutive days of the experiment were analysed by a row-by-column test of independence and the χ^2 statistic (high-density treatment only).

Conditioned water experiment

In the second experiment, we cultured individual females in large volumes (4 mL) and exposed them to conditioned medium from exponentially growing rotifer mass

cultures. Population densities in these mass cultures had reached at least 50 individual mL^{-1} at the time when conditioned medium was prepared. To obtain a measure of the inductive strength of the conditioned medium, we determined mixis rates in the mass cultures by sampling and typing each of 24 newborn females. To prepare conditioned medium, we pooled 60 mL medium from several mass cultures. Rotifers were removed with a 30- μm sieve, and the culture medium was filtered through 0.45- μm glass fibre filters (Whatman GFF). Finally, *Cryptomonas* algae were added from dense cultures. Conditioned medium was freshly prepared during each day of the experiment. The experiment was initiated with 50 juveniles (from the pre-cultures) that were exposed to conditioned medium and 50 juveniles that were exposed to untreated culture medium, which served as a negative control. The experiment was run for 3 days, and offspring of the experimental animals were isolated in the morning and evening of each day using the transfer schedule as described in the first experiment. This resulted in five consecutive samples where eggs had been isolated from the mothers: sample 1 (morning of the second day), sample 2 (evening of the second day), sample 3 (morning of the third day), sample 4 (evening of the third day) and sample 5 (morning of the fourth day). For the analysis of age-specific effects, we condensed these five samples into three age classes: age class 1 (sample 1), age class 2 (samples 2+3) and age class 3 (samples 4+5). The actual process of mixis induction, that is, the decision whether an individual offspring will be mictic or amictic, happens very early in development, most likely during oocyte growth in the mother animal (Gilbert, 2003a). For our samples, this means that all eggs, which are found on the bottom of the wells, were already determined with respect to their fate (mictic or amictic offspring). Induction probably happened several hours before, during the production of these eggs. Thus, our age classes 1–3 correspond closely to the actual timing of mixis induction on the experimental days 1–3, respectively. To test for differences in mixis among the different age classes, we analysed the frequencies of mictic and amictic daughters with a row-by-column test of independence and the χ^2 statistic (conditioned water treatment only).

RESULTS

The results of our first experiment showed that population crowding can induce high levels of mixis in the experimental females. Four replicates in the high-density treatment (10 individual mL^{-1}) showed mixis levels ranging between 15.7 and 28.3% (Fig. 1). Inexplicably, the

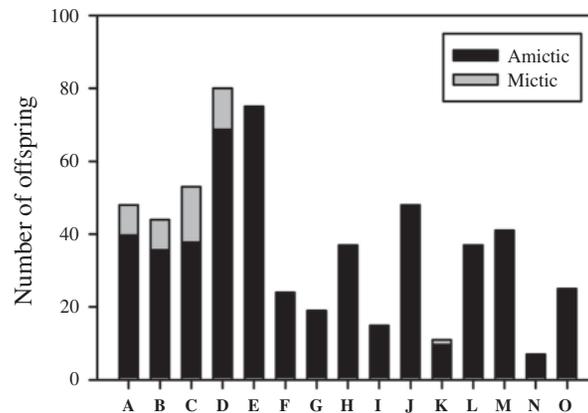


Fig. 1. Effect of population crowding on the induction of mixis in *Synchaeta tremula*. A–E, high-density treatments (10 females in 1 mL medium); F–O, low-density treatments (5 females in 20 mL).

fifth replicate showed no mictic offspring at all. Most low-density treatments (0.25 individual mL^{-1}) resulted in amictic offspring only. Just in one replicate, one mictic offspring was found (replicate ‘K’, see Fig. 1). On average, our crowding treatment induced 15.4% mictic offspring, which was statistically significant (Mann–Whitney U -test: $P < 0.05$, $n = 5$). A closer look at the temporal pattern of mixis in the high-density treatment showed that mixis levels differed considerably during consecutive days of the experiment (Fig. 2). The highest value of 27.7% was reached on the third day, followed by 14% on the fourth day. In contrast, on the second and on the fifth day only a very low percentage of mictic offspring was produced ($<2\%$). This temporal heterogeneity of mixis rates was statistically significant (row-by-column test, $\chi^2 = 38.02$, $df = 2$, $P < 0.001$).

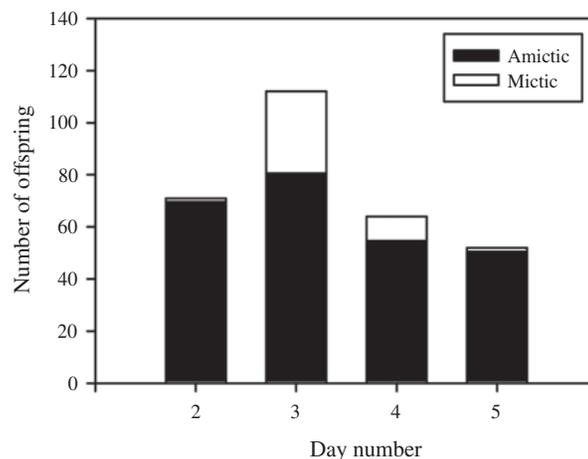


Fig. 2. Development of mixis during the crowding experiment. Only the high-density treatment is displayed.

In the second experiment, conditioned medium was prepared from mass cultures that grew exponentially and showed high levels of mixis induction (Table I). Population density ranged between 50 and 200 individual mL⁻¹ during the harvest of conditioned medium. Experimental females treated with conditioned medium produced on average 15.7% mictic offspring, in contrast to 1.4% mictic offspring in the negative control. This difference was highly significant (Mann–Whitney *U*-test: $P < 0.001$, $n = 42-45$). The responses of individual females were very variable: some females produced up to 45% mictic offspring, whereas others produced no mictic offspring at all (Fig. 3).

An alternative way to analyse mixis levels is to score the experimental females according to two categories: those that produce at least one mictic offspring during the experimental period versus those that produce no mictic offspring at all. In this case, the proportion of females producing at least one mictic offspring is significantly higher if they are cultured in conditioned medium (74 versus 14%; Fisher’s exact test: $P < 0.001$). Overall, this shows that the treatment with conditioned medium had two effects: (i) conditioned medium increases the proportion of experimental females that produce any mictic offspring at all and (ii) conditioned medium increases the average percentage of mictic offspring of the experimental females. We observed no significant difference in the reproductive rates of females treated

with conditioned versus control medium (9.1 versus 8.7 offspring per female; $P = 0.307$, two-tailed Student’s *t*-test).

Similar to the first experiment, we observed temporal variation of mixis induction. In Table II, we have listed the levels of mixis induction in three age classes of the experimental females. These age classes should roughly correspond to the three successive treatments with conditioned water (see *Method* for definition of the age classes). The mixis levels in the mass cultures from which the conditioned medium was prepared showed only little variation (40.5–46.2%). In contrast, mixis induction in the experimental females showed a steep decrease with the age of the experimental females, ranging from 63.3% in age class 1 (~24 h old females) to 0.5% in age class 3 (~72 h old females). This effect of age class on mixis was highly significant (row-by-column test, $\chi^2 = 114$, $df = 2$, $P < 0.001$).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first description of *S. tremula* in laboratory culture. In our mass cultures, we observed an unusual behaviour. Females, as well as males, constantly secreted a sticky fibre from a pore near the cloaca. After extended periods in the same vessel, the animals formed large ‘web’-like structures. Freshly laid eggs

Table I: Mass cultures used for the production of conditioned medium

Culture	Day	Individual mL ⁻¹	Cond	% Mixis	Total	f	m
A	0	0.2		—			
	4	2.6		—			
	6	48.6	1	33.3	24	5	3
	7	103	2	50.0	22	11	0
	8	258		50.0	22	11	0
	9	—		—			
B	0	0.2		—			
	4	1.5		—			
	6	48.2	1	47.8	23	7	4
	7	87		—			
	8	186	3	35.7	14	5	0
	9	165		—			
C	0	0.1		—			
	4	1.6		—			
	6	—		—			
	7	70	2	37.5	24	9	0
	8	103	3	56.8	37	19	2
	9	130		—			

Cond, experimental day, on which conditioned medium was prepared; Day, days since inoculation of the mass culture; f, fertilized mictic females; m, unfertilized mictic females (male producing); total, total number of juveniles sampled (for estimation of mixis rate).

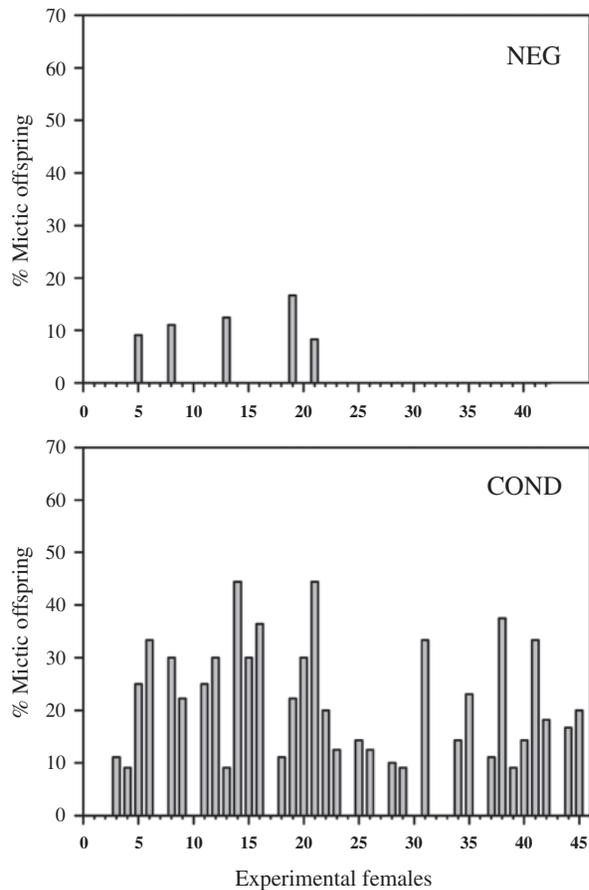


Fig. 3. Response of individual females to conditioned medium (COND) and untreated control medium (NEG). COND was 0.45- μm filtered medium from exponentially growing mass cultures of 50–200 individual mL^{-1} , which had mixis levels of 40–45%.

Table II: Influence of female age on mixis induction in the ‘conditioned water experiment’

	Age class	Mixis (%)	n	MC-mixis (%)
COND	1	63.3	30	40.5
	2	27.3	172	43.7
	3	0.5	217	46.2
NEG	1	0.0	31	—
	2	2.1	184	—
	3	1.2	155	—

Age class, roughly correspond to the successive exposures to conditioned medium in the experiment (see text for details); COND, conditioned medium; MC-mixis, mixis in the mass culture from which the conditioned water was prepared (average of two cultures); n, number of offspring examined; NEG, untreated control medium.

usually got stuck to these webs. Also, offspring hatching from the eggs often stayed connected to the webs of their stem mother, forming colony-like structures. Although

the webs themselves may be a culture artefact, the production of the fibre could indeed be of significance in the natural habitat: *S. tremula* is more common in the littoral zone than in the pelagic zone (Pontin, 1978); thus, the fibre may allow these animals to forage in the water column while it prevents them from drifting away from the shore.

Our results clearly demonstrate that mixis in *S. tremula* is induced by a density-dependent chemical factor. Mixis was significantly induced when animals were kept at high- versus low population density, as well as when individuals were cultured in medium conditioned by a mass culture versus control medium. Thus our study provides the first clear example that chemical induction of mixis is not confined to the genus *Brachionus*. The number of offspring per female was not affected by the conditioned medium in our *S. tremula* clone. In other zooplankton, conditioned water sometimes reduces the reproductive rates (Burns, 1995; Lüring *et al.*, 2003).

Age of the experimental females had a significant influence on their response to the mixis factor. This was most obvious in the ‘conditioned medium experiment’. The highest proportion of mictic daughters was induced within the first 24 h of adulthood, and mixis induction decreased sharply afterwards. This decrease was likely because of changes in the females’ responsiveness to the mixis signal rather than because of a decrease in the signal intensity, because the mixis levels in our mass cultures suggest that the conditioned medium had a constant inductive strength throughout the experiment. A similar pattern of age-related changes in mixis induction was apparent in the crowding experiment, although in this case the strong peak of mixis in the first 24 h of adulthood was absent. However, in this experiment no conditioned medium was used—the mixis chemical must have been secreted by the experimental animals themselves. It is thus possible that the chemical was not present in sufficient concentrations during the first 2 days of the crowding experiment. Age-related changes in mixis propensity have been reported by other authors as well. No uniform picture has emerged so far: mixis propensity has been found to increase or decrease with age or in some species to peak in the middle of the reproductive period (summarized in J. J. Gilbert and T. Schröder, submitted for publication).

One could argue that there is quantitative inconsistency in our data: conditioned medium, which induced 40–45% mixis in the mass cultures, induced only 15% mictic offspring in the experimental animals. As already mentioned, the age classes 1 and 2 (~24–48 h) were the most responsive ones to the mixis stimulus (up to 63% mixis induction), whereas age class 3 hardly showed any propensity to produce mictic offspring. The calculated value of 15%

mictic offspring in the conditioned water treatment refers to the average across *all* offspring produced by the age classes 1–3. In an exponentially growing population, the age distribution is typically skewed, with an excess of young age classes. This may indeed explain the higher mixis levels in our (exponentially growing) mass cultures. A similar discrepancy, between animals treated with conditioned medium versus the corresponding mass culture, was previously described in *Brachionus plicatilis* (Stelzer and Snell, 2003). In this study, mixis rates in the experimental animals reached only 51% of those in the mass culture. Several alternative explanations were discussed by the authors, for example, instability of the mixis chemical or adsorption onto filter membranes during preparation of the conditioned medium.

Mixis levels never reached 100% in our experiments. However, this does not challenge the importance of chemical induction. Indeed, mixis induction well below 100% is expected from theoretical considerations (Serra and King, 1999). This can be explained by a bet-hedging strategy that allows clonal populations to produce starvation-resistant resting eggs while continuing with asexual population growth, in case the conditions stay favourable. Some studies have shown that there is genetic variation for such mixis propensity, some clones consistently showing low/high mixis induction (Gilbert, 2003a).

Mixis induction by density-dependent chemicals may more be widespread than it is currently appreciated. Recently, Schröder and Gilbert (Schröder and Gilbert, 2004) have demonstrated density-dependent mixis in two non-brachionid species, *Rhinoglena frontalis* and *Epiphanes senta*. In fact, even the α -tocopherol-induced mixis response in *Asplanchna* spp. can be significantly enhanced by crowding (Birky, 1969). It is thus possible that these responses were also chemically mediated. Chemical induction of mixis raises several evolutionary and ecological questions. One question would be whether mixis chemicals have evolved independently or whether they are an ancient trait in monogonont rotifers that became subsequently modified during evolution. Some of these modifications could have merely changed the signal/receptor structure, whereas others could have combined chemical induction with other modes of mixis induction. From an ecological perspective, it would be interesting to know how co-occurring rotifer species avoid interference in their chemical communication systems. Many rotifer species in freshwater habitats show temporal and spatial overlap due to niche partitioning and hence may be exposed to each other's chemicals. Experimental studies on species specificity of mixis in *Brachionus* gave mixed results, some showing species specificity (Gilbert, 2003b), whereas others demonstrated cross-induction among

species (Stelzer and Snell, 2006). Thus, a more detailed characterization of the chemical mixis signal (Snell *et al.*, 2006) may help to resolve such discrepancies and provide further insights into the evolution and diversification of the mixis signal.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge financial support to C.P.S. by Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant STE 1021/3-1).

REFERENCES

- Birky, C. W. (1969) The developmental genetics of polymorphism in the rotifer *Asplanchna*: quantitative modification of developmental responses to Vitamin E, by the genome, physiological state, and population density of responding females. *J. Exp. Zool.*, **170**, 437–448.
- Burns, C. W. (1995) Effects of crowding and different food levels on growth and reproductive investment of *Daphnia*. *Oecologia*, **101**, 234–244.
- Burns, C. W. (2000) Crowding-induced changes in growth, reproduction and morphology of *Daphnia*. *Freshw. Biol.*, **43**, 19–29.
- Carlin, B. (1943) *Die Planktonrotatorien Des Motalaström* Carl Bloms Boktryckeri, Lund, Sweden.
- Conde-Porcuna, J. (1998) Chemical interference by *Daphnia* on *Keratella*: a life table experiment. *J. Plankton Res.*, **20**, 1637–1644.
- Folt, C. and Goldman, C. R. (1981) Allelopathy between zooplankton: a mechanism for interference competition. *Science*, **213**, 1133–1135.
- Gilbert, J. J. (1963) Mictic female production in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *J. Exp. Zool.*, **153**, 113–124.
- Gilbert, J. J. (1980) Female polymorphism and sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna*: evolution of their relationship and control by dietary tocopherol. *Am. Nat.*, **116**, 409–431.
- Gilbert, J. J. (2002) Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: a multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshw. Biol.*, **47**, 1633–1641.
- Gilbert, J. J. (2003a) Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: developmental and population biology. *Evol. Dev.*, **5**, 19–24.
- Gilbert, J. J. (2003b) Specificity of crowding response that induces sexuality in the rotifer *Brachionus*. *Limnol. Oceanogr.*, **48**, 1297–1303.
- Gilbert, J. J. (2004) Population density, sexual reproduction and diapause in monogonont rotifers: new data for *Brachionus* and a review. *J. Limnol.*, **63**, 32–36.
- Guillard, R. R. L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, W. L. and Chanley, M. H. (eds), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Publications, New York, pp. 29–60.
- Kleiven, O. T., Larsson, P. and Hobæk, A. (1992) Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos*, **65**, 197–206.
- Larsson, P. and Dodson, S. (1993) Chemical communication in planktonic animals. *Arch. Hydrobiol.*, **129**, 129–155.
- Lass, S. and Spaak, P. (2003) Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia*, **491**, 221–239.

- Lürling, M., Roozen, F., Van Donk, E. and Goser, B. (2003) Responses of *Daphnia* to substances released from crowded congeners and conspecifics. *J. Plankton Res.*, **25**, 967–978.
- Pontin, R. M. (1978) *Freshwater Planktonic and Semi-Planktonic Rotifera of the British Isles*. Freshwater Biological Association, Windermere.
- Pourriot, R. and Clement, P. (1981) Action de facteurs externes sur la reproduction et le cycle reproducteur des rotifères. *Acta. Oecol. Gen.*, **2**, 135–151.
- Schröder, T. (2001) Colonising strategies and diapause of planktonic rotifers (Monogononta, Rotifera) during aquatic and terrestrial phases in a floodplain (Lower Oder Valley, Germany). *Int. Rev. Hydrobiol.*, **86**, 635–660.
- Schröder, T. and Gilbert, J. J. (2004) Transgenerational plasticity for sexual reproduction and diapause in the life cycle of monogonont rotifers: intracolonial, intraspecific and interspecific variation in the response to crowding. *Funct. Ecol.*, **18**, 458–466.
- Serra, M. and King, C. E. (1999) Optimal rates of bisexual reproduction in cyclical parthenogens with density-dependent growth. *J. Evol. Biol.*, **12**, 263–271.
- Serra, M., Snell, T. W. and Gilbert, J. J. (2005) Delayed mixis in rotifers: an adaptive response to the effects of density dependent sex on population growth. *J. Plankton Res.*, **27**, 37–45.
- Serra, M., Snell, T. W. and King, C. E. (2004) The timing and proportion of sex in monogonont rotifers. In Moya, A. and Font, E. (eds), *Evolution: From Molecules to Ecosystems*. Oxford University Press, New York, pp. 135–146.
- Snell, T. W. (1986) Effect of temperature, salinity and food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis*. *Mar. Biol.*, **92**, 157–162.
- Snell, T. W. and Garman, B. L. (1986) Encounter probabilities between male and female rotifers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **97**, 221–230.
- Snell, T. W., Kubanek, J., Carter, W., Payne, A. B., Kim, J., Hicks, M. and Stelzer, C.-P. (2006) A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Mar. Biol.*, **149**, 763–773.
- Stelzer, C.-P. and Snell, T. W. (2003) Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnol. Oceanogr.*, **48**, 939–943.
- Stelzer, C.-P. and Snell, T. W. (2006) Specificity of the crowding response in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Limnol. Oceanogr.*, **51**, 125–130.
- Tollrian, R. and Harvell, C. D. (1999) *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Virro, T. (2001) Life cycle patterns of rotifers in Lake Peipsi. *Hydrobiologia*, **446/447**, 85–93.
- Zimmermann, C. (1974) Die pelagischen Rotatorien des Sempachersees, mit spezieller Berücksichtigung der Brachioniden und der Ernährungsfrage. *Schweiz. Z. Hydrol.*, **36**, 205–300.

Endosymbiosis in statu nascendi: close phylogenetic relationship between obligately endosymbiotic and obligately free-living *Polynucleobacter* strains (*Betaproteobacteria*)

Claudia Vannini,¹ Matthias Pöckl,² Giulio Petroni,¹ Qinglong L. Wu,^{2,3†} Elke Lang,⁴ Erko Stackebrandt,⁴ Martina Schrällhammer,⁵ Paul M. Richardson⁶ and Martin W. Hahn^{2*}

¹Department of Biology – Protistology and Zoology Unit, University of Pisa, Via A. Volta 4/6, I-56126 Pisa, Italy.

²Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria.

³Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, 73 East Beijing Road, Nanjing 210008, China.

⁴DSMZ GmbH – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany.

⁵Department of Zoology, University of Stuttgart, D-70550 Stuttgart, Germany.

⁶Department of Energy, Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, USA.

Summary

Bacterial strains affiliated to the phylogenetically shallow subcluster C (PnecC) of the *Polynucleobacter* cluster, which is characterized by a minimal 16S rRNA gene sequence similarity of approximately 98.5%, have been reported to occur as obligate endosymbionts of ciliates (*Euplotes* spp.), as well as to occur as free-living cells in the pelagic zone of freshwater habitats. We investigated if these two groups of closely related bacteria represent strains fundamentally differing in lifestyle, or if they simply represent different stages of a facultative endosymbiotic lifestyle. The phylogenetic analysis of 16S rRNA gene and 16S-23S ITS sequences of five endosymbiont strains from two different *Euplotes* species and 40 pure culture strains demonstrated host-species-specific clustering of the endosymbiont sequences within the PnecC subcluster. The sequences of the

endosymbionts showed characteristics indicating an obligate endosymbiotic lifestyle. Cultivation experiments revealed fundamental differences in physiological adaptations, and determination of the genome sizes indicated a slight size reduction in endosymbiotic strains. We conclude that the two groups of PnecC bacteria represent obligately free-living and obligately endosymbiotic strains, respectively, and do not represent different stages of the same complex life cycle. These closely related strains occupy completely separated ecological niches. To our best knowledge, this is the closest phylogenetic relationship between obligate endosymbionts and obligately free-living bacteria ever revealed.

Introduction

In 1975, Heckmann described a bacterial endosymbiont of the freshwater ciliate *Euplotes aediculatus* (Hypotrichia) and named it 'omikron' (Heckmann, 1975). These bacterial endosymbionts were found to be individually contained in cytoplasmic vesicles, to which ribosomes are often attached. The omikron endosymbiont is characterized by the presence of usually three to nine nucleoid-like structures (Heckmann and Schmidt, 1987). So far, omikron-like endosymbionts were reported from nine *Euplotes* species, all but one of these species inhabit freshwater systems (Görtz, 2002; Petroni *et al.*, 2002).

Heckmann demonstrated that *E. aediculatus* cured from their endosymbionts by antibiotic treatment were able to perform one to two more cell divisions but died 15–20 days after the last division (Heckmann, 1975; Heckmann and Schmidt, 1987). Treatment of aposymbiotic ciliates with ciliate homogenate containing intact omikron-like endosymbionts or by direct injection of symbiont-containing cytoplasm resulted in both, the re-establishment of the endosymbiont population, and the recovery of the temporarily aposymbiotic ciliates (Heckmann, 1975; Fujishima and Heckmann, 1984). Repeated attempts to cultivate the endosymbionts in pure culture failed completely (Heckmann, 1975). Based on these observations it was concluded that omikron is an obligately endosymbiotic bacterium, which is essential for its

Received 21 July, 2006; accepted 14 August, 2006. *For correspondence. E-mail martin.hahn@oeaw.ac.at; Tel. (+43) 6232 3125-29; Fax (+43) 6232 3578. †Present address: Division of Environmental Science and Engineering, National University of Singapore, 9 Engineering Drive 1, EA-07-23, Singapore 117576.

ciliate host (Heckmann, 1975; Heckmann *et al.*, 1983; Heckmann and Schmidt, 1987). Meanwhile, the dependence of at least eight *Euplotes* species on omikron-like endosymbionts was demonstrated (Heckmann *et al.*, 1983; Vannini *et al.*, 2005).

In 1987, Heckmann and Schmidt described the omikron endosymbiont of *E. aediculatus* as *Polynucleobacter necessarius* (Heckmann and Schmidt, 1987). This species is one of a few validly described bacterial species lacking a pure culture of its type strain. In 1996, Springer and colleagues determined the 16S rRNA gene sequence of the type strain, and verified the affiliation of the sequence to the endosymbiont by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with a *P. necessarius*-specific probe (Springer *et al.*, 1996).

From 1996 on, cloning and sequencing of polymerase chain reaction-amplified fragments of bacterial 16S rRNA genes from surface freshwater habitats yielded more than 100 sequences related to the sequence of the endosymbiont *P. necessarius* (e.g. Bahr *et al.*, 1996; Hiorns *et al.*, 1997; Semenova and Kuznedelov, 1998; Šimek *et al.*, 2001). The monophyletic cluster formed by these environmental sequences and the *P. necessarius* sequence was first designated ACK-1 cluster (Hiorns *et al.*, 1997), and later, after the discovery of the affiliation of a valid species with this cluster, it was re-named as *Polynucleobacter necessarius* cluster (Zwart *et al.*, 2002). With one exception (Pedersen *et al.*, 1996) the more than 100 retrieved environmental sequences affiliated with the *P. necessarius* cluster were obtained from surface freshwater habitats. The *Polynucleobacter* cluster contains four monophyletic, species-like (minimal 16S rRNA gene sequence similarity > 97%) subclusters (Hahn, 2003). The 16S rRNA sequences of five previously investigated endosymbionts of the two ciliate species *E. aediculatus* (Springer *et al.*, 1996; Vannini *et al.*, 2005) and *Euplotes harpa* (Vannini *et al.*, 2005) are affiliated with subcluster C (PnecC) of the *Polynucleobacter* cluster. This subcluster also contains cultivated strains isolated by the filtration acclimatization method (Hahn *et al.*, 2004) from the pelagic zone of diverse freshwater habitats (Hahn, 2003). The highest 16S rRNA gene sequence similarity between a PnecC strain isolated from freshwater and the *P. necessarius* type strain is 99.5%.

Recently, it was demonstrated by FISH with subcluster-specific probes that strains affiliated to subcluster PnecC or other *Polynucleobacter* subclusters occur with high abundances (up to 10^6 cells ml⁻¹) as free-living cells in the plankton of freshwater habitats (Hahn *et al.*, 2005; Wu and Hahn, 2006a,b). Furthermore, it was demonstrated that every ribotype [16S-23S internal transcribed spacer (ITS) genotype] detected by a cultivation-independent method in a particular habitat could be cultivated by the acclimatization method (Hahn *et al.*, 2005). On the other hand, all

previous attempts to obtain pure cultures of the *P. necessarius* endosymbionts of *E. aediculatus* by standard microbiological methods failed (Heckmann, 1975).

At first glance, it seems that the strains affiliated to the species-like subcluster PnecC fall into two groups, i.e. a group of free-living strains and a group of endosymbiotic strains. However, it is not known if these two groups differ fundamentally in lifestyle, i.e. if the one group represents obligately free-living and the other group represents obligately endosymbiotic strains, or if both groups simply represent different stages of a facultative endosymbiotic lifestyle. Previously, it was suggested that the isolated strains and the endosymbionts differ completely in lifestyle (Hahn, 2003). This suggestion was based on morphological differences between the two groups of bacteria (differences in cell shape and size, and lack of the three to nine nucleoid-like structures in strains isolated from freshwater). Meanwhile, pure cultures of new PnecC strains were established, which share with the endosymbiotic stages some of their characteristic morphological features (M.W. Hahn, unpubl. data); however, the presence of the common traits (i.e. elongated cells and nucleoid-like structures) was always restricted to minorities of the cells in the pure cultures. This observed morphological plasticity of some cultivated PnecC strains does not support the previous conclusions on differences in lifestyles of free-living and endosymbiotic stages.

In the study presented here, we investigated if the endosymbiotic and the free-living stages of PnecC bacteria really differ fundamentally in lifestyle. We examined if: (i) free-living and endosymbiotic stages differ in culturability; (ii) compared the 16S rRNA gene and ITS sequence of 40 cultivated PnecC strains and five endosymbiotic strains; (iii) searched for endosymbiotic genotypes in the pelagic of freshwater habitats with specific FISH probes; (iv) searched for potential genome reduction in endosymbiotic strains by comparison of genome sizes of endosymbiotic and free-living stages; and (v) investigated if the free-living and the endosymbiotic stages differ in the presence of slightly deleterious mutations in their ribosomal sequences. The obtained results support the hypothesis of fundamental differences in the lifestyles of free-living and endosymbiotic PnecC bacteria. Thus, the species-like subcluster PnecC contains closely related obligate endosymbionts and obligate free-living strains. Consequently, the subcluster PnecC contains at least three groups of strains (two groups of host-specific endosymbionts, and the free-living strains) occupying completely separated ecological niches. To our best knowledge, the PnecC bacteria represent the closest phylogenetic relationship between obligate endosymbionts and obligately free-living bacteria ever revealed, and the *Polynucleobacter*–*Euplotes* system most likely represents the evolutionary youngest obligate endosymbiosis discovered so far.

Table 1. Investigated endosymbionts and their hosts.

Endosymbiont	Host	Host strain	Origin		Deposition	Reference
			Habitat	Site		
<i>Polynucleobacter</i> sp.	<i>Euplotes harpa</i>	FSP1.4	Brackish water	Pisa, Italy	–	Vannini <i>et al.</i> (2005)
<i>Polynucleobacter</i> sp.	<i>Euplotes harpa</i>	BOD2	Brackish water	Boderne, Denmark	–	Petroni <i>et al.</i> (2002)
<i>Polynucleobacter</i> sp.	<i>Euplotes harpa</i>	FC1	Brackish water	Taranto, Italy	–	Vannini <i>et al.</i> (2005)
<i>Polynucleobacter</i> <i>necessarius</i>	<i>Euplotes aediculatus</i>	STIR1	Freshwater	Parma, Italy	–	Petroni <i>et al.</i> (2002)
<i>Polynucleobacter</i> <i>necessarius</i>	<i>Euplotes aediculatus</i>	ATCC 30859 ^a	Freshwater	Marseille, France	ATCC ^b	Heckmann and Schmidt (1987)

a. ATCC 30859 is identical with clone 15 of *E. aediculatus* (Heckmann and Schmidt, 1987).

b. ATCC, American Type Culture Collection.

Results

Analysis of ribosomal sequence

The 16S rRNA gene sequences and 16S-23S ITS sequences of 45 strains affiliated with the species-like subcluster PnecC of the *Polynucleobacter* cluster were analysed. The 45 strains included 40 pure culture strains isolated from freshwater habitats (subsequently termed free-living strains), and five endosymbiotic strains hosted by the ciliates *E. aediculatus* (two strains) and *E. harpa* (three strains) (Table 1). Phylogenetic analysis as well as analysis by BLAST indicated that the set of 16S rRNA sequences of the 40 pure culture strains included those *Polynucleobacter* sequences closest related to the endosymbiont sequences, i.e. public databases did not contain any environmental *Polynucleobacter* sequence more similar to the endosymbiont sequences as the analysed sequences. The aligned sequence set consisted of 2022 positions (1505 positions belonged to the partial 16S rRNA gene sequences, and 517 positions to the ITS sequences). The 16S rRNA gene sequence newly obtained from the type strain of *P. necessarius*

(harboured by *E. aediculatus* strain ATCC 30859) differed in four positions from the previously determined sequence [Accession Number X93019 (Springer *et al.*, 1996)]. None of the four positions in the new sequence were in conflict with the secondary structure model of the 16S rRNA provided by the ARB software package therefore further analysis was based on the new sequence.

The 16S rRNA gene and ITS sequences of the two endosymbionts of *E. aediculatus* strains ATCC 30859 and STIR1, which were obtained from sites located more than 400 km apart from each other (Fig. 1), were identical over the entire length of 2002 nucleotides (0 polymorphic sites). The three sequences obtained from the endosymbionts of the three *E. harpa* strains (isolated from habitats located up to 3000 km apart) possessed one polymorphic position in the 16S rRNA gene, and three polymorphic positions in the ITS. In contrast, sequences of the 40 free-living PnecC strains contained 106 polymorphic sites, and sequences of strains obtained from the same habitat possessed 2–60 polymorphic sites (nine habitats; two to six isolates per habitat; in average

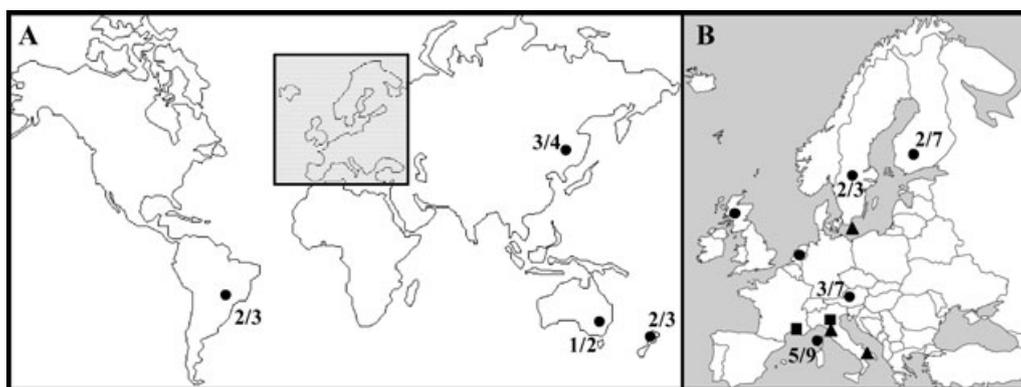


Fig. 1. Geographic location of the sites from which the five endosymbiont bearing *Euplotes* spp. strains (*E. aediculatus*, squares; *E. harpa*, triangles), and the 40 free-living *Polynucleobacter* sp. (circles) strains affiliated with subcluster PnecC were isolated. If more than one isolate was obtained from the same region, the number of habitats (first number) and the number of strains (second number) obtained from the respective region are indicated. The five *Euplotes* spp. cultures harbouring the endosymbiotic strains were each obtained from habitats located in different regions. The European area (framed in A) from which the majority of investigated strains were obtained is shown in B with a higher magnification.

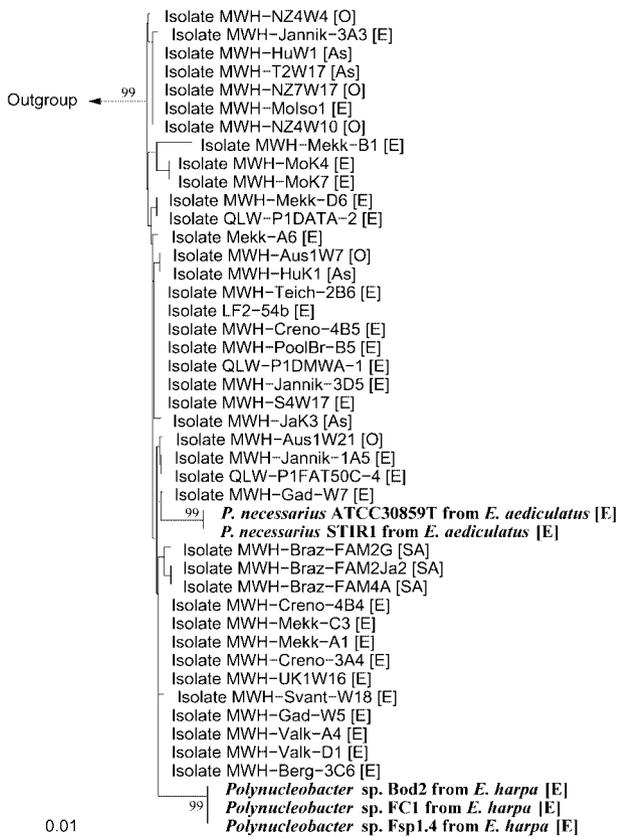


Fig. 2. Neighbour-joining tree based on almost complete 16S rRNA sequences (*E. coli* position 39–1542) of endosymbiotic (highlighted in bold) and free-living strains affiliated with subcluster C (PnecC) of the *Polynucleobacter* cluster. The tree was calculated with a set of sequences including the shown 45 sequences affiliated with subcluster PnecC, as well as sequences of 12 PnecD strains, one PnecB strain and one *Ralstonia solanacearum* strain (outgroup). The geographic origin of the isolates is indicated in brackets (E, Europe; As, Asia; O, Oceania; SA, South America). Bootstrap 1000 iterations values of > 60% are shown. The scale bar indicates 1% estimated sequence divergence.

25.2 polymorphic sites in sequences of strains from the same habitat). The highest number of polymorphic sites in sympatric strains was found in six isolates obtained from Lake Mekkojärvi (Finland).

Phylogenetic trees based on 16S rRNA gene or ITS sequences, respectively, of the 45 PnecC strains and several strains affiliated with other *Polynucleobacter* subclusters were calculated by three methods. In all trees the endosymbiont sequences clustered within the radiation of subcluster PnecC (Figs 2 and 3). The endosymbiont sequences obtained from *E. aediculatus* and *E. harpa* hosts never appeared in a common cluster separated from all sequences of free-living strains, but appeared as two separate host-specific clusters within the PnecC subcluster. The sequences of the two host-specific groups of endosymbionts showed for both phylogenetic markers the highest divergence from other members of this sub-

cluster (Figs 2 and 3). Besides the higher number of mutations in all five ribosomal sequences of endosymbionts, the three *E. harpa* endosymbionts possessed in comparison with other members of the *Polynucleobacter* cluster a significantly higher number of base pair mismatches in helices (according to the secondary structure model provided by the software package ARB) (Fig. 4). Interestingly, this trait is not shared by the two endosymbionts of *E. aediculatus*.

The 16S rRNA gene sequences of the endosymbiotic strains possessed host species-specific signatures. For instance, both endosymbionts of *E. aediculatus* contain an insertion of a guanine nucleotide between positions 193 and 194 (*Escherichia coli* numbering), and all three endosymbionts of *E. harpa* possessed the same signature of seven single-nucleotide substitutions in stem regions, resulting in mismatches in base pairing. These characteristics were found neither in any of the > 100 *Polynucleobacter* strains so far isolated from freshwater habitats, nor in one of the > 100 environmental *Polynucleobacter* sequences deposited in the public databases.

The 16S rRNA gene sequences of the endosymbiotic *Polynucleobacter* bacteria and the free-living *Polynucleobacter* strains differ only in a few positions. Such small sequence dissimilarities have so far not been reported for obligate endosymbionts and their closest free-living relatives (Table 2).

Genome size and G + C content of *Polynucleobacter* bacteria

The genome size of three endosymbiotic and 11 free-living *Polynucleobacter* strains were determined by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The endosymbiotic strains possessed genome sizes of 1.7 and 1.8 Mb, while the eight free-living strains affiliated with subcluster PnecC possessed significantly larger genome sizes (*t*-test, $P < 0.001$) ranging from 2.1 to 2.5 Mb (Fig. 5). Genome sequencing of the freshwater isolate QLW-P1DMWA-1 (ongoing project, M.W. Hahn and P.M. Richardson, unpubl. data) and genome size determined for this strain by PFGE (Fig. 5) resulted in both cases in genome sizes of 2.2 Mb. On the other hand, the three investigated free-living strains affiliated with subcluster PnecD possessed genome sizes, which did not differ significantly from the genome size of the endosymbiotic PnecC strains (*t*-test, $P > 0.1$). Though the genus *Polynucleobacter* is affiliated with the family *Burkholderiaceae* (*Burkholderiales*, *Betaproteobacteria*), *Polynucleobacter* strains studied here differ significantly in genome size (Fig. 5B) and G + C content (Fig. 6) from all other *Burkholderiaceae* strains investigated so far.

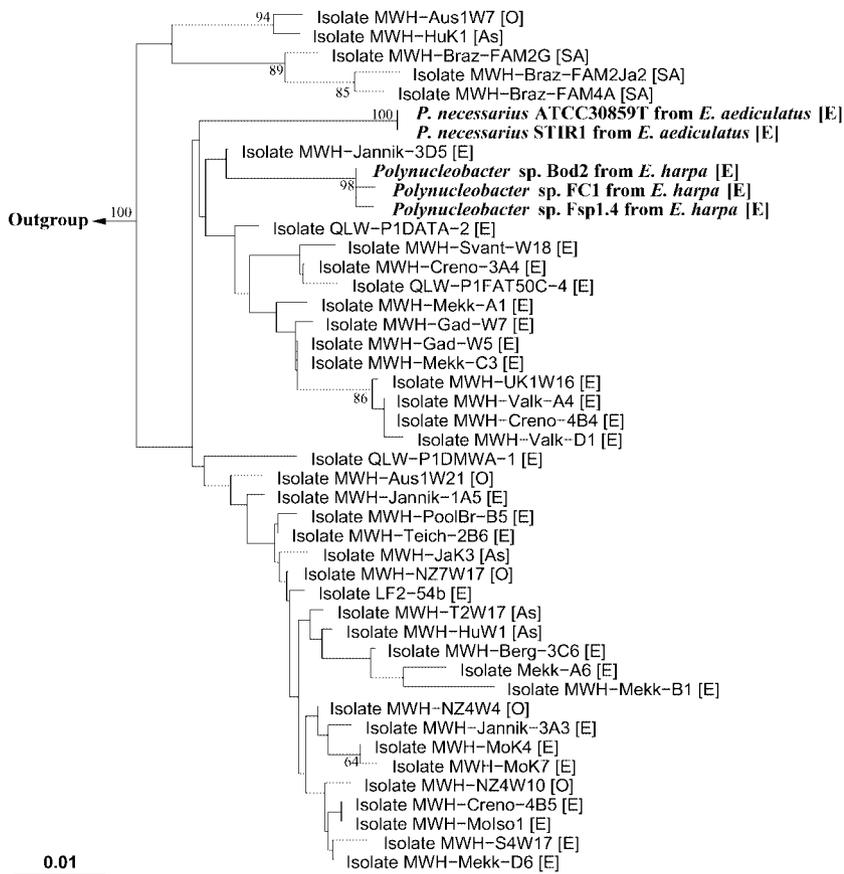


Fig. 3. Neighbour-joining tree based on complete 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) sequences (approximately 500 bp) of endosymbiotic (highlighted in bold) and free-living strains affiliated with subcluster PnecC of the *Polynucleobacter* cluster. The tree was calculated with 59 sequences of the same organisms as used for the calculation of the 16S rRNA tree (Fig. 2). All other details as described in Fig. 2.

Cultivation experiments with two endosymbiotic strains

Attempts to cultivate two endosymbiotic *Polynucleobacter* strains by using the filtration-acclimatization method (FAM) and the dilution-acclimatization method (DAM) did not result in pure cultures of the strains. In the case of the FAM, the failure of the experiment was most likely a result of the inability of the endosymbiotic strains to pass through 0.2 µm filters. Microscopical investigations of 0.2 µm-filtrates of the endosymbiont-containing ciliate homogenate did not result in the detection of endosymbionts. Nevertheless, samples were further processed by the acclimatization method, but no *Polynucleobacter* cultures were finally obtained.

In the experiments performed with the DAM, the presence of intact endosymbiont cells in the homogenates used as inoculum was verified microscopically. Diluted and undiluted homogenates were acclimatized to higher substrate concentrations, and finally screened for the presence of PnecC bacteria by FISH. In order to increase the chances of successful cultivation, different initial media were used in the acclimatization processes. In some experiments, acclimatization to higher substrate concentrations was substituted by cultivation in sterile ciliate homogenate instead. None of these cultivation

experiments did result in any cultures of *Polynucleobacter* strains. Several established cultures, however, showed growth of non-*Polynucleobacter* strains, which obviously originated from free-living strains, which were present in large numbers in the ciliate cultures and as minor fractions in the ciliate homogenate used for the cultivation experiments. The growth of these bacteria demonstrated, however, that the homogenates used for the cultivation experiments contained viable bacteria.

Investigation of ciliate cultures by FISH

The sequence of probe Omi10 published by Springer and colleagues (Springer *et al.*, 1996) did not match with the 16S rRNA sequence of the *P. necessarius* type strain (ATCC 30859) published by the same authors, but matched perfectly with the sequence obtained from the type strain in our study, as well as the sequence of *P. necessarius* strain STIR1 (Vannini *et al.*, 2005). Therefore, we used in our study probe Omi10, as well as the new probe Omi10-mod, which was adjusted to the 16S rRNA sequence of *P. necessarius* ATCC 30859 published by Springer and colleagues. Both probes did not match (one or two mismatches) with any of the more than 100

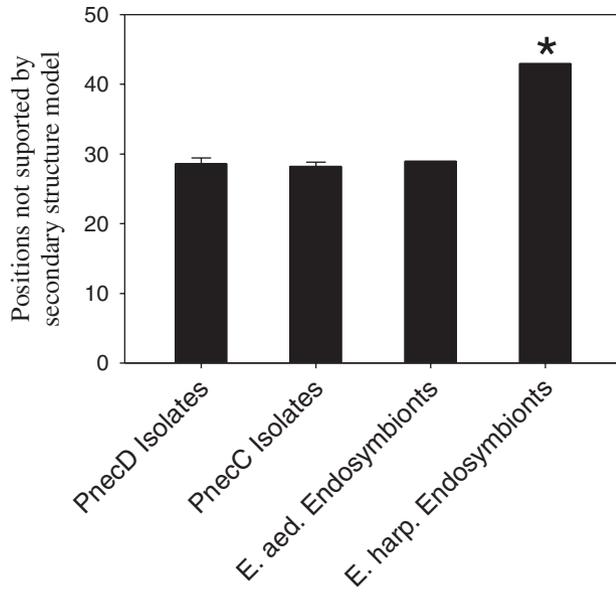


Fig. 4. Base pair mismatches in helices of the 16S rRNA as suggested by a secondary structure model provided by the software package ARB (Ludwig *et al.*, 2004). The sequences of the three *E. harpa* endosymbionts differ significantly ($P < 0.05$, one-way ANOVA) in the number of base pair mismatches from all other groups (asterisk). Only sequences obtained by direct sequencing of the 16S rRNA gene were considered in this analysis. In total, 62 sequences were analysed. Error bars depict standard deviation. PnecC, subcluster C; PnecD, subcluster D of the *Polynucleobacter* cluster (Hahn, 2003); *E. aed.*, *E. aediculatus*; *E. harp.*, *E. harpa*.

16S rRNA sequences of all free-living strains, or with the sequences of the three endosymbiotic *Polynucleobacter* strains found in *E. harpa* (Vannini *et al.*, 2005). Hybridization conditions appropriate for the discrimination of the *P. necessarius* endosymbionts of *E. aediculatus* from all other members of subcluster PnecC were established for both probes. The appropriate formamide concentration for the original probe Omi10 was found to be much higher than the concentration for probe Omi10-mod (65% versus 35%). This may indicate that the original probe fits perfectly to the sequence of the 16S rRNA gene; however, probe Omi10-mod also allowed the discrimination of *P. necessarius* endosymbionts from the other PnecC strains. FISH performed on *Euplotes* spp. cells picked one by one by a micropipette and fixed on a glass slide resulted in the detection of many *Polynucleobacter* symbionts inside of the ciliate cells, but never resulted in the detection of *Polynucleobacter*-like bacteria outside the ciliate cells. Different results, i.e. the detection of cells targeted by the endosymbiont-specific probe outside of ciliates were observed when ciliates were filtered onto 0.2 μm pore size membrane filters prior to hybridization. The majority of probe-positive cells were located nearby to ciliate cells ($< 100 \mu\text{m}$), which indicates that this detection of endosymbiont genotypes outside of ciliate cells

Table 2. 16S rRNA similarities between obligate endosymbionts and the known closest related free-living species or strains.

Obligate endosymbiont	Accession No.	Host	Closest free-living species/strain	Phylogenetic distance (16S rRNA similarity)	Reference (for endosymbiont)
Endosymbiont of <i>Ixodes scapularis</i>	AB001518	Tick (<i>Ixodes scapularis</i>)	<i>Flexibacter tractuosus</i>	83.1%	Kurtii <i>et al.</i> (1996)
Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC8	AF069963	Amoebae (<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC8)	<i>Ehrlichia ruminantium</i> ^b	84.3%	Fritsche <i>et al.</i> (1999)
<i>Candidatus Tremblaya princeps</i>	AF476095	Mealybug (<i>Pseudococcus viburni</i>)	<i>Burkholderia cepacia</i>	85.6%	Thao <i>et al.</i> (2002)
<i>Caedibacter caryophyllus</i>	X71837	Ciliate (<i>Paramecium caudatum</i>)	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	85.7%	Springer <i>et al.</i> (1993)
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	L37342	Tsetse flies (<i>Glossina tachinoides</i>)	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	88.0%	Aksay (1995)
<i>Candidatus Blochmannia rupeus</i>	X92552	Ant (<i>Camponotus rufipes</i>)	<i>Serratia marcescens</i>	88.5%	Sauer <i>et al.</i> (2000)
<i>Candidatus Procabacter acanthamoebae</i>	AF177427	Amoebae (<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC12)	<i>Azovibrio restrictus</i>	88.7%	Horn <i>et al.</i> (2002)
<i>Buchnera aphidicola</i> str. APS	NC_002528	Aphid (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	<i>Shigella flexneri</i>	89.3%	Shigenobu <i>et al.</i> (2000)
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	Y07556	Amoebae (<i>Acanthamoeba castellanii</i>)	<i>Waddlia chondrophila</i> ^b	89.4%	Everett <i>et al.</i> (1999)
<i>Buchnera aphidicola</i> str. Sg	NC_004061	Aphid (<i>Schizaphis graminum</i>)	<i>Escherichia coli</i>	89.4%	Tamas <i>et al.</i> (2002)
Trophosome symbiont of <i>Riftia pachyptila</i>	M99451	Tube worm (<i>Riftia pachyptila</i>)	<i>Thiothrix nivea</i>	90.0%	Distel <i>et al.</i> (1988)
Mussel methanotrophic gill symbiont MAR2	U29164	Hydrothermal vent mussel	<i>Methylobacter luteus</i>	92.8%	Distel <i>et al.</i> (1995)
Endosymbiont of another bacterial endosymbiont	AF322016	Bataptotebacterial endosymbiont ^a	<i>Brenneria quercina</i>	93.6%	von Dohlen <i>et al.</i> (2001)
<i>Candidatus Devosia euplotes</i>	AJ548825	Ciliate (<i>Euplotes magnicirratius</i>)	<i>Devosia riboflavina</i>	95.9%	Vannini <i>et al.</i> (2004)
Secondary endosymbiont	M27040	Aphid (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	<i>Serratia plymuthica</i>	97.8%	Unterman <i>et al.</i> (1989)
<i>Candidatus Burkholderia calva</i>	AY277697	<i>Psychotria calva</i> (angiosperm plant)	<i>Burkholderia</i> sp. NF100	97.9%	Van Oevelen <i>et al.</i> (2004)
<i>Polynucleobacter</i> sp. Bod2	AM398079	Ciliate (<i>Euplotes harpa</i>)	<i>Polynucleobacter</i> sp. MMH-Creno-4B4	99.5%	This study
<i>Polynucleobacter necessarius</i> ATCC 30859 ^t	AM397067	Ciliate (<i>Euplotes aediculatus</i>)	<i>Polynucleobacter</i> sp. MMH-Gad-W7	99.5%	This study

a. Of mealybug (*Planococcus citri*).

b. Pathogenic bacterium.

Closest relatives of the endosymbionts were found by BLAST. Sequence similarities were determined after alignment of downloaded sequences by using the software program ARB.

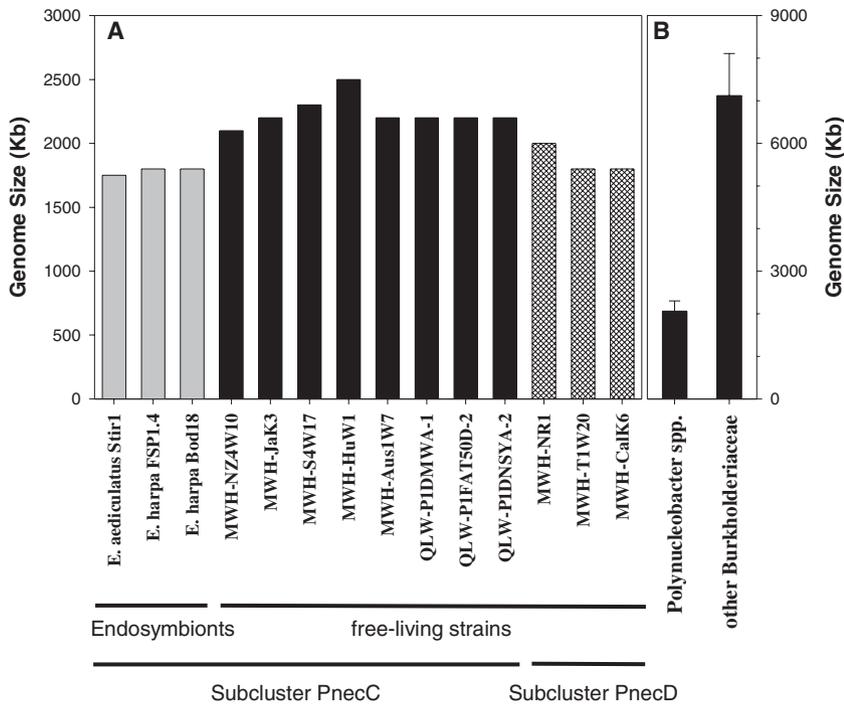


Fig. 5. A. Genome size of *Polynucleobacter* strains as determined by pulsed field gel electrophoresis. Data for endosymbiotic strains (grey bars), free-living PncC strains (black bars) and free-living PncD strains (hatched bars) are presented. Strains QLW-P1DMWA-1, QLW-P1FAT50D-2 and QLW-P1DNSYA-2 were isolated from the same habitat, share identical 16S rRNA and ITS sequences, as well as RAPD fingerprints. These three strains may represent the same clone.

B. Comparison of the genome size of the investigated *Polynucleobacter* strains and 22 other genome sequenced strains affiliated to the family *Burkholderiaceae*. These strains include members of the genera *Burkholderia*, *Ralstonia* and *Cupriavidus*. Average genome sizes and standard deviations are shown for the two groups. Genome size data of strains affiliated to the other five genera of the family are currently not available.

was an artefact resulting from the damaging of ciliate cells during the filtration process.

Because the two Omi probes did not match the sequences of the *E. harpa* endosymbionts, probe Poly_862 was used for the investigation of the *E. harpa* cultures. Again, probe-positive bacteria were detected exclusively inside of the host cells when ciliate cells have been handled carefully.

Investigation of environmental samples by FISH

Samples from the pelagic zone of five lakes and one pond were investigated by FISH (Table 3). The PncC-specific probe PncC-16S-445 detected free-living bacteria in samples from all six investigated freshwater habitats. All cells detected possessed small cell sizes typical for bacterioplankton cells. Probe-positive cells attached to particles or organisms, as well as cells located in any protist cell were not detected. Abundances of probe-positive cells ranged from 3.7×10^3 to 6.8×10^5 cells ml⁻¹. By contrast, probe Omi10-mod, which is specific for endosymbionts of *E. aediculatus*, did not detect any cells in the investigated environmental samples.

Experiments on enrichment and cultivation of *Euplotes* species from habitats containing free-living *Polynucleobacter* bacteria

Enrichment experiments were performed with samples from three lakes and one pond. These three lakes are

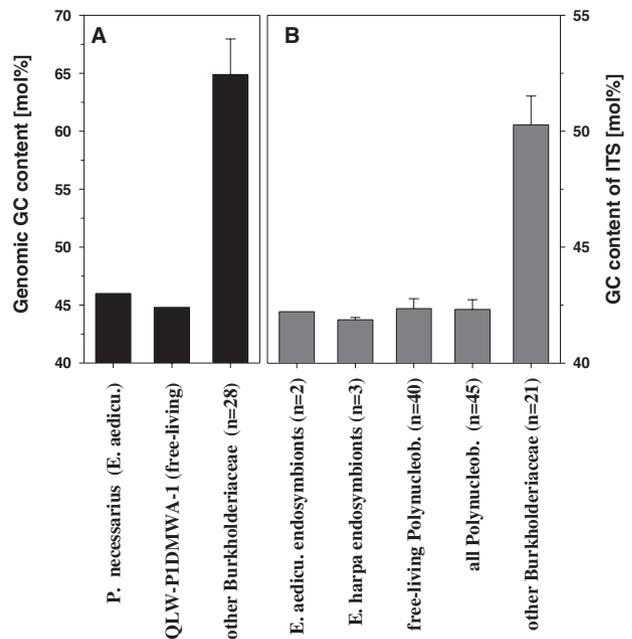


Fig. 6. G + C content of the entire genomes (A) and of the 16S-23S ITS (B) of endosymbiotic and free-living *Polynucleobacter* strains, as well as of other members of the family *Burkholderiaceae*. The genomic G + C content of the *P. necessarius* type strain (endosymbiont of *E. aediculatus*) was determined by Heckmann and Schmidt (1987), and the genomic G + C content of the free-living strain was determined by genome sequencing. The genomic G + C content of 28 other *Burkholderiaceae* strains affiliated to five different genera was taken from the literature, and is presented as average and standard deviation. The analysis of the G + C content of the ITS sequences was restricted to ITS loci including tRNA-Ala and tRNA-Ile genes.

Table 3. Detection of free-living and endosymbiotic PnecC strains in the pelagic of freshwater lakes.

Habitat	Cell numbers (10 ⁴ ml ⁻¹)	
	PnecC-16S-445	Omi10-mod
Lake Mondsee	0.4	ND
Lake Wolfgangsee ^a	0.6	ND
Lake Irrsee	1.9	ND
Lake Krottensee ^a	6.6	ND
Lake Egelsee (M2) ^a	8.4	ND
Pond Kleine Lacke	67.9	ND

a. Samples from the benthic zone of these habitats were used for attempts to isolate *Euplotes* spp.

Probe Omi10-mod is specific for the endosymbionts of *E. aediculatus*. Probe PnecC-16S-445 is specific for the entire subcluster C (PnecC) of the *Polynucleobacter* cluster. This subcluster includes endosymbionts of at least two *Euplotes* species, as well as many environmental sequences and sequences from freshwater isolates. All bacteria that hybridized with probe PnecC-16S-445 were detected outside of protist cells. ND, no detection.

known to contain populations of free-living *Polynucleobacter* bacteria (Table 3). *Euplotes* species were not observed in any of the established enrichment cultures; however, ciliates belonging to other genera could be enriched and subsequently isolated (data not shown).

Discussion

The independent phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and 16S-23S ITS sequences placed *Polynucleobacter* strains isolated from the pelagic of freshwater habitats, the endosymbionts of the freshwater ciliate *E. aediculatus* and the endosymbionts of the brackish water ciliate *E. harpa* in the species-like subcluster PnecC of the *Polynucleobacter* cluster (Figs 2 and 3). This cluster represents in terms of genome size (Fig. 5) and G + C content of ITS sequences (Fig. 6B) a homogenous group well separated from other members of the family *Burkholderiaceae*. The minimal divergence of 16S rRNA genes (0.5%) of strains isolated from freshwater habitats and endosymbionts of *Euplotes* spp. suggested a close phylogenetic relationship of these organisms. Fundamental differences in lifestyle of such closely related bacteria have not been reported so far.

For two reasons, it is highly likely that the isolated strains existed as free-living, planktonic bacteria prior to isolation. First, the investigation of a free-living population of PnecC strains in the water column of a freshwater habitat by cultivation-independent and cultivation methods resulted in the detection and cultivation of the same ribosomal genotypes (Hahn *et al.*, 2005). This demonstrated that the environmental sequences and the isolates obtained originated from a free-living population. Second, it is known that the potential hosts of endosymbiotic *Polynucleobacter* strains, i.e. *Euplotes* spp., are

usually absent from the pelagic of freshwater habitats (Foissner *et al.*, 1991; 1999). These ciliates usually inhabit interstitial, benthic sites rich in organic material (i.e. mud and detritus), and only in exceptional cases *Euplotes* spp. were reported from the pelagic of aquatic systems (Foissner *et al.*, 1999). The few observations of planktonic *Euplotes* spp. were always restricted to anoxic parts of the pelagic zone, but all isolated *Polynucleobacter* strains were obtained from oxic water bodies. By contrast, the five strains termed above 'endosymbiotic strains' undoubtedly represent endosymbionts of the two *Euplotes* species. This was repeatedly demonstrated by FISH (Springer *et al.*, 1996; Vannini *et al.*, 2005), and electron microscopy (Vannini *et al.*, 2005).

The occurrence of strains affiliated with the phylogenetically narrow subcluster PnecC as free-living and endosymbiotic stages could either be explained by a facultative endosymbiotic lifestyle of all members of the subcluster, or the members of the subcluster could fundamentally differ in lifestyle, i.e. could represent obligate endosymbionts and obligately free-living strains. The results presented here strongly argue against a facultative endosymbiotic lifestyle of the PnecC bacteria. The endosymbiotic strains demonstrated several characteristics of obligate symbionts. The analysis of the ribosomal sequences of the endosymbionts revealed a tight relationship between host species and endosymbiont genotypes (Figs 2 and 3). This host-specific linkage stands in strong contrast to the large geographical distance between the sampling sites of the endosymbionts (Fig. 1), and to the significant ribosomal gene diversity within subcluster PnecC (Fig. 3). Both clearly indicate an obligate symbiotic relationship between the hosts and the endosymbionts. The cultivation experiments indicated pronounced physiological differences between the free-living strains and the endosymbiotic strains. The inability of the endosymbiotic strains to grow in media supporting growth of free-living strains could be a result of a genetic adaptation to the environmental conditions in the cytoplasm of the host cells. This may include the loss of metabolic capabilities necessary for the survival as free-living strains, or for growth in the provided media. The lack of culturability is one indicator for obligate endosymbiosis known from numerous bacterial endosymbionts, e.g. *Buchnera* (Tamas *et al.*, 2002), *Wigglesworthia* (Aksoy, 1995), *Blochmannia* (Sauer *et al.*, 2000), and is interpreted as a loss of unneeded metabolic pathways (Moran, 2002). The lack of culturability of the *Polynucleobacter* endosymbionts, and the previously reported dependence of host cells on their endosymbionts (Heckmann, 1975; Vannini *et al.*, 2005) indicate an obligate interdependence of endosymbionts and hosts, which is a typical characteristic of obligate endosymbiosis (Zientz *et al.*, 2004). The loss of genes encoding dispensable metabolic function also

results in reduced genome sizes of obligate endosymbiotic bacteria (Moran, 2002). In several cases, their genomes are reduced to ~20% of the genome size of the closest related free-living relatives (Moran *et al.*, 2003). The majority of obligate endosymbionts investigated so far possess genome sizes of < 1.5 Mb, while the majority of free-living bacteria possess genome sizes of 2–10 Mb (Moran, 2002). In contrast to all obligate endosymbionts investigated so far (e.g. Shigenobu *et al.*, 2000; Tamas *et al.*, 2002) the genome size of the endosymbiotic *Polynucleobacter* differed much less significantly from that of the closest free-living relatives (Fig. 5). Another characteristic of the genomes of obligate endosymbionts is the accumulation of mildly deleterious mutations (Lambert and Moran, 1998). Our analysis indicated destabilizing base substitutions in the 16S rRNA genes of *E. harpa* endosymbionts but not in the *E. aediculatus* and the free-living strains (Fig. 4). Furthermore, the two groups of endosymbionts showed each for both investigated phylogenetic markers, i.e. the 16S rRNA genes and the ITS sequences, the highest divergence from other members of subcluster PnecC. This may indicate elevated rates of sequence evolution compared with free-living relatives, which was repeatedly demonstrated for other obligate endosymbionts (Aksoy, 1995; Herbeck *et al.*, 2003).

The lack of pronounced genome reduction in the *Polynucleobacter* endosymbionts, as well as the lack of an increased number of mismatches in helix regions (potentially indicating mildly deleterious mutations) of the 16S rRNA of *E. aediculatus* endosymbionts is in agreement with the proposed close phylogenetic relationship between the endosymbionts and their closest free-living relatives. This close relationship suggests that the time point of divergence of the endosymbiotic and free-living *Polynucleobacter* bacteria was much more recent than in the case of other obligate endosymbionts. In the case of *Buchnera* and their closest free-living relatives a divergence period of > 100 million years was estimated (Moran *et al.*, 2003).

In contrast to the endosymbiotic strains, an endosymbiotic lifestyle was not evident for the free-living strains. Large free-living *Polynucleobacter* populations were observed in the pelagic zone of habitats from which potential hosts, i.e. *Euplotes* spp., could not be enriched. Even if *Euplotes* spp. have been present in these habitats, their population sizes must have been several orders of magnitude smaller than the size of the free-living *Polynucleobacter* populations. This has to be expected because of the known restriction of these ciliates to the benthic zone, and as a result of further restrictions caused by a partially low habitat suitability (Foissner *et al.*, 1991; 1999) of the benthic zone in these lakes. The resulting imbalance between the population size of free-living *Polynucleobacter* bacteria and potential hosts makes a symbiotic

relationship between these organisms unlikely. Furthermore, the free-living and the endosymbiotic *Polynucleobacter* strains differ from known facultative symbionts (e.g. *Vibrio fischeri*) and known facultative parasites of protists (e.g. *Legionella* spp.) in the lack of motility. Because of this lack *Polynucleobacter* strains should be in principal unable to chemotactically find potential hosts.

Conclusions

The presented results indicate that the phylogenetically shallow subcluster PnecC harbours both, obligately free-living strains and obligate endosymbionts of at least two ciliate species. Consequently, this subcluster harbours at least three groups of organisms occupying completely separated ecological niches. Niche differentiation is well documented for more distantly related bacteria. For instance, Gray and colleagues (2004) demonstrated niche differentiation in sympatric *Achromatium* spp., which are separated by 16S rRNA gene sequence similarities of 91.5%, and Schauer and colleagues (2005) demonstrated complete niche separation in two groups of filamentous bacteria both affiliated with the SOL cluster but separated by 16S rRNA gene sequence similarities of 92.1%. The finding of niche separation in *Polynucleobacter* bacteria, as well as the ecological differentiation in *Brevundimonas alba* strains sharing identical 16S rRNA gene sequences (Jaspers and Overmann, 2004) highlights the ecological significance of microdiversity.

To our best knowledge, the phylogenetic relationship between the obligately endosymbiotic and the obligately free-living *Polynucleobacter* bacteria is the closest currently known. The closest free-living relatives of all other obligate endosymbionts investigated so far are more distantly related (Table 2). We did not find any example of an obligate endosymbiont, which also shares a 16S rRNA gene sequence similarity > 99% with its closest free-living relative. Further investigations on the evolutionary adaptations of *Polynucleobacter* endosymbionts and their hosts may provide exciting insights into processes taking place during the early evolutionary phase of endosymbiosis.

Experimental procedures

Microbial strains, culture conditions and media

The *Polynucleobacter* endosymbionts of five ciliate strains of the genus *Euplotes* (Hypotrichia) were investigated (Table 1). Three of the strains belong to the species *E. harpa*, and two strains belong to *E. aediculatus*. The strain *E. aediculatus* ATCC 30859 harbours the type strain of *P. necessarius*. The three *E. harpa* strains were cultured in artificial seawater at low salinity (5‰) at 20°C. The *E. aediculatus* strain STIR1 was cultured in sterile spring water enriched with boiled rice grains at 20°C, and *E. aedicu-*

latus strain ATCC 30859 was cultured in sterile WC medium (Guillard, 1975) at 22°C. *Euplotes aediculatus* strain ATCC 30859 was fed with the algae *Cryptomonas* sp. SAG26.80, and the other strains were fed with the green algae *Dunaliella tertiolecta*. All ciliate cultures were non-axenic. The cultures were kept in the light, either under permanent illumination (*E. aediculatus* ATCC 30859), or under a light dark cycle of 12:12 h (other strains).

Determination of 16S rRNA gene sequences and 16S-23S ITS1 sequences

For the determination of ribosomal sequences of endosymbiotic *Polynucleobacter* strains, the host ciliate cells were separated from free-living bacteria also present in the ciliate cultures by filtration onto a 15 µm pore size membrane filter, washed with sterile medium, and finally re-suspended in sterile medium. Ciliates were pelleted by centrifugation at 200 g for 10 min. DNA was extracted from the obtained biomass. The forward *Polynucleobacter*-specific primer 16S-Poly-F467 (Vannini *et al.*, 2005) and a reverse primer binding at position 457 (*E. coli* numbering) of the 23S rRNA gene (Ludwig *et al.*, 1992) were used for the amplification of ITS sequences of the endosymbionts from three *E. harpa* strains and from *E. aediculatus* STIR1. For the amplification of the 16S rRNA gene and the 16S-23S ITS of the endosymbiont of *E. aediculatus* strain E24 (ATCC 30859) the forward primer 19F (Hahn *et al.*, 2005) and the PnecC-specific reverse primer PnecCr-5 (Hahn *et al.*, 2005) were used. Amplification of 16S rRNA genes and ITS sequences of free-living strains were performed as described previously (Hahn, 2003; Hahn *et al.*, 2005).

Comparative sequence analysis

Sequences were aligned with the autoalignment tool provided by the software package ARB (Ludwig *et al.*, 2004), and alignment errors were corrected manually. Sequence polymorphisms were analysed with the software DnaSP 4.1 (Rozas *et al.*, 2003). Phylogenetic trees were calculated by using several methods. The DNAPARS program was used for maximum parsimony analysis (Felsenstein, 1989), with a bootstrap analysis of 1000 pseudoreplicates. A maximum likelihood analysis (Felsenstein, 1981; Olsen *et al.*, 1994) was performed by the FastDNAmI tool, and a neighbour-joining analysis (Saitou and Nei, 1987) was performed by the DNADIST tool with Kimura correction (Kimura, 1980), as well as by the software Mega2 (Kumar *et al.*, 2001).

Determination of genome size

The genome size of three endosymbiotic strains, eight free-living PnecC and three free-living PnecD strains was determined by PFGE. *Polynucleobacter*-harbouring ciliates and free-living *Polynucleobacter* cells were harvested and washed in sterilized artificial seawater and phosphate-buffered saline respectively. Pellets were immobilized in agarose plugs and treated as described by Strous and colleagues (2006). Pulsed field gel electrophoresis was then

performed in a contour-clamped homogeneous electric field system (CHEF-DR III; Bio-Rad) at 11°C, using 1× TAE pH 8 and 1% Seakem Gold Agarose (Cambrex). Gels were run by three resolution blocks, differing for pulse, angle and time. Fragment length was estimated by comparison with standard size ladders (*Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula wingei* PFGE Markers; Bio-Rad).

Cultivation experiments with endosymbionts

Cultivation experiments with endosymbionts of *E. aediculatus* strain STIR1 and of *E. harpa* strain FSP1.4 were performed by using the acclimatization method (Hahn *et al.*, 2004), which was successfully used for the cultivation of environmental isolates (Hahn, 2003; Hahn *et al.*, 2005). For the separation of endosymbionts from free-living bacteria present in the non-axenic ciliate cultures, the ciliate cells were filtered through a 100 µm pore-size filter, harvested onto 15 µm pore-size filters, and re-suspended in sterile IBM medium (Hahn *et al.*, 2004). Forty millilitres of these suspensions were harvested by centrifugation at 200 g (10 min) and concentrated in 4 ml of IBM medium. The endosymbionts were released from the hosts by destroying the ciliates by centrifugation at 6000 g (15 min) and subsequent vortexing. Presence of released endosymbionts in the homogenate was verified by staining with DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) and epifluorescence microscopical inspection. Furthermore, the presence of free-living bacteria in the homogenate was tested by DAPI-staining and hybridization with the probe PnecC-16S-445 (see later), which is specific for the *Polynucleobacter* cluster but did not hybridize with free-living bacteria present in the ciliate cultures. The homogenates containing the highly enriched endosymbionts were used for two different cultivation experiments: (i) samples were processed according to the standard protocol of the FAM (Hahn *et al.*, 2004) (Table 4). This method employs filtration through 0.2 µm filters for the separation of target organisms from organisms able to overgrow the target organisms; (ii) samples were processed by the DAM (Hahn *et al.*, 2005). This method employs a dilution step instead of the filtration step. Briefly, samples of 100 µl of the homogenate were diluted into six different concentrations (1:1–1:100 000). One hundred microlitres of the dilutions were used for the inoculation of wells of sterile cell culture plates (24-wells) containing 500 µl of the starting medium. Four different approaches were tried in the DAM experiments: (i) stepwise acclimatization to NSY 3 g l⁻¹ (Hahn *et al.*, 2004) using IBM as a starting medium; (ii) acclimatization to NSY 3 g l⁻¹ using ciliate homogenate filtered through a 0.2 µm pore-size membrane as a starting medium, and stepwise addition of NSY 3 g l⁻¹; (iii) cultivation attempts without any acclimatization (i.e. inoculation of NSY 3 g l⁻¹ with dilutions of the enriched endosymbionts); and (iv) cultivation in ciliate homogenate filtered through 0.2 µm pore-size filters without increasing the substrate concentration (i.e. no addition of medium). For experiments (i) and (ii) the standard acclimatization protocol described by Hahn and colleagues (2004) was followed (i.e. stepwise addition of increasing amounts of dissolved organic material). In experiments (ii) and (iv) controls receiving no inoculum were used for testing sterility of the 0.2 µm-filtered ciliate homogenate. Screening of the wells for the growth of

Table 4. Methods and conditions used in the eight cultivation experiments performed with endosymbionts from two ciliate species.

Cultivation method	Initial medium	Acclimatization medium ^a	Endosymbionts of	Dilutions × number of inoculated wells
Filtration, acclimatization	IBM medium ^b	NSY medium	<i>E. aediculatus</i> STIR1 <i>E. harpa</i> FSP1.4	3 × 24 3 × 24
Dilution, acclimatization	IBM medium ^b	NSY medium	<i>E. aediculatus</i> STIR1 <i>E. harpa</i> FSP1.4	3 × 24 3 × 24
Dilution, acclimatization	Ciliate homogenate	NSY medium	<i>E. aediculatus</i> STIR1	3 × 8
Dilution, no acclimatization	NSY medium ^c	None	<i>E. aediculatus</i> STIR1 <i>E. harpa</i> FSP1.4	3 × 24 3 × 24
Dilution, no acclimatization	Ciliate homogenate ^c	None	<i>E. aediculatus</i> STIR1	6 × 4

a. Stepwise increase of concentration.

b. Enriched with a low concentration of NSY medium.

c. No change of medium in the course of the experiment.

bacteria was performed by dropping 10 µl of samples from each well onto NSY agar plates, or in the case of experiment (iv) onto 0.2 µm-filtered ciliate homogenate solidified with agar (15 g l⁻¹). Samples of colonies grown on plates were tested for the presence of *Polynucleobacter* bacteria by FISH using the probes Omi10-mod and PnecC-16S-445 (see later).

Experiments on the isolation of *Euplotes* strains from freshwater habitats

The benthic zone of Lake Krottensee, Lake Wolfgangsee, Lake Egelsee (M2) and an unnamed pond were sampled at sites appropriate for freshwater *Euplotes* species. Samples were microscopically screened for the presence of *Euplotes* spp. immediately after sampling, as well as after several days of incubation. Aliquots of the samples were also enriched with prey organisms appropriate for *Euplotes* (i.e. *D. tertiolecta*, *Phaeodactylum* sp., *Enterobacter aerogenes*) and daily screened for the presence of *Euplotes* spp. over a 20 day period.

Analysis of ciliate cultures and environmental samples by FISH

Samples taken from ciliate cultures and from the pelagic of six freshwater habitats located in the Austrian Salzkammergut area (near Salzburg) were investigated by FISH. Twenty millilitres of samples were fixed with paraformaldehyde solution (2% final concentration) and filtered onto 0.2 µm polycarbonate membrane filters as described elsewhere (Hahn *et al.*, 2005). Whole-cell *in situ* hybridizations of sections of the filters were performed as described previously (Hahn *et al.*, 2005). In parallel, ciliate cells were also processed in a different way: they were picked one by one, together with their culture medium, by a glass micropipet and then fixed on microscope slides. Slides were then processed for FISH as described elsewhere (Petroni *et al.*, 2003). Four different Cy3-labelled oligonucleotide probes were used for the hybridization of samples: (i) probe PnecC-16S-445 (Hahn *et al.*, 2005), which is specific for the entire subcluster C (PnecC) of the *Polynucleobacter* cluster; (ii) probe Omi10 (Springer *et al.*, 1996), which is specific for the endosymbiotic *P. necessarius*; (iii) probe Omi10-mod (5'-TTT CCC CCC

TTC AGG GCG T-3', the underlined nucleotide is not contained in the probe Omi10), which is a slightly modified version of Omi10; and (iv) probe Poly_862 (Vannini *et al.*, 2005), which is specific for the entire *Polynucleobacter* cluster. Probe Omi10 is matching the 16S rRNA sequence of *P. necessarius* strain ATCC 30859 (sequence obtained in this study), and the sequence of *P. necessarius* STIR1 (Vannini *et al.*, 2005), while probe Omi10-mod is matching the previously published sequence of *P. necessarius* ATCC 30859 (Springer *et al.*, 1996). Probe Omi10-mod was applied with 35% formamid concentration in the hybridization buffer, probe Omi10 with 65%, and probe Poly_862 with 0% formamid (Vannini *et al.*, 2005).

Nucleotide sequence accession numbers

The ribosomal sequences were submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession numbers AM398078–AM398081, AJ550654, AJ550657, AJ550664–AJ550666, AJ550671, AJ550673, AJ964893, AM110078–AM110081, AM110083, AM110086–AM110091, AM110094–AM110097, AM110099–AM110102, AM110104, AM110105, AM110107, AM110109, AM110111–AM110113, AM397064–AM397067.

Acknowledgements

We are grateful to Lauri Arvola and Marko Järvinen for providing samples from Finnish lakes, Karel Šimek and Jan Jezbera for providing samples from two Brazilian habitats and Silke Langenheder for providing samples from Swedish lakes, as well as Jannik Pitt for assistance in sampling of habitats at Corsica. Gabriel Zwart and Paul Bodelier are acknowledged for their contributions in the isolation of a *Polynucleobacter* strain from a Dutch habitat. This study was supported by the bilateral exchange programme between the Austrian Academy of Sciences and the Italian Accademia Nazionale dei Lincei, as well as by the Italian Ministry of University and Research, and the Austrian Science Fund (Project P15655).

References

Aksoy, S. (1995) *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-

- associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 848–851.
- Bahr, M., Hobbie, J.E., and Sogin, M.L. (1996) Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR11 cluster. *Aquat Microb Ecol* **11**: 271–277.
- Distel, D.L., Lane, D.J., Olsen, G.J., Giovannoni, S.J., Pace, B., Pace, N.R., et al. (1988) Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. *J Bacteriol* **170**: 2506–2510.
- Distel, D.L., Lee, H.K., and Cavanaugh, C.M. (1995) Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9598–9602.
- von Dohlen, C.D., Kohler, S., Alsop, S.T., and McManus, W.R. (2001) Mealybug beta-proteobacterial endosymbionts contain gamma-proteobacterial symbionts. *Nature* **412**: 433–436.
- Everett, K.D., Bush, R.M., and Andersen, A.A. (1999) Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 415–440.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**: 368–376.
- Felsenstein, J. (1989) PHYLIP – phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **5**: 164–166.
- Foissner, W., Blatterer, H., Berger, H., and Kohmann, F. (1991) Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems. – Band I: Cytrophorida, Oligotrichida, Hypotrichida, Colpodea. *Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft*, Heft **1/91**: 1–478.
- Foissner, W., Berger, H., and Schaumburg, J. (1999) Identification and ecology of limnetic plankton ciliates. *Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft* **3/99**: 1–793.
- Fritsche, T.R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautom, R.K., Schleifer, K.H., and Wagner, M. (1999) *In situ* detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales. *Appl Environ Microbiol* **65**: 206–212.
- Fujishima, M., and Heckmann, K. (1984) Intra- and interspecific transfer of endosymbionts in *Euplotes*. *J Exp Zool* **230**: 339–345.
- Görtz, H.D. (2002) *Symbiotic Association between Ciliates and Prokaryotes*. *The Prokaryotes*, electronic edition. Release 3.11. URL http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=355&initsec=04_01
- Gray, N.D., Comaskey, D., Miskin, I.P., Pickup, R.W., Suzuki, K., and Head, I.M. (2004) Adaptation of sympatric *Achromatium* spp. to different redox conditions as a mechanism for coexistence of functionally similar sulphur bacteria. *Environ Microbiol* **6**: 669–677.
- Guillard, R.R. (1975) Cultures of phytoplankton for feeding of marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Smith, W.L., and Chanley, M.H. (eds). New York: Plenum, pp. 29–60.
- Hahn, M.W. (2003) Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5248–5254.
- Hahn, M.W., Stadler, P., Wu, Q.L., and Pöckl, M. (2004) The filtration-acclimatization-method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J Microb Meth* **57**: 379–390.
- Hahn, M.W., Pöckl, M., and Wu, Q.L. (2005) Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4539–4547.
- Heckmann, K. (1975) Omikron, ein essentieller Endosymbiont von *Euplotes aediculatus*. *J Protozool* **22**: 97–104.
- Heckmann, K., and Schmidt, H.J. (1987) *Polynucleobacter necessarius* gen. nov., sp. nov., an obligately endosymbiotic bacterium living in the cytoplasm of *Euplotes aediculatus*. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 456–457.
- Heckmann, K., Ten Hagen, R., and Görtz, H.-D. (1983) Freshwater *Euplotes* species with 9 type I cirrus pattern depend upon endosymbionts. *J Protozool* **30**: 284–289.
- Herbeck, J.T., Funk, D.J., Degnan, P.H., and Wernegreen, J.J. (2003) A conservative test of genetic drift in the endosymbiotic bacterium *Buchnera*: slightly deleterious mutations in the chaperonin *groEL*. *Genetics* **165**: 1651–1660.
- Hiorns, W.D., Methé, E.A., Nierzwickbauer, S.A., and Zehr, J.P. (1997) Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2957–2960.
- Horn, M., Fritsche, T.R., Linner, T., Gautom, R.K., Harzenetter, M.D., and Wagner, M. (2002) Obligate bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the beta-Proteobacteria: proposal of '*Candidatus* Procabacter acanthamoebae' gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 599–605.
- Jaspers, E., and Overmann, J. (2004) Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4831–4839.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. *J Mol Evol* **16**: 111–120.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., and Nei, M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244–1245.
- Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., Andreadis, T.G., Magnarelli, L.A., and Mather, T.N. (1996) Tick cell culture isolation of an intracellular prokaryote from the tick *Ixodes scapularis*. *J Invertebr Pathol* **67**: 318–321.
- Lambert, J.D., and Moran, N.A. (1998) Deleterious mutations destabilize ribosomal RNA in endosymbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4458–4462.
- Ludwig, W., Kirchhof, G., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Betzl, D., Ehrmann, M., et al. (1992) Complete 23S ribosomal RNA sequences of Gram-positive bacteria with a low DNA G+C content. *Syst Appl Microbiol* **15**: 487–501.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363–1371.
- Moran, N.A. (2002) Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* **108**: 583–586.

- Moran, N.A., Plague, G., Sandström, J.P., and Wilcox, J.A. (2003) A genomic perspective on nutrient-provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 14543–14548.
- Olsen, G.J., Matsuda, H., Hagstrom, R., and Overbeek, R. (1994) FastDNAmI: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* **10**: 41–48.
- Pedersen, K., Arlinger, J., Ekendahl, S., and Hallbeck, L. (1996) 16S rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to the Aespoe hard rock laboratory Sweden. *FEMS Microbiol Ecol* **19**: 249–262.
- Petroni, G., Dini, F., Verni, F., and Rosati, G. (2002) A molecular approach to the tangled intrageneric relationships underlying phylogeny in *Euplotes* (Ciliophora, Spirotrichea). *Mol Phylogenet Evol* **22**: 118–130.
- Petroni, G., Rosati, G., Vannini, C., Modeo, L., Dini, F., and Verni, F. (2003) *In situ* identification by fluorescently labeled oligonucleotide probes of morphologically similar, closely related ciliate species. *Microb Ecol* **45**: 156–162.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., and Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496–2497.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.
- Sauer, C., Stackebrandt, E., Gadau, J., Hölldobler, B., and Gross, R. (2000) Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus* Blochmannia gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1877–1886.
- Schauer, M., Kamenik, C., and Hahn, M.W. (2005) Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, Saprospiraceae, Bacteroidetes). *Appl Environ Microbiol* **71**: 5900–5907.
- Semenova, E.A., and Kuznedelov, K.D. (1998) A study of the biodiversity of Baikal picoplankton by comparative analysis of 16S rRNA gene 5'-terminal regions. *Mol Biol* **32**: 754–760.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., and Ishikawa, H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* **407**: 81–86.
- Šimek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M.G., Horňák, K., Dolan, J.R., Nedoma, J., *et al.* (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2723–2733.
- Springer, N., Ludwig, W., Amann, R., Schmidt, H.J., Görtz, H.D., and Schleifer, K.H. (1993) Occurrence of fragmented 16S rRNA in an obligate bacterial endosymbiont of *Paramecium caudatum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9892–9895.
- Springer, N., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., and Schmidt, H. (1996) *Polynucleobacter necessarius*, an obligate bacterial endosymbiont of the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*, is a member of the beta-subclass of *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol Lett* **135**: 333–336.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., *et al.* (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**: 790–794.
- Tamas, I., Klasson, L., Canback, B., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Wernegreen, J.J., *et al.* (2002) 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* **296**: 2376–2379.
- Thao, M.L., Gullan, P.J., and Baumann, P. (2002) Secondary (gamma-*Proteobacteria*) endosymbionts infect the primary (beta-*Proteobacteria*) endosymbionts of mealybugs multiple times and coevolve with their hosts. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3190–3197.
- Unterman, B.M., Baumann, P., and McLean, D.L. (1989) Pea aphid symbiont relationships established by analysis of 16S rRNAs. *J Bacteriol* **171**: 2970–2974.
- Van Oevelen, S., De Wachter, R., Vandamme, P., Robbrecht, E., and Prinsen, E. (2004) '*Candidatus* Burkholderia calva' and '*Candidatus* Burkholderia nigropunctata' as leaf gall endosymbionts of African *Psychotria*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2237–2239.
- Vannini, C., Rosati, G., Verni, F., and Petroni, G. (2004) Identification of the bacterial endosymbionts of the marine ciliate *Euplotes magnicirratu*s (Ciliophora, Hypotrichia) and proposal of '*Candidatus* Devosia euplotis'. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1151–1156.
- Vannini, C., Petroni, G., Verni, F., and Rosati, G. (2005) *Polynucleobacter* bacteria in the brackish-water species *Euplotes harpa* (Ciliata, Hypotrichia). *J Eukariot Microbiol* **52**: 116–122.
- Wu, Q.L., and Hahn, M.W. (2006a) Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microb Ecol* **57**: 67–79.
- Wu, Q.L., and Hahn, M.W. (2006b) High predictability of the seasonal dynamics of a species-like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake. *Environ Microbiol* **8**: 1660–1666.
- Zientz, E., Dandekar, T., and Gross, R. (2004) Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 745–770.
- Zwart, G., Crump, B.C., Kamst-van Agterveld, M.P., Hagen, F., and Han, S.K. (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* **28**: 141–155.

Modification of 0+ perch foraging behaviour by indirect cues of predation risk

Wanzenböck J, Mikheev VN, Pasternak AF. Modification of 0+ perch foraging behaviour by indirect cues of predation risk. Ecology of Freshwater Fish 2006: 15: 118–124. © Blackwell Munksgaard, 2006

Abstract – Intake rate and prey size selection of 0+ perch, *Perca fluviatilis*, from Lake Wallersee (Austria) was studied at different illumination (day light: 400 lx, twilight: 2 lx) during 5 days of habituation to novel surroundings in aquaria. The hypothesis was tested that high illumination and novelty of surroundings (transfer from holding to test aquaria) as indirect cues of predation risk influences 0+ perch foraging behaviour. Significantly lower total intake and lower proportion of large *Daphnia magna* (two prey size groups, 2.9 and 1.2 mm, were used) were observed at higher illumination and under novel surroundings. Habituation to novelty caused an increase in consumption of large prey and decrease in consumption of small prey. During the whole period of habituation, more large prey was ingested at twilight than at daylight; no light-induced difference in ingestion of small prey was found. Foraging 0+ perch responded to indirect nonspecific cues of predation risk by reduction of intake of large prey, which are costly in terms of handling time. This allows fish to be more vigilant without ceasing their foraging activity even in potentially dangerous situations. In the lake, young perch are most vulnerable to abundant piscivorous fish and birds during the day; in twilight perch can afford a more time-consuming foraging activity.

**J. Wanzenböck¹, V. N. Mikheev²,
A. F. Pasternak³**

¹Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondsee, Austria, ²A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, ³P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Key words: light intensity; habituation; novel surroundings; prey size selection; intake rate

J. Wanzenböck, Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria; e-mail: josef.wanzenboeck@oeaw.ac.at

Accepted for publication December 20, 2005

Introduction

Foraging by planktivorous fish are subject to a variety of biotic and abiotic factors that modify both intake rate and prey size selectivity (Ivlev 1961; Wright & O'Brien 1984; Lazzaro 1987; Hughes 1997). Predation risk is among the most powerful biotic factors that influence foraging (Cerri & Fraser 1983; Lima & Dill 1990). Risk of being eaten, while foraging may influence uptake rate (Fraser & Huntingford 1986; Fraser & Gilliam 1987) and prey size selection, causing a forager to broaden its diet or even to prefer safer but less profitable prey (Godin 1990; Sih 1993) and/or foraging habitats (Smith 1997). Intake rate, on the one hand, and handling time, on the other, depend to a large extent on prey size (Werner 1974; Stephens

& Krebs 1986; Wanzenböck 1995). Larger prey size correlates with longer handling time (Werner 1974; Scott 1987; Prejs et al. 1990). Consumption of larger prey conflicts more with vigilance and under predator-induced cues is replaced with smaller prey, requiring shorter handling time (Godin 1990).

Because searching for food and handling prey reduce vigilance, young fishes are predominantly susceptible to predation while foraging. So, they have to make a choice balancing feeding and safety requirements. In general, it is less risky and energetically costly to respond to the predator's appearance earlier (preattack) than later in the predation sequence (Endler 1986, 1991). Nevertheless, too cautious foraging behaviour would deprive fish of necessary food. It is assumed that the early recognition of a potentially

hazardous situation is advantageous for a consumer that cannot cease feeding for a long period (like 0+ planktivorous fish) but can choose a less risky way of foraging.

Young-of-the-year (YOY) perch, *Perca fluviatilis*, are common planktivores of temperate lakes that actively move through their habitat searching for more profitable places and considerably change their feeding activity on a diurnal basis. New microhabitats could be both profitable for foraging and potentially dangerous, that causes elevated exploratory activity and vigilance of fish. These energy and time-consuming behaviours are in conflict with foraging. YOY perch is generally described as daylight forager (Ali et al. 1977; MacLean & Magnuson 1977; Bergman 1988), but many visual predators such as piscivorous fish and birds are most active also during the daytime (Manteifel et al. 1965; Hessen et al. 1986; Vollestad et al. 1986; Goldspink 1990; Winfield 1990; Eklöv 1992; Eklöv & Diehl 1994). Therefore, we assumed that high illumination and novelty of surroundings are indirect threatening factors for foraging YOY perch, and we hypothesised that these factors lead to modifications of 0+ perch foraging behaviour in a similar manner as direct stimuli from a predator. While effects of direct cues of predation threat (mainly visual and olfactory stimuli) have received a lot of attention during recent decades (Milinski 1990, 1993), indirect cues possibly connected to predation threat have rarely been studied (Godin 1997).

Specific questions were: (i) How do prey size selection and intake rate of YOY perch change with habituation to a novel experimental situation? (ii) Are prey size selection and intake rate of YOY perch different under day and twilight illumination? (iii) How are habituation-related foraging traits influenced by illumination, i.e., is there any interaction between the two?

Material and methods

Predators and prey

Perch juveniles were obtained from egg strands collected from Lake Wallersee (Austria). A mass culture was kept in flow-through tanks at 20 ± 1 °C and a dark–light regime that imitated the seasonal changes of illumination. The fish were raised on a diet of living brine shrimp nauplii (*Artemia* sp.), lake zooplankton and *Daphnia magna*. Fish used in the experiments had a mean standard length of 31.1 ± 3.0 mm (mean \pm SD) and a mean dry weight of 91.4 ± 26.9 mg. A dense culture of *D. magna* was maintained in plastic basins on a mixture of green algae and yeast. Two prey sizes were produced by sieving; large prey with a mean body length (\pm SD)

of 2.9 ± 0.3 mm and a mean body width of 2.0 ± 0.2 mm, and small prey with a mean body length of 1.2 ± 0.2 mm and a mean body width of 0.7 ± 0.1 mm. Size distributions of the two classes did not overlap, and large and small prey were easy to discriminate visually. Dry weight of *D. magna* was calculated from the regression equation $DW = 8.47 \times L^{2.6}$ (J. Wanzenböck, unpublished data). Thus, large prey had an average body weight of 132.3 μ g; small prey weight was 14.8 μ g. Gape width (GW) of perch juveniles was calculated with the equation $GW = -0.176 + 0.099 SL$, where SL is the standard length in mm (Kurmayer & Wanzenböck 1996) and equalled 2.91 ± 0.30 mm (mean \pm SD).

The relative size (the ratio of prey width to mouth gape of the predator) of large prey (0.7) was slightly higher than optimal (Werner 1974; Kislalioglu & Gibson 1976). Handling of a prey that large takes several times (six times) longer than handling small prey (relative size 0.25). Handling time (HT, s) was calculated according to the equation $HT = 1 + 0.0229 \exp 8.061 PS/MS$, where PS/MS is prey size/mouth size ratio (Werner 1974). It was 7.5 s per large prey and 1.2 s per small one.

Experimental procedures and treatments

Experiments were carried out at the Institute for Limnology, Mondsee, Austria in 2001. They were run in glass aquaria of $30 \times 20 \times 20$ cm filled with 10 l of filtered lake water at 20 ± 1 °C. Thirty fish randomly chosen from the flow-through holding tank were distributed in groups of three among 10 aquaria where they were kept for five successive days of experiments; the same was done with another group of 30 fish 1 day later. Fish were tested in groups of three instead of individually, because fish in groups calmed down and started feeding much earlier, than isolated individuals (our pilot observations). Overhead lighting was provided by two 36-W fluorescent tubes on a 16:8 h light:dark regime. Aquaria were permanently aerated except the short periods of the feeding tests. Fish were fed *D. magna ad libitum* during 1 h every day.

Consumption of large and small prey was estimated in 15-min trials with 100 large and 200 small *Daphnia* per aquarium. Prior to the experimental treatment, fish were prestarved for 20 h. According to our pilot observations, consumption rate of hungry YOY perch was highest during the first 15 min. After 15-min feeding, fish were removed with a hand net and transferred temporarily to another aquarium. The remaining *D. magna* were collected with a sieve of 0.2-mm mesh and counted under a dissecting microscope. Fish were returned into the same aquaria refilled with fresh water. One group of fish was tested

at 400 lx (daylight), another at 2 lx (twilight) measured at the surface of the water. The experiment started 1 day after the fish had been transferred from the holding tank into the experimental aquaria. This trial was repeated on days 3 and 5. All experiments were run between 12.00 and 16.00 hours. Novelty of surroundings that the fish faced upon transfer from the holding tank to the test aquaria included smaller size aquaria without a flow, much lower number of conspecifics around, and regular handling.

Data analysis

The number of consumed prey items was assessed as a difference between introduced prey items and those remaining after a feeding trial. Large and small *D. magna* were counted separately. In trials without fish, no losses, either of large or small prey, caused by manipulations and sieving were found. Original data were tested for normality and homogeneity of variances, and repeated measures two-way ANOVA was applied. Tukey test for *post hoc* multiple comparisons was run.

Results

There was a strong and persistent effect of illumination level on total consumption (Tables 1 and 2) that was significantly higher at 2 lx than at 400 lx. On the whole, total intake increased in the course of habituation to novel surroundings from day 1 to day 5 (Fig. 1, Table 1). However, at high light, there was a significant difference between days 1 and 5, while at the low light level, although the trend persisted, differences were insignificant (Table 2).

Total food intake was primarily related to consumption of large *Daphnia*. They always comprised more than 60% of biomass ingested. A gradual increase in consumption of large *Daphnia* was observed on successive daily feeding trials from days 1 to 5, both at 2 and 400 lx light levels

Table 1. Influence of illumination (high, 400 lx and low, 2 lx) and habituation to novel surroundings (consecutive days 1, 3, 5) on consumption of *Daphnia magna* by perch.

Prey consumed	Source of variation	d.f.	MS	F	P
Large <i>Daphnia</i>	Light level (LL)	1	58,541	14.181	0.001
	Days of experiment (DE)	2	12,943	19.660	<0.001
	LL × DE	2	298	0.452	0.640
Small <i>Daphnia</i>	Light level (LL)	1	11	0.023	0.882
	Days of experiment (DE)	2	3084	22.642	<0.001
	LL × DE	2	226	1.661	0.204
Small + large <i>Daphnia</i>	Light level (LL)	1	56,948	10.157	0.005
	Days of experiment (DE)	2	3442	5.718	0.007
	LL × DE	2	177	0.294	0.747

Results of two-way repeated measures anova.

(Fig. 2, Tables 1 and 2). There was a pronounced effect of illumination level on consumption of large *Daphnia* (Tables 1 and 2) which was always significantly higher at 2 lx than at 400 lx.

Maximum share of small prey (37% of the total intake) was observed on the first day of experiment under high level of illumination (Fig. 2). Later on, in the course of habituation to novel surroundings, it decreased to 9.2% (day 5); at twilight illumination, the share of small prey was always lower and decreased from 30.8% (day 1) to 7.6% (day 5). The illumination level did not influence consumption of small *Daphnia* during the whole period of habituation (Fig. 2, Table 2).

Calculated total time spent handling all prey items (large and small) during the 15-min foraging bout was considerably higher at 2 lx than at 400 lx: 106–112 and 65–78 s, respectively (Table 3). This difference was even more pronounced when only large prey were taken into account: 74–101 s at 2 lx and 36–69 s at 400 lx (Table 3). Illumination level did not influence the time the fish spent handling small *D. magna* (Table 3). With habituation to novel surroundings, perch spent more time on handling large prey, especially in twilight (Table 3).

Discussion

Our study showed that both factors, high illumination level and novelty of surroundings, which can be associated with the risk of predation for foraging 0+ perch, significantly reduce fish intake rate. This reduction was completely caused by decreased consumption of large prey. Consumption of small prey was not affected by the level of illumination, but noticeably decreased with habituation to novel surroundings.

Handling time increases exponentially with relative prey size (ratio of prey width to mouth gape of the predator) (Werner 1974; Kislalioglu & Gibson 1976). The relative size of large prey in our experiments (0.7) was somewhat higher than optimal (0.6) for particulate-feeding fish of the size similar to that we tested (Werner 1974; Scott 1987; Prejs et al. 1990). Small prey (relative size 0.25) was considerably less than that of optimal size. Handling smaller *Daphnia*, 0+ perch spent six times less time than for large prey. Doing this, fish were considerably reducing energy gain, but could be more vigilant at the same time. Although our handling times were calculated using a formula developed for Centrarchids, we believe that they reflect handling times of perch fairly well as the relationship between handling time and prey size–mouth size ratio is comparable across several species of fish and prey (Werner 1974; Scott 1987; Prejs et al. 1990).

Table 2. Influence of light level (LL: high, 400 lx and low, 2 lx) and habituation to novel surroundings (days 1, 3, 5) on consumption of *Daphnia magna* by perch.

Prey consumed	Factor	Level	q	P	
Large <i>Daphnia</i>	Days of experiment within high light	5 vs. 1	6.857	<0.001	
		5 vs. 3	3.300	0.064	
		3 vs. 1	3.558	0.043	
	Days of experiment within low light	5 vs. 1	5.568	0.001	
		5 vs. 3	1.444	0.569	
		3 vs. 1	4.125	0.016	
	LL within day 1	Low vs. high	4.782	0.002	
		LL within day 3	Low vs. high	5.124	0.001
		LL within day 5	Low vs. high	4.006	0.008
Small <i>Daphnia</i>	Days of experiment within high light	5 vs. 1	6.551	<0.001	
		5 vs. 3	4.578	0.007	
		3 vs. 1	1.973	0.354	
	Days of experiment within low light	5 vs. 1	6.893	<0.001	
		5 vs. 3	1.606	0.499	
		3 vs. 1	5.287	0.002	
	LL within day 1	Low vs. high	0.724	0.612	
		LL within day 3	Low vs. high	1.709	0.234
		LL within day 5	Low vs. high	0.474	0.740
Large + small <i>Daphnia</i>	Days of experiment within high light	5 vs. 1	4.055	0.019	
		5 vs. 3	1.273	0.644	
		3 vs. 1	2.782	0.135	
	Days of experiment within low light	5 vs. 1	2.545	0.184	
		5 vs. 3	0.746	0.859	
		3 vs. 1	1.799	0.420	
	LL within day 1	Low vs. high	4.517	0.004	
		LL within day 3	Low vs. high	4.011	0.009
		LL within day 5	Low vs. high	3.740	0.014

Pairwise multiple comparisons (Tukey test).

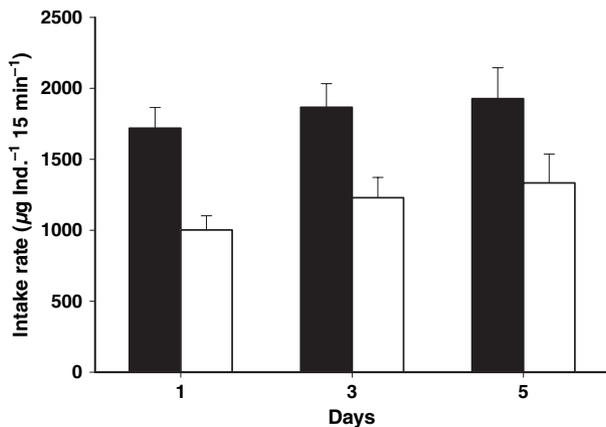


Fig. 1. Influence of illumination, 2 lx (black bars) and 400 lx (open bars) and habituation (consecutive daily trials) on total intake rate of young-of-the-year (YOY) perch. Mean and SE values are shown.

Two aspects of diurnal changes of light intensity influencing foraging behaviour of fish are usually considered as a: (i) physical property limiting fish capacity to detect and discriminate prey (Confer et al. 1978; Mills et al. 1986; Guthrie & Muntz 1993); and (ii) factor signalling diurnal changes in foraging conditions and predation threat (Hall et al. 1979; Clark & Levy 1988). Although it was suggested that reduced light level (from several hundred to 2 lx) impaired the ability of YOY yellow perch (*Perca flavescens*) to find small prey (Mills et al. 1986), no

decrease in consumption of small *Daphnia* at low illumination compared with high illumination was noted in our experiments. Also a change of relative availability of small and large prey with light reduction could not be derived from the data on several planktivorous fish (Confer et al. 1978). Minimum visual threshold for YOY perch was found to be 0.062 lx (Guma'a 1978). It means that there was no physical limitation to detection of small prey. This leaves us with the second aspect, predation threat, as prey density was the same. According to the 'anti-predator window' model (Clark & Levy 1988), planktivorous juvenile sockeye salmon fed most intensively during twilight, avoiding feeding at daylight illumination; this behaviour resulted in lower intake and growth rates, but higher survival.

Like many planktivorous fishes, which are predominantly visual foragers, YOY perch do not feed at night (Ali et al. 1977; Spanovskaya & Grigorash 1977; Guma'a 1978). However, their day feeding is considerably lower than their feeding at dusk and dawn (MacLean & Magnuson 1977; Spanovskaya & Grigorash 1977; Post & McQueen 1988). In the daytime, YOY perch were observed to be rather inactive and form large schools; at dusk, swimming activity increased and they fed most intensively on zooplankton (Wang & Eckmann 1994). Numerous visual piscivorous fish and birds are often active in temperate lakes during daytime (Manteifel et al. 1965; Hessen et al. 1986; Vollestad et al. 1986; Goldspink

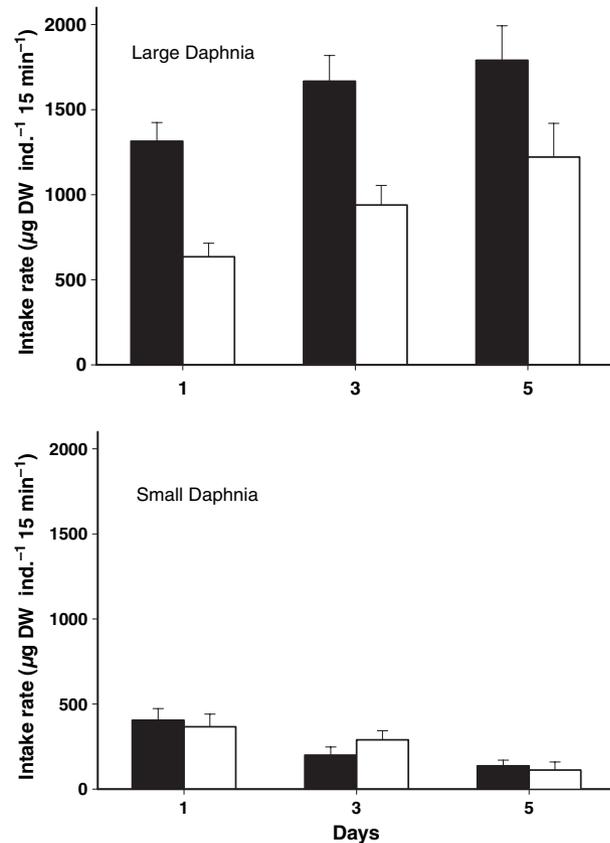


Fig. 2. Changes in intake rate of large (upper panel) and small (lower panel) prey by YOY perch at 2 lx (black bars) and 400 lx (open bars) during habituation to novelty from day 1 to day 5. Mean and SE values are shown.

Table 3. Total time (s) spent by an individual young-of-the-year (YOY) perch handling the prey during the 15 min foraging bouts at two levels of illumination for three consecutive days.

Prey	Days of experiment	2 lx	400 lx
Large <i>Daphnia</i>	1	74 ± 6.2	36 ± 4.5
	3	94 ± 8.5	53 ± 6.5
	5	101 ± 11.4	69 ± 11.1
Small <i>Daphnia</i>	1	32 ± 5.4	29 ± 5.9
	3	16 ± 3.8	23 ± 4.2
	5	11 ± 2.6	9 ± 3.8
Large + small <i>Daphnia</i>	1	106 ± 11.6	65 ± 10.4
	3	110 ± 12.4	76 ± 10.7
	5	112 ± 14.1	78 ± 14.9

Mean values ± SE for 10 replicates are given.

1990; Winfield 1990; Eklöv 1992; Eklöv & Diehl 1994). Thus, an increased risk of predation could cause the decrease in the activity, including foraging, of perch juveniles during the day, and the high level of illumination might be an environmental cue associated with the risk. Fish are able to judge the level of risk and adjust their behaviour accordingly (Dill & Fraser 1984). Feeding in our laboratory experiments was significantly lower at daylight than at twilight,

resembling diurnal changes under natural conditions. Fish are capable of retaining the inherited antipredator behaviour (Seghers 1974; Breden et al. 1987). Behavioural responses to environmental cues associated with predation risk could persist in naïve laboratory-reared fish that have never experienced any predator-induced impacts. High illumination, signalling increased risk, makes fish more vigilant and trade foraging intensity against safety. Time spent handling all prey items (large and small) during the 15-min foraging bout was considerably higher at 2 lx than at 400 lx (Table 3). This difference was even more pronounced when only large prey was taken into account (Table 3). The risk of predation grows exponentially with an increase of time needed for pursuing and capture of larger prey (Dill 1983). This could explain the significant reduction in consumption of large but not small prey in the light. This response to high illumination did not change in the course of the experiment, suggesting that, high illumination is always considered by fish as a sign of a potentially dangerous situation. Another stressing factor, novelty of surroundings, induced a similar behavioural response. With habituation to novel surroundings, perch could afford spending more time on handling large prey, especially in the dark (Table 3), perceiving the situation as more familiar and safe. This means that exploratory behaviour and vigilance could be reduced, and more time could be invested in alternative activities, in this case, foraging.

There could be three explanations for the observed increase in consumption of large and concurrent decrease of small *Daphnia* during the series of daily trials. First, fish grew during the experiments, increasing weight, gape width, food demands and ability to process large prey. Second, fish could learn how to improve the handling process, i.e., shorten handling time for a given prey (Croy & Hughes 1990; Hughes et al. 1992). Third, habituation to novel surroundings could make vigilance and exploration tasks easier, thus allowing foraging upon larger, more risky, prey.

Body weight and gape width of perch could have increased during the course of the experiment by a factor of 1.14 and 1.04, respectively, as was calculated using the data on growth of 0+ perch of similar size (Mehner et al. 1998). However, increase in total intake and the share of large *Daphnia* was much higher (1.33 and 1.46, respectively). Thus, most of the observed changes could not be attributed to fish growth. It is hardly possible that perch in our experiments improved handling skills like naïve fifteen-spine sticklebacks fed with amphipods (Croy & Hughes 1990), because the perch were preadapted to *Daphnia* of various sizes for more than a week prior to the tests. The third hypothesis, emphasising a trade-off between foraging and other activities, seems more plausible.

The main novel finding of this study is that not only direct predator induced cues (visual, olfactory, hydro-mechanical), but also indirect cues, associated with potentially dangerous situations, can modify prey size selectivity and intake rate in juvenile fish. The adaptive significance of this response implies that, losing immediate energy profit by switching to smaller prey, fish can afford more vigilance, gaining in safety and survival. Similarly to antipredator responses to direct threat of predation (Seghers 1974; Breden et al. 1987; Magurran 1993), responses to nonspecific factors could be flexible and depend on the predation pressure previously experienced by a population. Perch juveniles originating from waters with low abundance of visual predators could be expected to be less cautious, actively feeding on large prey at daylight.

Acknowledgements

This study was supported by the Austrian Academy of Sciences (exchange programme with the Russian Academy of Sciences), the Russian Foundation for Basic Research (projects 02-04-48480 and 03-04-20010 to V. Mikheev and 01-04-48701 and 04-04-48128 to A. Pasternak) and the Austrian Academic Exchange Service (projects I.22/2001 and I.28/04). The help of Phil Hickley in shaping the English style of this paper is greatly acknowledged.

References

Ali, M.A., Ryder, R.A. & Ancil, M. 1977. Photoreceptors and visual pigments as related to behavioral responses and preferred habitats of perches (*Perca* spp.) and pikeperches (*Stizostedion* spp.). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34: 1475–1480.

Bergman, E. 1988. Foraging abilities and niche breadths of two percids, *Perca fluviatilis* and *Gymnocephalus cernua*, under different environmental conditions. *Journal of Animal Ecology* 57: 443–453.

Breden, F., Scott, M. & Michel, E. 1987. Genetic differentiation for anti-predator behaviour in the Trinidad guppy, *Poecilia reticulata*. *Animal Behaviour* 35: 618–620.

Cerri, R.D. & Fraser, D.F. 1983. Predation and risk in foraging minnows: balancing conflicting demands. *American Naturalist* 121: 552–561.

Clark, C.W. & Levy, D.A. 1988. Diel vertical migrations by juvenile sockeye salmon and the antipredator window. *American Naturalist* 131: 271–290.

Confer, J.L., Howick, G.L., Corzette, M.H., Kramer, S.L., Fitzgibbon, S. & Landesberg, R. 1978. Visual predation by planktivores. *Oikos* 31: 27–37.

Croy, M.I. & Hughes, R.N. 1990. The influence of hunger on feeding behaviour and on the acquisition of learned foraging skills by the fifteen-spined stickleback, *Spinachia spinachia* L. *Animal Behaviour* 41: 161–170.

Dill, L.M. 1983. Adaptive flexibility in the foraging behavior of fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40: 398–408.

Dill, L.M. & Fraser, A.H.G. 1984. Risk of predation and the feeding behavior of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Behavioural Ecology and Sociobiology* 16: 65–71.

Eklöv, P. 1992. Group foraging versus solitary foraging efficiency in piscivorous predators: the perch, *Perca fluviatilis*, and pike, *Esox lucius*, patterns. *Animal Behaviour* 44: 313–326.

Eklöv, P. & Diehl, S. 1994. Piscivore efficiency and refuging prey: the importance of predator search mode. *Oecologia* 98: 344–353.

Endler, J.A. 1986. Defense against predators. In: Feder, M.E. & Lauder, G.V., eds. *Predator-prey relationships*. Chicago, IL: University of Chicago Press, pp. 109–134.

Endler, J.A. 1991. Interactions between predators and prey. In: Krebs, J.R. & Davies, N.B., eds. *Behavioural ecology: an evolutionary approach*, 3rd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp. 169–196.

Fraser, D.F. & Gilliam, J.F. 1987. Feeding under predation hazard: response of the guppy and Hart's rivulus from sites with contrasting predation hazard. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 21: 203–209.

Fraser, D.F. & Huntingford, F.A. 1986. Feeding and avoiding predation hazard: the behavioral response of the prey. *Ethology* 73: 56–68.

Godin, J.G.J. 1990. Diet selection under the risk of predation. In: Hughes, R.N., ed. *Behavioural mechanisms of food selection*. NATO ASI Series v. G20. Berlin: Springer-Verlag, pp. 797–819.

Godin, J.G.J. (ed.) 1997. *Behavioural ecology of teleost fishes*. Oxford: Oxford University Press, 384 pp.

Goldspink, C.R. 1990. The distribution and abundance of young (I+–II+) perch, *Perca fluviatilis* L., in a deep eutrophic lake, England. *Journal of Fish Biology* 36: 439–447.

Guma'a, S.A. 1978. The food and feeding habits of young perch, *Perca fluviatilis*, in Windermere. *Freshwater Biology* 8: 177–187.

Guthrie, D.M. & Muntz, W.R.A. 1993. Role of vision in fish behaviour. In: Pitcher, J., ed. *The behaviour of teleost fishes*, 2nd edn. London: Chapman & Hall, pp. 89–128.

Hall, D.J., Werner, E.E., Gilliam, J.F., Mittelbach, G.G., Howard, D. & Doner, C.G. 1979. Diel foraging behaviour and prey selection in the golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36: 1029–1039.

Hessen, D.O., Skurdal, J., Vollestad, L.A. & Berge, D. 1986. Habitat use among size groups of monomorphic whitefish *Coregonus lavaretus*. *Hydrobiologia* 137: 185–192.

Hughes, R.N. 1997. Diet selection. In: Godin, J.-G.J., ed. *Behavioural ecology of teleost fishes*. Oxford: Oxford University Press, pp. 135–162.

Hughes, R.N., Kaiser, M.J., Mackney, P.A. & Warburton, K. 1992. Optimizing foraging behaviour through learning. *Journal of Fish Biology* 41 (Suppl. B): 77–91.

Ivlev, V.S. 1961. *Experimental ecology of the feeding of fishes*. New Haven, CT: Yale University Press.

Kislalioglu, M. & Gibson, R.N. 1976. Prey 'handling time' and its importance in food selection by the 15-spined stickleback, *Spinachia spinachia* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 25: 115–158.

- Kurmayer, R. & Wanzenböck, J. 1996. Top-down effects of underyearling fish on a phytoplankton community. *Freshwater Biology* 36: 599–609.
- Lazzaro, X. 1987. A review of planktivorous fishes: their evolution, feeding behaviours, selectivities, and impacts. *Hydrobiologia* 146: 97–167.
- Lima, S.L. & Dill, L.M. 1990. Behavioural decisions made under risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68: 619–640.
- MacLean, J.H. & Magnuson, J.J. 1977. Inferences on species interactions in percid communities. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34: 1941–1951.
- Magurran, A.E. 1993. Individual differences and alternative behaviours. In: Pitcher, T.J., ed. *The behaviour of teleost fishes*, 2nd edn. London: Chapman & Hall, pp. 441–477.
- Manteifel, B.P., Girska, I.I., Leshcheva, T.S. & Pavlov, D.S. 1965. Diel rhythms in feeding and swimming activity of some freshwater piscivorous fishes. In: Manteifel, B.P., ed. *Pitanie khishchnykh ryb (Feeding of piscivorous fishes)*. Moscow: Nauka.
- Mehner, T., Plewa, M., Hülsmann, S. & Worischka, S. 1998. Gape-size dependent feeding of age-0 perch (*Perca fluviatilis*) and age-0 zander (*Stizostedion lucioperca*) on *Daphnia galeata*. *Archiv für Hydrobiologie* 142: 191–207.
- Milinski, M. 1990. Information overload and food selection. In: Hughes, R.N., ed. *Behavioural mechanisms of food selection*. NATO ASI Series v. G20. Berlin: Springer-Verlag, pp. 721–737.
- Milinski, M. 1993. Predation risk and feeding behaviour. In: Pitcher, T.J., ed. *The behaviour of teleost fishes*, 2nd edn. London: Chapman & Hall, pp. 285–305.
- Mills, E.L., Confer, J.L. & Kretchmer, D.W. 1986. Zooplankton selection by young yellow perch: the influence of light, prey density, and predator size. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 716–725.
- Post, J.R. & McQueen, D.J. 1988. Ontogenetic changes in the distribution of larval and juvenile yellow perch (*Perca flavescens*): a response to prey or predators? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 1820–1826.
- Prejs, A., Lewandowski, K. & Stanczykowska-Piotrowska, A. 1990. Size-selective predation by roach (*Rutilus rutilus*) on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): field studies. *Oecologia* 83: 378–384.
- Scott, A. 1987. Prey selection by juvenile cyprinids from running water. *Freshwater Biology* 17: 129–142.
- Seghers, B.H. 1974. Schooling behavior in the guppy (*Poecilia reticulata*): an evolutionary response to predation. *Evolution* 28: 486–489.
- Sih, A. 1993. Effects of ecological interactions on forager diets: competition, predation risk, parasitism and prey behaviour. In: Hughes, R.N., ed. *Diet selection: an interdisciplinary approach to foraging behaviour*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp. 182–211.
- Smith, R.J.F. 1997. Avoiding and deterring predators. In: Godin, J.G.J., ed. *Behavioural ecology of teleost fishes*. Oxford: Oxford University Press, pp. 163–190.
- Spanovskaya, V.D. & Grigorash, V.A. 1977. Development and food of age 0 Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) in reservoirs near Moscow, USSR. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34: 1551–1558.
- Stephens, D.W. & Krebs, J.R. 1986. *Foraging theory*. Princeton, NJ: Princeton University Press, 247 pp.
- Vollestad, L.A., Scurdal, J. & Qvenild, T. 1986. Habitat use, growth and feeding of pike (*Esox lucius* L.) in four Norwegian lakes. *Archiv für Hydrobiologie* 108: 107–117.
- Wang, N. & Eckmann, R. 1994. Distribution of perch (*Perca fluviatilis* L.) during their first year of life in Lake Constance. *Hydrobiologia* 277: 135–143.
- Wanzenböck, J. 1995. Changing handling times during feeding and consequences for prey size selection of 0+ zooplanktivorous fish. *Oecologia* 104: 372–378.
- Werner, E.E. 1974. The fish size, prey size, handling time relation in several sunfishes and some implications. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 31: 1531–1536.
- Winfield, I.J. 1990. Predation pressure from above: observations on the activities of piscivorous birds at a shallow eutrophic lake. *Hydrobiologia* 191: 223–231.
- Wright, D.I. & O'Brien, W.J. 1984. The development and field test of a tactical model of the planktivorous feeding white crappie (*Pomoxis annularis*). *Ecological Monographs* 54: 65–98.

POLISH JOURNAL OF ECOLOGY (Pol. J. Ecol.)	54	4	633–652	2006
--	----	---	---------	------

State-of-the-art review

Thomas WEISSE

Institute for Limnology of the Austrian Academy of Sciences, Mondseestr. 9, A-5310 Mondsee, Austria,
e-mail: thomas.weisse@oeaw.ac.at

BIODIVERSITY OF FRESHWATER MICROORGANISMS – ACHIEVEMENTS, PROBLEMS, AND PERSPECTIVES

ABSTRACT: The extent and significance of the diversity of freshwater microbes is at present controversially debated. Until 1980 it was assumed that there are no freshwater-specific bacteria and that the total number of bacterial species is low. The advent of molecular tools over the last ten years revealed that there is a bacterial freshwater assemblage which is phylogenetically different from soil and marine bacteria; secondly, it became obvious that the total number of cultured bacterial species (~5900) underestimates bacterial diversity by several orders of magnitude. The current debate centres on 1) how to define a bacterial species and 2) if there is a microbial biogeography. The latter relates to the issue of ubiquity and cosmopolitanism, which is controversially discussed primarily in relation to eukaryotic microorganisms, namely ciliates. Although solid evidence is scarce, many microbial ecologists assume, in accordance with Baas Becking's famous 70-year old dictum – “*everything is everywhere, the environment selects*” – that freshwater microorganisms are easily dispersed and, therefore, potentially cosmopolitan. This review focuses on the often neglected second part of Baas Becking's metaphor. Evidence is accumulating rapidly that the environment does not simply act as a filter *sensu* Gleason's individualistic concept for widely dispersed microbes. Rather, prokaryotic and eukaryotic microorganisms have adapted to their specific habitat and perform better in this environment than newly invading congeners. There

is an enormous ecophysiological diversity among closely related freshwater microbes which is neither obvious at the morphospecies level nor at the level of evolutionarily conserved genes, such as the small ribosomal RNA gene. Although this large diversity has been demonstrated for various groups of bacteria and protists, there is currently no measure available to compare microbial biodiversity across prokaryotic and eukaryotic domains. The current challenge is to link genetic divergence to ecophysiological diversity in the major taxa.

KEY WORDS: microbial diversity, freshwater, species problem, future perspectives

1. INTRODUCTION

There is no doubt that the main diversity of life is microbial; microorganisms, here defined as prokaryotes and eukaryotes invisible with the unaided eye (~ <1 mm), are found in each of the three domains of life (Fig. 1) and in nearly every major phylum. In particular, aquatic microbes are taxonomically diverse, highly abundant and they are present virtually everywhere. Yet, in spite of their significance for all biogeochemical processes, the biodiversity of microbes is little understood, relative to that of plants and animals. Microorganisms have been overlooked

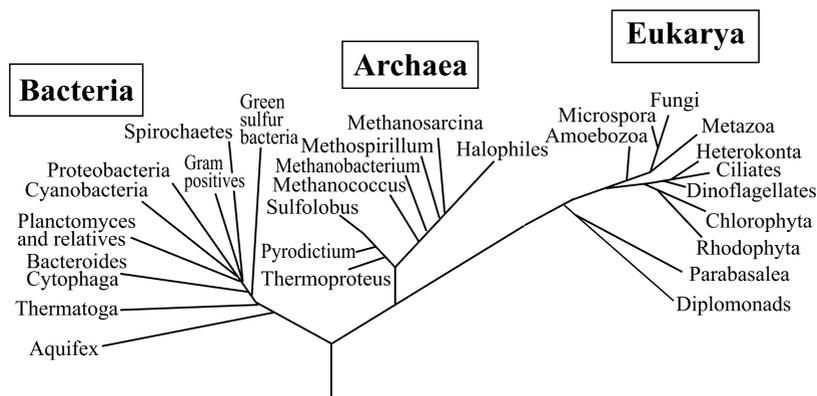


Fig. 1. The phylogenetic “tree of life” with the three domains Eubacteria, Archaea and Eukarya. For the sake of clarity not all organisms are shown from which sequence data are available.

in traditional ecological studies, owing to a lack of adequate methods to quantify and characterize free-living bacteria and minute eukaryotes. Their small size, the absence of diagnostic phenotypic characters, and the fact that many microorganisms are difficult to isolate and to rear in culture have limited the evaluation of their biodiversity (Dorigo *et al.* 2005). The advent of novel techniques such as direct counting by epifluorescence microscopy, image analysis, electron microscopy, flow cytometry, the development of protocols to measure growth, grazing loss and production rates and, most recently, molecular tools to identify as yet unculturable organisms, has revolutionized the field of microbial ecology during the past three decades (reviewed by Weisse 2003, Dorigo *et al.* 2005). The quantitative significance of aquatic microbes in pelagic food webs was detected in the 1970s and 1980s (Pomeroy 1974, Williams 1981, Azam *et al.* 1983, Porter *et al.* 1988). Since then, many case studies measured the magnitude and fate of bacterial and protist production. In recent years, the attention shifted from measuring bulk parameters such as, e. g. total bacterial abundance and production, towards addressing specific issues such as the response of a given bacterial or algal strain or community to a particular grazer (e.g. Šimek *et al.* 2002, Boenigk *et al.* 2004, Wu *et al.* 2004). Similarly, the impact of key environmental parameters, such as temperature or substrate supply (food), has been investigated at the

species or strain level (Weisse and Montagnes 1998, Dini and Nyberg 1999, Weisse *et al.* 2001, 2002, Hahn and Pöckl 2005). Bacteria and small eukaryotes have been used as model organisms to address questions of general ecological relevance. Recent examples are the investigation of the speed of evolutionary adaptation in bacteria (Mongold *et al.* 1996, Cooper *et al.* 2001, Collins and Bell 2004), the adaptation of inducible defenses in ciliates (Kusch 1995), and the demonstration of chaotic patterns in a microbial food web with two bacterial prey and one ciliate predator species (Becks *et al.* 2005).

It is now clear that considering functional guilds, e.g. heterotrophic bacteria or algivorous protist, may be a valid approach for ecosystem models to quantify major metabolic pathways but is inadequate to portray the biodiversity of aquatic microbes. Further insight into the biodiversity of (aquatic) microbes is, at present, hampered by a lack of adequate conceptual models. Fundamental issues such as the identity and number of microbial species are still controversially debated (see next section). Current estimates of the number of bacterial species differ by several orders of magnitude (Table 1). It appears safe to conclude that <10%, perhaps <1%, of prokaryote diversity has been identified convincingly. Similarly, there is an ongoing debate as to whether the “true” number of ciliate species is close to 3000 or 30 000 species (Finlay *et al.* 1996, 1998, Finlay and

Table 1. Current estimates of total bacterial species numbers.

Total number of species	Based upon	Source and remarks
5900	Approved List of Bacterial Names, according to the International Code of Nomenclature of Bacteria and publication in the International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB) / International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)	http://www3.dsmz.de/bactnom/bactname.htm updated every 2 months
$10^6 - 10^7$	Assuming that between 0.1 to 1% of all bacteria have been cultured so far	This study
$10^5 - 10^7$	PCR community fingerprinting, DNA reassociation methods	Torsvik <i>et al.</i> (2002)
$10^9 - 10^{12}$	Estimated and extrapolated from bacterial DNA diversity in a soil sample of 30 g	Dykhuisen (1998); a highly theoretical approach, based upon crude assumptions

Fenchel 1999, Foissner 1999, Foissner *et al.* 2002). This debate is ultimately linked to the issue of microbial biogeography, discussed further below.

This paper summarizes the state of the art of aquatic microbial biodiversity, with emphasis on freshwater ecosystems. Since it is impossible to address comprehensively all levels of biodiversity, ranging from molecules to ecosystems, I will concentrate this overview on populations and species. This is not an exhaustive review; it cannot be when further case studies are being published every week. Rather, the goal is, by identifying current methodical and conceptual shortcomings, to give some perspectives for future research.

2. THE SPECIES PROBLEM

Evolutionary biologists are confronted with a colossal dilemma: almost 150 years after the publication of Darwin's classic on *The Origin of Species* (1859), it is not clear what a species is. There are over 20 competing species concepts available in the literature (see Mayden 1997 for a short review of contemporary species concepts), which can be grouped into 5 or 6 major categories (King 1993, Claridge *et al.* 1997, Roselló-Mora and Amann 2001, Ogunseitán 2005). Even worse, biologists do not agree if a species is a taxonomic category only, i.e. an abstract concept, or an evolutionary unit ("real" species, see Claridge

et al. 1997, Bachmann 1998, Hey 2001). This "most basic of biological problems" (King 1993) has been largely ignored in many biological disciplines, partly for practical purposes, and partly because many biologists dealt with sexually reproducing organisms with clear species boundaries according to the Biological Species Concept (BSC, Mayr 1942, 1963). For historic, ethnic and economic reasons, vertebrates have received considerably more attention than invertebrates in general, and microorganisms in particular, in major biological disciplines such as physiology, ecology and conservation biology. In retrospect, it appears fair to conclude that this anthropocentric point of view has hampered the search for a universal species concept.

The BSC became a widely accepted species concept because it has a solid theoretical foundation, it can be applied with ease, and, last but not least, its long-standing and authoritative promotion by its major advocate, Ernst Mayr (1904-2005). Even as a centenarian, he continued to write articles and books on major evolutionary issues (Mayr 2004). The BSC was attacked on many occasions and for various reasons, for instance, its difficulty in allowing for the extent of reproductive isolation in (hybrid) species (Simpson 1961) and its failure to explain convincingly the process of speciation. A curious corollary of the BSC is that no species could have existed for at least half the time that there has been life on Earth, be-

cause sexual reproduction evolved late in the evolution (Hull 1997). For botanists and microbiologists, the BSC is of little significance because it cannot be applied to asexually reproducing taxa, such as bacteria, many plants and many protists. There is, however, no alternative species concept available that defines bacterial and protist species across their respective realms convincingly. The morphospecies concept favoured by taxonomists has no solid theoretical foundation, whereas some highly theoretical evolutionary species concepts are not operational. The novel RNA and DNA sequence-based approaches to identifying microbial taxa do not solve the problem, since species circumscription uses empirically derived, arbitrary categories (Rosselló-Mora and Amann 2001, Stackebrandt *et al.* 2002). According to the International Committee on Systematic Bacteriology (Wayne *et al.* 1987, Stackebrandt *et al.* 2002), a bacterial species consists of a group of organisms with a DNA – DNA hybridization rate of $\geq 70\%$ and a thermal denaturation midpoint (ΔT_m) of $\leq 5^\circ\text{C}$; the latter refers to a denaturation kinetic curve of a double-stranded DNA and denotes the temperature at which 50% of the DNA strands are denatured. The total DNA similarity of $\geq 70\%$ and the (ΔT_m) of $\leq 5^\circ\text{C}$ correspond to a sequence similarity of the 16S rRNA of $\geq 97\%$ (Stackebrandt and Goebel 1994, Rosselló-Mora and Amann 2001), but this is a continuum with broad boundaries. Recent studies demonstrated that bacterial freshwater strains with identical 16S rRNA genes may have highly divergent genomes and ecophysiologicals (Jaspers and Overmann 2004, Hahn and Pöckl 2005). Even if most homologous genes show extremely low sequence divergence, gene content can vary enormously, resulting from horizontal gene transfer (Gogarten and Townsend 2005). Accordingly, the boundaries between bacterial species may be fuzzy. This uncertainty in the species circumscription led Rosselló-Mora and Amann (2001), in their formulation of the phylogenetic species concept, postulate that a bacterial species is a “genomically coherent cluster of individual organisms that show a high degree of overall similarity in many independent characteristics”.

It has been suggested for bacteria that biological diversity is not represented by nominal species but by ecotypes, the latter being defined as populations of organisms occupying the same ecological niche (Cohan 2001, 2002). It is, however, impossible to prove or disprove that two species share the same ecological niche, i.e. the niche is an useful ecological concept but not a (falsifiable) scientific hypothesis (Rigler and Peters 1995). Further, we are at present far from defining operationally complex microbial niches (Ogunseitan 2005). The term “ecotype” was first coined as a subspecific category for sexual plants (Turesson 1922) but, since then, it has been applied, *inter alia*, to many asexually reproducing plants and protists. Ecotypes are not only ecologically distinct populations but they are also genetically divergent clusters. Each ecotype has acquired predominantly neutral mutations, some of which may have been adaptive in a particular habitat. Evolutionary adaptation (microevolution), i.e. small-scale changes in gene frequencies in an isolated population over relatively few generations, becomes obvious by a changed phenotype (in terms of its morphology, physiology or behaviour). An experimental investigation of evolutionary adaptation is notoriously protracted and has thus been achieved only for some fast growing microorganisms (see Lenski 2004 and Rainey 2004 for short reviews, Collins and Bell 2004).

An analogous approach to the ecotype (Cohan 2001, 2002) or to the operational taxonomic unit (OTU, Green *et al.* 2004, Crump and Hobbie 2005) concept of microbiologists is taken for (sexually reproducing) macroorganisms in conservation biology, where biodiversity for many diverse taxa such as, e.g. Pacific salmon (Waples 1991) or Borneo’s elephants (Fernando *et al.* 2003) is no longer measured in terms of (biological) species numbers but in terms of Evolutionary Significant Units (ESU; Ryder 1986). An ESU is defined pragmatically as a group of organisms that has undergone significant genetic divergence from other groups of the same species. Conservation biologists became aware that classical taxonomic species boundaries only describe a limited part of biodiversity, so conservation efforts that

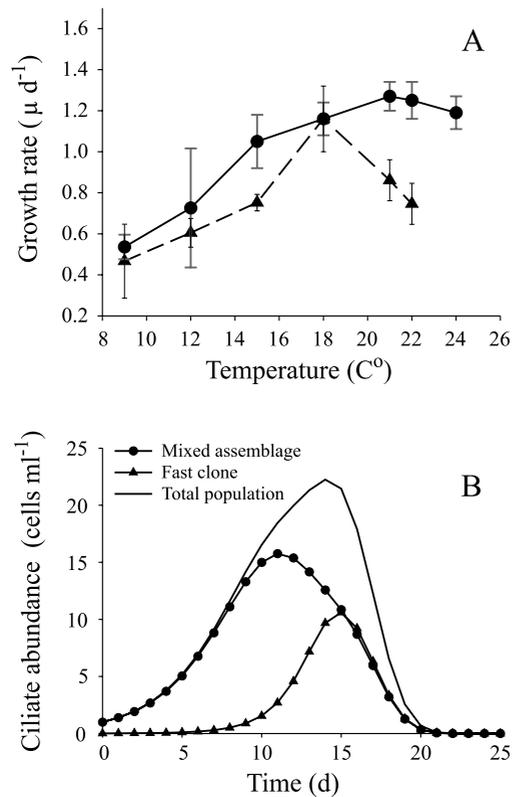


Fig. 2. Intraspecific differences in population growth rate of the planktonic freshwater ciliate *R. limnocola* (Foissner, Skogstad and Pratt) Petz and Foissner (Oligotrichida) and their potential ecological significance. Panel A shows temperature dependent growth rates (mean values and standard deviations) of two clones of *R. limnocola* measured in the laboratory; the clones were isolated in parallel from mesotrophic, subalpine Lake Mondsee (Austria) during early summer. Panel B shows the population dynamics of a hypothetical, non-clonal ciliate population (mixed assemblage, initial growth rate $\mu = 0.39 \text{ d}^{-1}$), a fast growing clone ($\mu = 0.43 \text{ d}^{-1}$), and the combined total ciliate population during model simulations over 25 d (modified after Weisse and Rammer 2006). Ciliate growth rate was related to temperature according to an empirically derived equation, and temperature was assumed to increase linearly from 6.8 to 13 °C over the study period. The population dynamics was modelled according to $N_t = N_0 * e^{(\mu-g)t}$, where N_0 and N_t are initial cell numbers and cell numbers at time t ; the coefficient g denotes a loss term (grazing), which was initially low (0.06 d^{-1}) and then increased at a rate of 25% per day. The model illustrates that a fast growing clone, dividing at a rate 10% higher than the average cells in the population, which initially represented only 1% of the total cell numbers, contributed 50% to the total population after 15 days (see Weisse and Rammer 2006 for further details).

are restricted to this level may lead to a loss of evolutionary relevant variation present at the intraspecific level (Gosling 1999).

As with the bacteria, morphospecies designations of protists are equated with a 1 to 2% rDNA divergence (Jerome *et al.* 1996, Snoeyenbos-West *et al.* 2002, Katz *et al.* 2005). It is, however, well known following the pioneering work of Sonneborn on *Paramecium* (Sonneborn 1937, 1957) that morphologically indiscernible ciliates may harbour several cryptic species, with clearly differing physiologies and behaviours (consult Schlegel and Meisterfeld 2003 for a recent review on the species problem in protozoa). As already noted by Dini and Nyberg (Dini and Nyberg 1993), extensive intraspecific variation is a fact in ciliates and other protists (Weisse and Montagnes 1998, Kim *et al.* 2004, Lowe *et al.* 2005, Weisse and Lettner 2002). Figure 2 shows an example from a recent laboratory study and illustrates the ecological significance of seemingly minor differences in growth rates of freshwater ciliates (Weisse and Rammer 2006). It is, however, at present impossible to link the genotypic variation observed within nuclear ribosomal RNA or protein-coding genes to phenotypic divergence measured in complex ecophysiological processes, such as growth or feeding rates. The extent of genotypic and phenotypic clonal variation among common aquatic protists, and the widths and boundaries of their respective ecological niches, need to be better characterized. Protists that are indiscernible not just at the conservative 18S rRNA level, but which are identical in their non-coding ribosomal internally transcribed spacers (ITS), may nevertheless differ by up to 10% in their more variable genes, such as the mitochondrial cytochrome c oxidase I (Barth *et al.* 2006).

According to the foregoing considerations, the Cohesion Species Concept (Templeton 1989), the Phylogenetic Species Concept (Cra craft 1983) and the Ecological Species Concept (Van Valen 1976) appear more appropriate than the morphospecies concept to reveal "true" microbial diversity. The current challenge is to determine which level of a (sub)cluster, if any, corresponds to ecotypes (Palys *et al.* 1997, Cohan 2002) and, specifically for protists, to discover if

there is any correspondence between DNA sequence clusters, ecotypes and (morphologically defined) biological species (Dini and Nyberg 1999, Foissner *et al.* 2001, Finlay 2004, Boenigk *et al.* 2005). In a more general context, the priority is to understand the interplay of molecular mechanisms with organismic and ecosystem biology (Jackson *et al.* 2002).

While there is now a close overall agreement between conventional and molecular taxonomy and phylogeny (Schlegel and Meisterfeld 2003, Lynn 2003), some notable discrepancies between morphological and molecular characterization have also been observed among several groups of free-living protozoa (e.g. Walochnik *et al.* 2002, Foissner *et al.* 2003, Katz *et al.* 2005). In some cases, the morphological and ultrastructural evidence cannot be reconciled with the phylogeny suggested by the evolution of the small ribosomal subunit (SSU rRNA) gene, and, at the present state of knowledge, the latter may also disagree with the phylogeny derived from the more variable protein nucleotide sequences, such as α -tubulin (Agatha 2004 and references therein). The disagreement between morphological and molecular evidence may, however, also reflect phenotypic plasticity, since an organism's phenotype is not fixed but is, within species-specific limits, dependent on the environment experienced during ontogeny (Huey and Berrigan 1996, Finlay 2004). Acclimation or acclimatisation to specific environmental conditions are more or less reversible, physiological examples of phenotypic plasticity (Huey and Berrigan 1996). The extent of phenotypic plasticity, i.e. the variability of a phenotype in response to environmental change, is also an irreversible genetic trait and may vary largely among different taxa. The true level of genetic divergence of protist ecotypes should become apparent when more protein-coding gene sequence data are available for various protist taxa.

The implications of the current uncertainty in defining species and ecotypes for estimating microbial biodiversity are obvious. A comprehensive understanding of the "true" diversity of extant microorganisms has not yet been achieved (Leander and Keeling

2003, Curtis and Sloan 2004) and quantification of the microbial diversity may even be futile (Wilson 1992). The relative significance of phenotypic plasticity and microevolution remain at present virtually unknown for bacteria and protists. All these issues are focal to the answers to three basic questions about aquatic microorganisms: "what is a species?", "how many species are there?" and "is microbial diversity fundamentally different from that of macroscopic organisms?" (Finlay and Fenchel 1999, Finlay *et al.* 2004). These questions have been raised for protists, as the outcome of an international meeting. In a more general context, we can ask with Curtis and Sloan (2004) "how can one measure microbial diversity and what does microbial diversity mean?"

3. SCALING – CATEGORIES OF BIODIVERSITY

The implications of the nature of the species concept are controversially discussed mainly among researchers working with eukaryote microorganisms. In contrast, prokaryote taxonomists agree that the current polyphasic species circumscription is acceptable and pragmatic, and covers the primary goal of taxonomy such as rapid and reliable identification of novel strains (Stackebrandt and Goebel 1994, Rosselló-Mora and Amann 2001, Stackebrandt *et al.* 2002). Irrespective of the current uncertainty some authors conclude that the low species number of protists is a fact and that the protist diversity is fundamentally different from that of macroscopic organisms, resulting from their seeming global distribution and ubiquity (Finlay and Fenchel 1999, Finlay 2002, 2004). This claim builds upon the old, so-called Baas-Becking hypothesis, "everything is everywhere - the environment selects". The Dutch school of microbiologists, headed by Martinus Beijerinck and his successor Baas-Becking in Delft, believed that microorganisms would be globally dispersed and thrive, wherever a suitable habits exists (see Quispel 1998 for a short review of Baas-Becking's key publications that were published in the 1930s in Dutch, and Whitfield 2005 for a short summary of the "everything is everywhere" view).

Microbial diversity in any environment is not fixed but is a dynamic process of constant change. The species problem is therefore related to the mode of speciation (Mayr 1942). In the case of interbreeding populations, reproductive isolation is the sole criterion for the reality of species (Mayden 1997), leading to allopatric speciation. In contrast to sexually reproducing species, genetic exchange is not acting as a force of cohesion in asexual ecotypes (Cohan 2002). The force of cohesion that maintains the genetic identity of an ecotype is periodic natural selection, which can purge most or all genetic diversity from an asexual population (Atwood *et al.* 1951). Finlay and Fenchel (see references above) assume that, because the gene pool of each population is being swamped by new immigrants, local adaptation to specific habitats and allopatric speciation are of minor significance among free-living protists. Gene flow changes allele frequencies in a direction opposite to natural selection, that is, if the migration rate is large compared to selection, local adaptation is lost (Lenormand 2002, Padisák 2003). On the other hand, local diversity depends on the size of the reservoir community (metapopulation) from which new immigrants originate; if this is large, “chance alone will prevent physically identical communities from having the same, or sometimes even stable, communities” (Curtis and Sloan 2004). Note that immigration will be successful only if, among the flow of immigrants, there are some cells better adapted to the specific local environment than those already present. This is an important, implicit assumption of the “everything is everywhere” dictum.

There is evidence emerging that allopatric speciation should not be discouraged for microbes (Papke and Ward 2004). In particular, populations of “species” with cosmopolitan distributions may be sufficiently isolated to allow genetic divergence (Dini and Nyberg 1993, Foissner *et al.* 2001, Kurmayer *et al.* 2004), thus promoting allopatric speciation. There are also indications for sympatric speciation among aquatic protists despite a high dispersal potential (Darling *et al.* 2000 and references therein, Beszteri *et al.* 2005). Sympatric speciation leads to the origin of new species from a local popula-

tion by colonizing different ecological niches within the same geographical zone; this is followed by prevention of gene flow due to intrinsic factors. Although this pattern of speciation is generally believed to play a minor role for species radiation (Mayr 1942, Ogunseitan 2005), sympatric speciation is a likely outcome of competition for resources (Dieckmann and Doebeli 1999). The intermediate case between allopatric and sympatric speciation, with limited migration/dispersal between divergent (sub-) populations, is known as parapatric speciation and may be the most general mode of speciation (Gavrilets 2003). It is clear that the mode of speciation relates to the range of migration, and this is obviously correlated to the size of the organisms. What appears to be sympatric for a fish in a lake, may be worlds apart for a bacterium.

Finlay (2002) identified a cutoff of ~1 mm in size for organisms with a ubiquitous distribution; in contrast to larger organisms, microorganisms <1 mm would not have any biogeography (Fig. 3). Note that in Finlay’s hypothetical model, the abscissa represents organism length on a logarithmic scale but lacks dimensions except for the 1-mm cutoff shown by the arrow in Fig. 3. Further, I have added a scale for a characteristic area to Fig. 3 (top x-axis), because the size of organisms and their home range, where the organisms usually range in the course of a day or season, are linearly related to each other (Fig. 3, inset). The size of the home range is of utmost biological importance, because it sets the upper limits of biological interactions. According to Fig. 3, ubiquitous species (i.e., microorganisms) have typical home ranges varying between 10^{-6} and 10^1 m², corresponding to linear dimensions ranging from 1 mm to several m. The typical linear home range dimensions of macroorganisms with biogeographies range from several m to several km. The significance of the home range may be illustrated using the following example: the home range of many mammals such as wolf, deer or elephant covers tens to hundreds of km². Similarly, salmon and other anadromous or catadromous fish species migrate over thousands of km in the course of their lifetime. Daily migrations of many fish species may reach several hundreds of

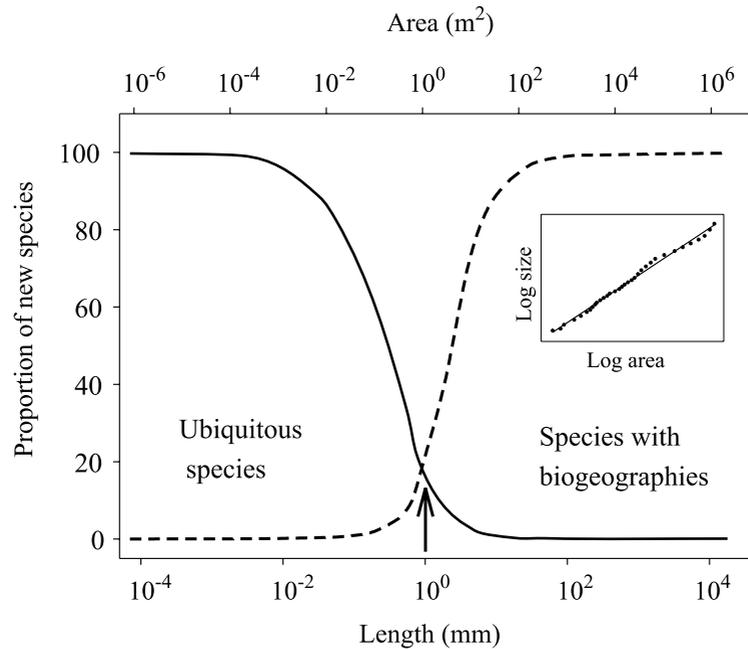


Fig. 3. A hypothetical model of the ubiquity-biogeography transition, which is assumed to be located in the vicinity of an organism size of ~ 1 mm (indicated by the arrow; modified after Finlay 2002). The solid curve denotes the proportion of new cosmopolitan species, which decreases with the size of the organisms, while the dashed curve denotes the proportion of new species with biogeographies, increasing with organism size. Since the size (length) of the organisms is correlated to the area of their home range (inset), the ubiquity/biogeography curves are also related to characteristic areas (top x-axis).

meters (Lucas and Baras 2001). Compare this home range to that of a freshwater microbe. Assuming a typical flagellate swimming speed of 0.2 mm s^{-1} (Fenchel 1987), a flagellate may migrate up to 17.3 m d^{-1} if it would constantly swim in one direction. Diel vertical migrations (DVM) over several meters are common among several freshwater phytoplankton species, and DVM exceeding 10 m have been reported (Sommer and Gliwicz 1986, Sommer 1988, Salonen and Rosenberg 2000). The range at which biological interactions such as competition and predation take place is, therefore, orders of magnitudes lower for aquatic microbes than it is for macroorganisms.

Finlay (2002) argues that the species to area curve is flat for microorganisms such as ciliates, i.e. increasing sampling area would only little increase the number of species found. This is in sharp contrast to insects, which show a linear increase in species richness with sampling area (in a double logarithmic plot; Fig 2 B in Finlay 2002). Although

the microscale (α -) diversity of protists is high, the amount of change between two sites along a gradient (β -diversity) and the large scale (γ -) diversity appears to be low, i.e. the species composition will change little as one moves across a region or between regions. Such a pattern of diversity and low species "turnover" (Whittaker 1970) is predicted by the model of high rates of dispersal and immigration within the neutral theory of community structure (Hubbell 2001, Bell 2001). However, according to the latter author, the neutral theory of abundance and diversity will fail at the taxonomic and geographical scales where specific adaptation has evolved. The neutral theory assumes that all members of a functional group are, on average, equally competitive, which stands in sharp contrast to the experience of all experimentally working physiologists and ecologists. In other words, Finlay's hypothetical model and the neutral theory of abundance and diversity ignore the evolutionary significance of biotic interactions. Species to area

relations must relate habitat size to the body size of the organisms to yield statistically sound results (Hillebrand and Blencker 2002).

In reality, an aquatic microbe may be dispersed over a much wider area than its home range, due to passive drifting by water currents, turbulence and mixing, and by transportation via wind, waterfowl and other vectors. However, a flagellate or ciliate has no chance to travel over a long distance as an active cell, simply because the lifespan of aquatic protists is in the order of hours to days. It must therefore be assumed that long distance dispersal is mediated via resting stages such as cysts known from, e.g. oligotrich freshwater ciliates (Müller and Wünsch 1999, Müller 2000, Müller *et al.* 2002) or chrysophyte flagellates (Cronberg and Sandgren 1986). Chrysophyte cysts are useful indicators for paleolimnological reconstruction of the past climate, because they are common in the sediment of lakes and are preserved for thousands of years (Cronberg 1986, Kamenik *et al.* 2001). Bacterial spores may survive even millions of years (summarized by Ogunseitan 2005). It is another, implicit assumption of the “everything is everywhere” dictum that all microorganisms are highly tolerant to stress, and may therefore survive long-distance travel (Hughes Martiny *et al.* 2006). Yet, similar to the issue of sexual reproduction, the significance and viability of resting stages remain at present unknown for >99 % of all extant freshwater microbes. Irrespective of this open question, it is clear that the scaling where specific adaptation may evolve in aquatic microbes is in the range of mm to m, certainly not km. Alpha-diversity of macroorganisms may be more comparable to β -, if not γ -diversity of microbes. The true microscale level (mm to m) of microbes has not yet been considered in published species to area curves; comparing the “species” turnover of elephants and bacteria in one plot with standard (logarithmic) scaling is therefore meaningless.

Assessing biodiversity in adequate terms does not relate only to spatial scaling; temporal scaling is of similar importance. The sampling frequency must relate to the generation time of the study organisms. One sample per year is usually enough to estimate the popu-

lation size of common fish or macrozoobenthos species. The species composition of zooplankton and phytoplankton in a given water body may change within one to a few weeks. The significance of biotic interactions such as competition, predation and parasitism has been clearly documented for the occurrence and seasonal succession of eukaryotic freshwater plankton (Sommer *et al.* 1986, Sommer 1989). The investigation of temporal patterns of bacterioplankton community change is still in its infancy, but it is highly likely that similar processes lead to seasonal shifts in the bacterioplankton (Güde 1989, Pedrós-Alió 1989, Jürgens *et al.* 1999, Šimek *et al.* 1999, Van der Gucht *et al.* 2001, Becker *et al.* 2002, Zwisler *et al.* 2003, Crump and Hobbie 2005, Wu and Hahn 2006). A more thorough study of the temporal dimension of microbial biodiversity will certainly increase current estimates of the overall microbial diversity.

Finally, the taxonomic resolution is crucial for any record of biodiversity. As a consequence of the unresolved species problem (see above), this is a major issue in contemporary microbial ecology, which will be discussed in the following section.

4. NO BIOGEOGRAPHY OF AQUATIC MICROBES? – A MYTH UNRAVELED

The studies published until recently on the regional and local impact on species diversity were highly biased towards larger organisms and did not adequately investigate the degree of similarity between local and regional area for bacteria and protists (Hillebrand and Blencker 2002, Curtis and Sloan 2004). Biogeography has already been demonstrated for microorganisms living in isolated habitats, such as thermophilic archaeobacteria (Whitaker *et al.* 2003) and cyanobacteria (Papke *et al.* 2003). Most freshwater phytoplankton species appear to be cosmopolitan, but there is also a considerable number of local or regional endemic algal species (reviewed by Padisák 2003). Recent evidence suggests that the similarity of bacterial and heterotrophic protist species composition decreases with increasing geographic distance (Hillebrand *et al.* 2001, Horner-Devine *et al.* 2004, Hughes

Martiny *et al.* 2006). The issue of microbial biogeography has been revitalized with new findings emerging from the advent of molecular techniques for the detection of as yet unculturable strains.

Twenty years after the detection of the quantitative significance of bacteria in pelagic food webs, Rheinheimer (1992) concluded in his textbook that there are no freshwater bacteria that would differ from bacteria found in soil and groundwater. With the advent of molecular tools for identifying aquatic microorganisms, it became obvious during the following decade that there is a set of freshwater bacteria clearly different from their marine counterparts (Glöckner *et al.* 2000, Zwart *et al.* 2002). Evidence is accumulating every week demonstrating that members of the α - and β -Proteobacteria, Bacteroidetes, and Actinobacteria form typical heterotrophic bacterial freshwater clusters (Hiorns *et al.* 1997, Methé *et al.* 1998, Lindström 2000, Hahn 2003, Hahn *et al.* 2003, Hahn and Pöckl 2005, Schauer and Hahn 2005, Crump and Hobbie 2005, Van der Gucht *et al.* 2005, Lindström *et al.* 2005, Langenheder *et al.* 2006). Similarly, the autotrophic single-celled Cyanobacteria form several clusters indigenous to freshwater (Ernst *et al.* 2003, Crosbie *et al.* 2003a, 2003b). Most recently, novel eukaryotic phylogenetic groups have been detected which seem to be typical for freshwater environments (Richards *et al.* 2005). It is common to most of these studies, that some taxa appear globally distributed while others show a more restricted distribution. The same conclusion holds true for protists (Coleman 2002, Mitchell and Meisterfeld 2005). Limited phylogenetic information in the SSU rRNA gene and taxon under-sampling (Palys *et al.* 2000, Crosbie *et al.* 2003a) prevent, however, at present any firm conclusion on the extent of biogeography of most freshwater microbes.

The detection of microbial biogeography strongly depends on the taxonomic resolution of the analysis method (Mitchell and Meisterfeld 2005). In a salt marsh, Betaproteobacteria exhibited a significant taxa to area relationship for the 99% resolution of the 16S rDNA, but not for the 97% and 95% cutoff (Horner-Devine *et al.* 2004). Simi-

larly, two neighbouring rivers in NE Massachusetts (USA) with remarkably synchronous bacterioplankton communities were similar at the 97% ribosomal DNA identity but differed in their diversity at the 99% identity (Crump and Hobbie 2005). Several recent studies suggest that the 16S rRNA gene is too conservative to identify OTU's, ecotypes or species of certain freshwater bacteria (Jaspers and Overmann 2004, Hahn and Pöckl 2005). The advent of molecular techniques with a higher taxonomic resolution such as PCR fingerprinting analyses revealed that each lake and pond has its own distinct bacterioplankton community (Yannarell and Triplett 2004, Hahn *et al.* 2005, Schauer and Hahn 2005, Langenheder *et al.* 2006). Figure 4 shows an example illustrating how the bacterioplankton composition may change along an environmental gradient.

Similar findings were reported for bacteria of the wide-spread *Polynucleobacter* group, which forms a monophyletic cluster of a minimum 16S rRNA sequence similarity of 95.8% within the Betaproteobacteria (Zwart *et al.* 2002, Hahn 2003, Wu and Hahn 2006). The *Polynucleobacter* cluster consists of at least four, species-like subclusters with >98% 16S rRNA gene similarity (Wu and Hahn 2006). A surprisingly low microdiversity was demonstrated for the narrow *Polynucleobacter* subcluster C (PnecC) in an alpine pond (Hahn *et al.* 2005), which further challenges the "everything is everywhere" theorem and contrasts recent investigations from coastal bacterioplankton populations, where an enormous genotypic diversity (>1600 coexisting phylotypes) was found at the 16S rRNA level (Acinas *et al.* 2004, Thompson *et al.* 2005). The question is, can these ribotypes be regarded as natural taxonomic units, i.e. do they represent species or ecotypes (Giovannoni 2004)? Since coexistence of more than 1000 ecological niches of sympatric bacteria appears unlikely, it is concluded that most of this genetic variation is neutral (Acinas *et al.* 2004, Giovannoni 2004).

Similar to bacteria, there is increasing evidence that previously recognized protist (morpho)species may actually have geographically patchy distributions in marine

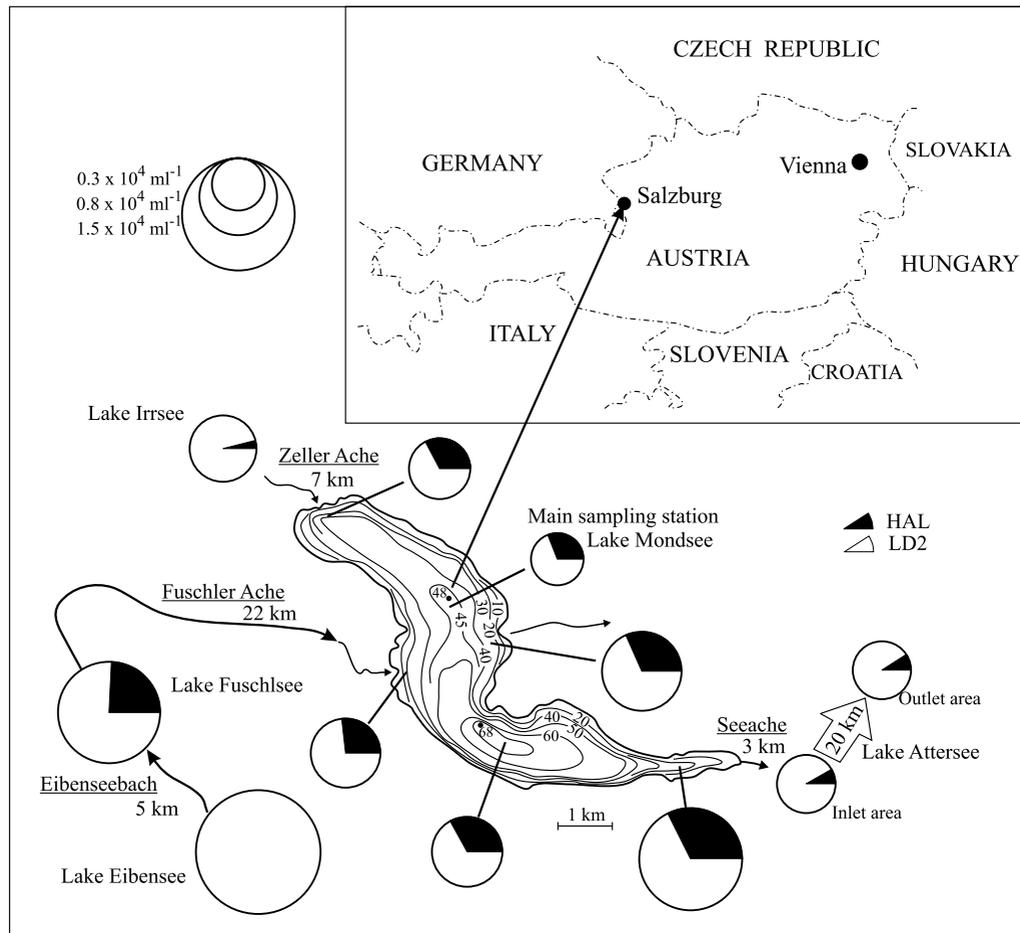


Fig. 4. Spatial distribution of the species-like subclusters HAL and LD2 within the bacterial SOL cluster (Fam. *Saprospiraceae*, modified from Schauer *et al.* 2006) in Lake Mondsee (Austria) and connecting lakes (Schauer *et al.* 2006). The study area is located 35 km east of the city of Salzburg (see map of Austria, on top). The size of the pie diagrams indicates the bacterial abundance. The relative contribution of the two bacterial subclusters was stable in each lake, but differed even in connected lakes (Irrsee and Mondsee, Mondsee and Attersee).

and fresh water (Kim *et al.* 2004, Katz *et al.* 2005). Again, detection of biogeography is related to the taxonomic level of resolution. Among the *Spumella*-like chrysophyte flagellates, a global distribution is suggested by 18S rRNA analysis, because identical ribotypes can be found on different continents; yet there are indications for ecological differences between these strains (Boenigk *et al.* 2005). Both for bacteria and for protists, the question is, what the sequence data actually show, and how a molecular view of microbial diversity can be compared with a species-based view of plant and animal ecology (Whitfield 2005, Hughes Martiny *et al.* 2006). Since the current the level of

taxonomic resolution in microbial diversity studies is much coarser than in biogeography studies with macroorganisms, declaring that microbial “species” are cosmopolitan (Finlay 2002) might be equivalent to stating that a genus or family of birds is cosmopolitan (Hughes Martiny *et al.* 2006). Summing up the evidence that has accumulated over the past five years, the conclusion is that there is no reason to further spread “the myth of ubiquity” (Lachance 2004). The reframed view (Katz *et al.* 2005, Hughes Martiny *et al.* 2006) is more exciting, since “we are beginning to see biogeographic patterns in microorganisms” (C. Horner-Devine, cited in Whitfield 2005).

5. THE SIGNIFICANCE OF LOCAL ADAPTATION

Local adaptation is the genetically fixed differentiation of individual populations among a given species in relation to particular environmental conditions. The adaptation becomes obvious in adaptive traits, increasing the Darwinian fitness of the respective genotypes, i.e. differentiation due to selectively neutral mutations does not imply adaptation. From the foregoing section, it is obvious that, in many cases, local adaptation cannot be studied in broad categories such as the 70% total DNA similarity (for prokaryotes), the morphospecies (for protists) or the SSU rRNA level (for bacteria and protists). As with the difficulty of identifying and comparing species across taxonomic domains, there is no “gold standard” to which local adaptation can be compared between prokaryotes and eukaryotes.

For prokaryotes, the term microdiversity has been introduced to describe the phenomenon of phylogenetically closely related but physiologically distinct populations (Moore *et al.* 1998, Jaspers and Overmann 2004). There is mounting evidence that freshwater bacteria with identical 16S rRNA gene sequences comprise strains with different physiological requirements, i.e. with different ecological niches. This has already been demonstrated experimentally for substrate use (Jaspers and Overmann 2004) and for temperature adaptation (Hahn and Pöckl 2005). In the latter study, the thermal niches of planktonic *Actinobacteria* corresponded to the habitat temperature of their origin.

Temperature adaptation within a nominal species has also been recorded for several planktonic ciliate species (Weisse and Montagnes 1998, Montagnes and Weisse 2000, Weisse *et al.* 2001). Protists with predominant or exclusively asexual reproduction have a (multi-)clonal population structure (Kusch 1998, Kusch *et al.* 2000, Kim *et al.* 2004, Lowe *et al.* 2005) with divergent genotypes and phenotypes. This intraspecific variability is obvious at the physiological but usually hidden at the morphological level. The concept that each (ciliate) morphospecies has a discrete phenotype and a unique ecological niche and that, there-

fore, biodiversity can be assessed in terms of (morpho)species numbers (Finlay *et al.* 1996, Finlay and Fenchel 2004), needs to be rejected (Weisse and Rammer 2006). The ecologically relevant realised or partial niche (Hutchinson 1965, Vandermere 1972) of a given, asexually reproducing species may vary considerably in space and time, primarily depending on the habitat and the clonal composition of the population. Bland Finlay, citing his own and Tom Fenchel's unpublished work, concedes that “clonal isolates of a single morphospecies from various locations worldwide retain physiological features that reflect the nature of the habitat from which they were taken” (Finlay 2004). Note, however, that a rigorous test of local adaptation among globally occurring aquatic protozoa is still lacking. If local adaptation is common, this will inherently affect ecosystem function, since, e.g. clone-specific production rates provide the amount of food available for metazoan predators. As Nanney pointed out (Nanney 1999, Nanney 2004, Nanney 2005), the functional diversity of ciliates (and, most likely, other protists) is considerably larger than is obvious at the morphospecies level, and adherence to the morphospecies concept will grossly underestimate the number of species, the number of niches, and the complexity of the ecosystem (Weisse and Rammer 2006).

6. IS MICROBIAL DIVERSITY FUNDAMENTALLY DIFFERENT? – DIRECTIONS FOR FUTURE RESEARCH

The advent of various molecular tools has collectively opened a new gate for the study of microbial diversity (Dorigo *et al.* 2005, Ogunseitan 2005). In prokaryotes, molecular techniques such as cloning and sequencing of ribosomal genes provide often the only means to assess the diversity of, as yet, unculturable organisms. The current challenge is to link genetic divergence to ecophysiological diversity in the major taxa. More data are needed to reveal if globally distributed microorganisms can be separated into individual metapopulations with limited genetic exchange. If this is the rule, the individual populations should show indications of local adaptation, both in the genotype and

in the phenotype. The primary problem with the “everything is everywhere” view is that this is not a scientific hypothesis, because it is not falsifiable. Similarly, there is no point in arguing about the “true” number of ciliate and other protist species as long as vast areas such as Africa and the South American continent remain undersampled for major taxonomic groups (Foissner 1999, Foissner et al. 2002). The merit of this debate is that it stimulated further research.

From a conceptual point of view, the second proposition of Baas-Becking’s axiom, “everything is everywhere, the environment selects”, is more challenging than the better known first part. The conclusion that the environment selects is related to Gleason’s individualistic concept (Gleason 1926) which interprets the relationship between coexisting species as the result of similarities in their requirements and tolerances. The environment acts as a filter, filtering out all those organisms whose properties do not fit to a given habitat. As Padisák (2003) pointed out, the absence of certain phytoplankton species from whole continents cannot be explained by the lack of suitable habitats. The significance of biotic interactions, in response to their habitat, needs to be explored in more detail for most microbial consortia. At present, aquatic microbial ecologists have, for the first time, the chance to identify patterns of microbial distribution and their interactions. The conceptual challenge is to compare the emerging patterns with those of plants and animals at equivalent taxonomic levels.

The consequences of the undoubtedly vast population sizes of aquatic microbes need to be analysed, both from an empirical and from a theoretical perspective. Is there a critical population size above which genetic drift plays no role, although the total number of mutations within a given taxon may be extremely high? What are the physical limits for sympatric and parapatric speciation among aquatic microbes, and how does the effect of environmental heterogeneity relate to divergence caused by (limited) dispersal? How important is lateral gene transfer for the establishment and maintenance of prokaryote biodiversity? Deciphering of an increasing number of microbial genomes will certainly provide at least partial answers to several of

those questions. Yet, not everything is in the genes. Epigenetic inheritance systems (EISs, Jablonka *et al.* 1992, Jablonka and Lamb 1995) allow cells of different phenotype but identical genotype to transmit their phenotype to their offspring, even when the phenotype-inducing stimuli are absent.

The goal is to understand how (freshwater) microbes evolve and change, and to develop adequate methods and concepts (categories) to analyse those evolutionary shifts. Only once we have achieved a deeper understanding of the genotype-phenotype relationship of aquatic microbes can we conclude if their biodiversity is fundamentally different from that of macroorganisms. At present, it appears that it is not - what is fundamentally different, is our view of aquatic microbial diversity, which is still blurred. There is, however, reason to finish this review with an optimistic note. If microbial ecology keeps the momentum that is has gained during the past 20 years, some of the major open questions raised here will be answered within the next one or two decades.

ACKNOWLEDGEMENTS: I am grateful to Michael Schauer and Martin Hahn for providing as yet unpublished material. Thanks to Martin Hahn, Rainer Kurmayer, Wilhelm Foissner, Jens Boenigk and Dan Danielopol for many stimulating discussions and comments on the draft manuscript. Suggestions and corrections by two anonymous reviewers, in particular one, are gratefully acknowledged. Last but not least I would like to thank the organizers of the SEFS4 meeting and the editors of this Special Volume of *Pol. J. Ecol.* for their support during and after the meeting.

7. REFERENCES

- Acinas S.G., Klepac-Ceraj V., Hunt D.E., Pharino C., Ceraj I., Distel D.L., Polz M.F. 2004 – Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community – *Nature*, 430: 551–554.
- Agatha S. 2004 – A cladistic approach for the classification of oligotrichid ciliates (Ciliophora: Spirotricha) – *Acta Protozool.* 43: 201–217.
- Atwood K.C., Schneider L.K., Tyan F.J. 1951 – Periodic selection in *Escherichia coli* – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 37: 146–155.
- Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.A., Thingstad F.

- 1983 – The ecological role of water-column microbes in the sea – *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257–263.
- Bachmann K. 1998 – Species as units of diversity: an outdated concept – *Theory Biosci.* 117: 213–230.
- Barth D., Krenek S., Fokin S.I., Berendonk T.U. 2006 – Intraspecific genetic variation in *Paramecium*, revealed by mitochondrial COI sequences – *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 20–25.
- Becker S., Fahrbach M., Böger P., Ernst A. 2002 – Quantitative tracing, by *Taq* nuclease assays, of a *Synechococcus* ecotype in a highly diversified natural population – *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4486–4494.
- Becks L., Hilker F.M., Malchow H., Jürgens K., Arndt H. 2005 – Experimental demonstration of chaos in a microbial food web – *Nature*, 435: 1226–1229.
- Bell G. 2001 – Neutral macroecology – *Science*, 293: 2413–2418.
- Beszteri B., Ács É., Medlin L.K. 2005 – Ribosomal DNA sequence variation among sympatric strains of the *Cyclotella meneghiniana* complex (Bacillariophyceae) reveals cryptic diversity – *Protist*, 156: 317–333.
- Boenigk J., Pfandl K., Stadler P., Chatzinotas A. 2005 – High diversity of the “*Spumella*-like” flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions – *Environ. Microbiol.* 7: 685–697.
- Boenigk J., Stadler P., Wiedroither A., Hahn M.W. 2004 – Strain-specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster – *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5787–5793.
- Claridge M.F., Dawah H.A., Wilson M.R. 1997 – Practical approaches to species concepts for living organisms (In: *Species – The units of biodiversity*, Eds: M.F. Claridge, H.A. Dawah, M.R. Wilson) – Chapman and Hall, London, pp. 1–15.
- Cohan F.M. 2001 – Bacterial species and speciation – *Syst. Biol.* 50: 513–524.
- Cohan F.M. 2002 – What are bacterial species? – *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 457–487.
- Coleman A.W. 2002 – Microbial eukaryote species – *Science*, 297: 337.
- Collins S., Bell G. 2004 – Phenotypic consequences of 1000 generations of selection at elevated CO₂ in a green alga – *Nature*, 431: 566–569.
- Cooper V.S., Bennett A.F., Lenski R.E. 2001 – Evolution of thermal dependence of growth rate of *Escherichia coli* populations during 20 000 generations in a constant environment – *Evolution*, 55: 889–896.
- Cracraft J. 1983 – Species concepts and speciation analysis – *Current Ornithology*, 1: 159–187.
- Cronberg G. 1986 – Chrysophycean cysts and scales in lake sediments: a review (In: *Chrysophytes: aspects and problems*, Eds: J. Kristiansen, R.A. Andersen) – Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 281–337.
- Cronberg G., Sandgren C.D. 1986 – A proposal for the development of standardized nomenclature and terminology for chrysophycean statospores (In: *Chrysophytes: aspects and problems*, Eds: J. Kristiansen, R.A. Andersen) – Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 317–328.
- Crosbie N.D., Pöckl M., Weisse T. 2003a – Dispersal and phylogenetic diversity of non-marine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-intergenic spacer sequence analyses – *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5716–5721.
- Crosbie N.D., Pöckl M., Weisse T. 2003b – Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting – *J. Microbiol. Meth.* 55: 361–370.
- Crump B.C., Hobbie J.E. 2005 – Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers – *Limnol. Oceanogr.* 50: 1718–1729.
- Curtis T.P., Sloan W.T. 2004 – Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology – *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 221–226.
- Darling K.F., Wade C., Stewart I.A., Kroon D., Dingle R., Leigh Brown A.J. 2000 – Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers – *Nature*, 405: 43–47.
- Darwin C. 1859 – On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life – John Murray, London, 502 pp. (<http://www.britishlibrary.net/charles.darwin/texts/origin1859/>).
- Dieckmann U., Doebeli M. 1999 – On the origin of species by sympatric speciation – *Nature*, 400: 354–357.
- Dini F., Nyberg D. 1993 – Sex in ciliates (In: *Advances in microbial ecology*, Vol 13, Ed. J.G. Jones) – Plenum Press, New York, pp.129–144.
- Dini F., Nyberg D. 1999 – Growth rates of marine ciliates on diverse organisms reveal

- ecological specializations within morphospecies – *Microb. Ecol.* 37: 13–22.
- Dorigo U., Volatier L., Humbert J.-F. 2005 – Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities – *Wat. Res.* 39: 2207–2218.
- Dykhuizen D.E. 1998 – Santa Rosalia revisited: Why are there so many species in bacteria? – *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 25–33.
- Ernst A., Becker S., Wollenzien U.I.A., Postius C. 2003 – Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis – *Microbiology*, 149: 217–228.
- Fenchel T. 1987 – Ecology of protozoa. The biology of free-living phagotrophic protists – Science Tech. – Springer, 197 pp.
- Fernando P., Vidya T.N.C., Payne J., Stuewe M., Davison G., Alfred R.J., Andau P., Bosi E., Kilbourn A., Don J., Melnick D.J. 2003 – DNA analysis indicates that Asian elephants are native to Borneo and are therefore a high priority for conservation. *PLOS Biology*, 1: p. 6. (<http://biology.plosjournals.org>).
- Finlay B.J. 2002 – Global dispersal of free-living microbial eukaryote species – *Science*, 296: 1061–1063.
- Finlay B.J. 2004 – Protist taxonomy: an ecological perspective – *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B*, 359: 599–610.
- Finlay B.J., Corliss J.O., Esteban G.F., Fenchel T. 1996 – Biodiversity at the microbial level: the number of free-living ciliates in the biosphere – *Quart. Rev. Biol.* 71: 221–237.
- Finlay B.J., Esteban G.F., Fenchel T. 1998 – Protozoan diversity: converging estimates of the global number of free-living ciliate species – *Protist*, 149: 29–37.
- Finlay B.J., Esteban G.F., Fenchel T. 2004 – Protist diversity is different? – *Protist*, 155: 15–22.
- Finlay B.J., Fenchel T. 1999 – Divergent perspectives on protist species richness – *Protist*, 150: 229–233.
- Finlay B.J., Fenchel T. 2004 – Cosmopolitan metapopulations of free-living microbial eukaryotes – *Protist*, 155: 237–244.
- Foissner W. 1999 – Protist diversity: estimates of the near-imponderable – *Protist*, 150: 363–368.
- Foissner W., Agatha S., Berger H. 2002 – Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha region and the Namib Desert – *Denisia*, 5: 1–1459.
- Foissner W., Stoeck T., Schmidt H., Berger H. 2001 – Biogeographical differences in a common soil ciliate, *Gonostomum affine* (Stein), as revealed by morphological and RAPD-fingerprint analysis – *Acta Protozool.* 40: 83–97.
- Foissner W., Strüder-Kypke M., van der Staay G.W.M., Moon-van der Staay S.-Y., Hackstein J.H.P. 2003 – Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study – *Eur. J. Protistol.* 39: 365–372.
- Gavrilets S. 2003 – Perspective: Models of speciation: what have we learned in 40 years? – *Evolution*, 57, 2197–2215.
- Giovannoni S. 2004 – Oceans of bacteria – *Nature*, 430: 515–516.
- Gleason H.A. 1926 – The individualistic concept of the plant association – *Bull. Torrey Bot. Club*, 53: 7–26.
- Glöckner F.O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthale J., Pernthaler A., Amann R. 2000 – Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria – *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5053–5065.
- Gogarten J.P., Townsend J.P. 2005 – Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution – *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 679–687.
- Gosling E. 1999 – The periwinkle, a perfect model for biodiversity studies. In: The Irish scientist year book, (<http://www.irishscientist.ie/GITEG115.htm>)
- Green J.L., Holmes A.J., Westoby M., Oliver I., Briscoe D., Dangerfield M., Gillings M., Beattie A.J. 2004 – Spatial scaling of microbial eukaryote diversity – *Nature*, 432: 747–750.
- Güde H. 1989 – The role of grazing on bacteria in plankton succession (In: Plankton ecology: succession in plankton communities, Ed. U. Sommer) – Brock/Springer series in contemporary bioscience. Springer, Berlin, pp. 337–364.
- Hahn M.W. 2003 – Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones – *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5248–5254.
- Hahn M.W., Lünsdorf H., Wu Q.L., Schauer M., Höfle M.G., Boenigk J., Stadler P. 2003 – Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia – *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1442–1451.

- Hahn M.W., Pöckl M. 2005 – Ecotypes of planktonic Actinobacteria with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats – *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 766–773.
- Hahn M.W., Pöckl M., Wu Q.L. 2005 – Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond – *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4539–4547.
- Hey J. 2001 – Genes, categories and species – Oxford University Press, Oxford, 217 pp.
- Hillebrand H., Blencker T. 2002 – Regional and local impact on species diversity – from pattern to processes – *Oecologia*, 132: 479–491.
- Hillebrand H., Watermann F., Karez R., Berninger U.-G. 2001 – Differences in species richness patterns between unicellular and multicellular organisms – *Oecologia*, 126: 114–124.
- Hiorns W.D., Methé E.A., Nierzwicki-Bauer S.A., Zehr J.P. 1997 – Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences – *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2957–2960.
- Horner-Devine M.C., Lage M., Hughes J.B., Bohannon B.J.M. 2004 – A taxon-area relationship for bacteria – *Nature*, 432: 750–753.
- Hubbel S.P. 2001 – The unified neutral theory of biodiversity and biogeography. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, 375 pp.
- Huey R.B., Berrigan D. 1996 – Testing evolutionary hypotheses of acclimation (In: Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation, Eds: I.A. Johnston, A.F. Bennett) – Cambridge University Press, Society for Experimental Biology Seminar Series 59, Cambridge, pp. 205–237.
- Hughes Martiny J.B., Bohannon B.J.M., Brown J.H., Colwell R.K., Fuhrman J.A., Green J.L., Horner-Devine M.C., Kane M., Krumins J.A., Kuske C.R., Morin P.J., Naeem S., Rvrel's L., Reysenbach A.-L., Smith V.H., Staley J.T. 2006 – Microbial biogeography: putting microorganisms on the map – *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 102–112.
- Hull D.L. 1997 – The ideal species concept – and why we can't get it (In: Species – The units of biodiversity, Eds: M.F. Claridge, H.A. Dawah, M.R. Wilson) – Chapman and Hall, London, pp. 357–380.
- Hutchinson G.E. 1965 – The niche: an abstractly inhabited hypervolume (In: The ecological theatre and the evolutionary play, Ed. G.E. Hutchinson) – Yale University Press, New Haven, pp. 26–78.
- Jablonka E., Lachmann M., Lamb M.J. 1992 – Evidence, mechanisms and models of the inheritance of acquired characters – *J. Theor. Biol.* 158: 245–268.
- Jablonka E., Lamb M.J. 1995 – Epigenetic inheritance and evolution – the Lamarckian dimension – Oxford University Press, Oxford, 360 pp.
- Jackson R.B., Linder C.R., Lynch M., Purugganan M., Somerville S., Thayer S.S. 2002 – Linking molecular insight and ecological research – *Trends Ecol. Evol.* 17: 409–414.
- Jaspers E., Overmann J. 2004 – Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals – *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4831–4839.
- Jerome C.A., Simon E.M., Lynn D.H. 1996 – Description of *Tetrahymena empido-kyrea* n. sp., a new species in the *Tetrahymena pyriformis* sibling species complex (Ciliophora, Oligohymenophorea), and an assessment of its phylogenetic position using small-subunit rRNA sequences – *Can. J. Zool. (Rev. Can. Zool.)*, 74: 1898–1906.
- Jürgens K., Perntaler J., Schalla S., Amann R. 1999 – Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing – *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1241–1250.
- Kamenik C., Schmidt R., Koinig K.A., Panareda A.A., Thompson R., Psenner R. 2001 – The chrysophyte stomatocyst composition in a high alpine lake (Gossenköllesee, Tyrol, Austria) in relation to seasonality, temperature and land-use – *Nova Hedwigia, Beihefte*, 122: 1–22.
- Katz L.A., McManus G.B., Snoeyenbos-West O.L.O., Griffin A., Pirog K., Costas B., Foissner W. 2005 – Reframing the “Everything is everywhere” debate: evidence for high gene flow and diversity in ciliate morphospecies – *Aquat. Microb. Ecol.* 41: 55–65.
- Kim E., Wilcox L., Graham L. 2004 – Genetically distinct populations of the Dinoflagellate *Peridinium limbatum* in neighboring northern Wisconsin Lakes – *Microb. Ecol.* 48: 521–527.
- King M. 1993 – Species evolution: the role of chromosome change – Cambridge University Press, Cambridge, UK, 336 pp.
- Kurmayer R., Christiansen G., Fastner J., Börner T. 2004 – Abundance of active and inactive microcystin genotypes in popu-

- lations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. – Environ. Microbiol. 6: 831–841.
- Kusch J. 1995 – Adaptation of inducible defense in *Euplotes daidaleos* (Ciliophora) to predation risks by various predators – Microb. Ecol. 30: 79–88.
- Kusch J. 1998 – Local and temporal distribution of different genotypes of pond-dwelling *Stentor coeruleus* – Protist, 149: 147–154.
- Kusch J., Welter H., Stremmel M., Schmidt H.J. 2000 – Genetic diversity in populations of a freshwater ciliate – Hydrobiologia, 431: 185–192.
- Lachance M.-A. 2004 – Here and there or everywhere – BioScience, 54: 884.
- Langenheder S., Lindström E.S., Tranvik L.J. 2006 – Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions – Appl. Environ. Microbiol. 72: 212–220.
- Leander B.S., Keeling P.J. 2003 – Morphostasis in alveolate evolution – Trends Ecol. Evol. 18: 395–402.
- Lenormand T. 2002 – Gene flow and the limits to natural selection – Trends Ecol. Evol. 17: 183–189.
- Lenski R.E. 2004 – Microbial evolution in action – Microbiology Today, 31: 158.
- Lindström E.S. 2000 – Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content – Microb. Ecol. 40: 104–113.
- Lindström E.S., Kamst-Van Agterveld M.P., Zwart G. 2005 – Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature and lake water retention time – Appl. Environ. Microbiol. 71: 8201–8206.
- Lowe C.D., Day A., Kemp S.J., Montagnes D.J.S. 2005 – There are high levels of functional and genetic diversity in *Oxyrrhis marina* – J. Eukaryot. Microbiol. 52: 250–257.
- Lucas M.C., Baras E. 2001 – Migration of freshwater fishes – Blackwell Science, London, 420 pp.
- Lynn D.H. 2003 – Morphology or molecules: How do we identify the major lineages of ciliates (Phylum Ciliophora)? – Europ. J. Protistol. 39: 356–364.
- Mayden R.L. 1997 – A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem (In: Species – The units of biodiversity, Eds: M.F. Claridge, H.A. Dawah, M.R. Wilson) – Chapman and Hall, London, pp. 381–424.
- Mayr E. 1942 – Systematics and the origin of species – Columbia Univ. Press, New York, 330 pp.
- Mayr E. 1963 – Animal species and evolution – Harvard Univ. Press, Cambridge, 797 pp.
- Mayr E. 2004 – 80 years of watching the evolutionary scenery – Science, 365: 46–47.
- Méthé B.A., Hiorns W.D., Zehr J.P. 1998 – Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition: Analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes – Limnol. Oceanogr. 43: 368–374.
- Mitchell E.A.D., Meisterfeld R. 2005 – Taxonomic confusion blurs the debate on cosmopolitanism versus local endemism of free-living protists – Protist, 156: 263–267.
- Mongold J.A., Bennett A.F., Lenski R.E. 1996 – Experimental investigations of evolutionary adaptation to temperature (In: Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation, Eds: I.A. Johnston, A.F. Bennett) – Cambridge University Press, Cambridge, pp. 239–264.
- Montagnes D.J.S., Weisse T. 2000 – Fluctuating temperatures affect growth and production rates of planktonic ciliates – Aquat. Microb. Ecol. 21: 97–102.
- Moore L.R., Rocap G., Chisholm S.W. 1998 – Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes – Nature, 393: 464–467.
- Müller H. 2000 – Evidence of dormancy in planktonic oligotrich ciliates – Verh. Internat. Verein. Limnol. 27: 3206–3209.
- Müller H., Stadler P., Weisse T. 2002 – Seasonal dynamics of cyst formation of strombidiid ciliates in alpine Lake Mondsee, Austria – Aquat. Microb. Ecol. 29: 181–188.
- Müller H., Wünsch C. 1999 – Seasonal dynamics of cyst formation of pelagic strombidiid ciliates in a deep prealpine lake – Aquat. Microb. Ecol. 17: 37–47.
- Nanney D.L. 1999 – When is a Rose?: The kinds of *Tetrahymena* (In: Species: New interdisciplinary essays, Ed. R.A. Wilson) – MIT Press, Cambridge, Mass. pp. 93–118.
- Nanney D.L. 2004 – No trivial pursuit – BioScience, 54: 720–721.
- Nanney D.L. 2005 – The systematics and biogeography of ciliated protozoa – SILnews, 44: 6–7.
- Ogunseitán O. 2005 – Microbial diversity – Form and function in Prokaryotes – Blackwell, Malden, MA, USA, 312 pp.
- Padisák J. 2003 – Phytoplankton (In: The lakes handbook, Vol. 1, Eds: P. O'Sullivan, C.S. Reynolds) – Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 251–308.
- Palys T., Berger E., Mitrica I., Nakamura L.K., Cohan F.M. 2000 – Protein-coding

- genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1021–1028.
- Palys T., Cohan F.M., Nakamura L.K. 1997 – Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47: 1145–1156.
- Papke R.T., Ramsing N.B., Bateson M.M., Ward D.M. 2003 – Geographical isolation in hot spring cyanobacteria – *Environ. Microbiol.* 5: 650–659.
- Papke R.T., Ward D.M. 2004 – The importance of physical isolation to microbial diversification – *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 293–303.
- Pedrós-Alió C. 1989 – Toward an autecology of bacterioplankton (In: *Plankton ecology: succession in plankton communities*, Ed. U. Sommer) – Brock/Springer series in contemporary bioscience, Berlin, pp. 297–336.
- Pomeroy L.R. 1974 – The ocean's food web: a changing paradigm – *BioScience*, 24: 499–504.
- Porter K.G., Pearl H., Hodson R., Pace M., Priscu J., Riemann B., Scavia D., Stockner J. 1988 – Microbial interactions in lake foodwebs (In: *Complex interactions in lake communities*, Ed. S.R. Carpenter) – Springer, Berlin, pp. 234–255.
- Quispel A. 1998 – Lourens G.M. Baas Becking (1895–1963), inspirator for many (micro)biologists – *Internatl. Microbiol.* 1: 69–72.
- Rainey P. 2004 – Bacterial populations adaptogenetically, by natural selection – even in the lab! – *Microbiol. Today*, 31: 160–162.
- Rheinheimer G. 1992 – *Aquatic Microbiology*, 4th edition – Wiley, New York, 363 pp.
- Richards T.A., Vepritskiy A.A., Gouliamova D.E., Nierzwicki-Bauer S.A. 2005 – The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages – *Environ. Microbiol.* 7: 1413–1425.
- Rigler F.H., Peters R.H. 1995 – *Science and limnology – Excellence in Ecology*, Book 6, Ecology Institute, Oldendorf/Luhe, 239 pp.
- Rosselló-Mora R., Amann R. 2001 – The species concept for prokaryotes – *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 39–67.
- Ryder O.A. 1986 – Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies – *Trends Ecol. Evol.* 1: 9–10.
- Salonen K., Rosenberg M. 2000 – Advantages from diel vertical migration can explain the dominance of *Goniostomum semen* (Raphidophyceae) in a small, steeply-stratified humic lake – *J. Plankton Res.* 22: 1841–1853.
- Schauer M., Hahn M.W. 2005 – Diversity and phylogenetic affiliations of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats – *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1931–1940.
- Schauer M., Jing J., Hahn M.W. 2006 – Recurrent seasonal development in abundance and composition of filamentous SOL bacteria (*Saprosiraceae*, *Bacteroidetes*) in oligo-mesotrophic Lake Mondsee (Austria) – *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4704–4712.
- Schlegel M., Meisterfeld R. 2003 – The species problem in protozoa revisited – *Europ. J. Protistol.* 39: 349–355.
- Šimek K., Kojecká P., Nedoma J., Hartman P., Vrba J., Dolan J.R. 1999 – Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir – *Limnol. Oceanogr.* 44: 1634–1644.
- Šimek K., Nedoma J., Pernthaler J., Posch T., Dolan J.R. 2002 – Altering the balance between bacterial production and protistan bacterivory triggers shifts in freshwater bacterial community composition – *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 453–463.
- Simpson G.G. 1961 – *Principles of animal taxonomy* – Columbia Univ. Press, New York.
- Snoeyenbos-West O.L.O., Salcedo T., McManus G.B., Katz L.A. 2002 – Insights into the diversity of choreotrich and oligotrich ciliates (Class: Spirotrichea) based on genealogical analyses of multiple loci – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1901–1913.
- Sommer U. 1988 – Some size relationships in phytoplankton motility – *Hydrobiologia*, 161: 125–131.
- Sommer U. 1989 – *Plankton ecology : succession in plankton communities* – Brock/Springer series in contemporary bioscience, Berlin, 369 pp.
- Sommer U., Gliwicz Z.M. 1986 – Long range vertical migration of *Volvox* in tropical Lake Cahora Bassa (Mozambique) – *Limnol. Oceanogr.* 31: 650–653.
- Sommer U., Gliwicz Z.M., Lampert W., Duncan A. 1986 – The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters – *Arch. Hydrobiol.* 106: 433–471.
- Sonneborn T.M. 1937 – Sex, sex inheritance and sex determination in *Paramecium aurelia* – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 23: 378–385.
- Sonneborn T.M. 1957 – Breeding systems, reproductive methods, and species problems

- in protozoa (In: The species problem, Ed. E. Mayr) – American Association for the Advancement of Science, Washington, pp. 155–324.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B. 2002 – Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043–1047.
- Stackebrandt E., Goebel B.M. 1994 – Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociations and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846–849.
- Templeton A.T. 1989 – The meaning of species and speciation: a genetic perspective (In: Speciation and its consequences, Eds: D. Otte, J.A. Endler) – Sunderland, MA, Sinauer Associates, pp. 3–27.
- Thompson J.R., Pacocha S., Pharino C., Klepac-Ceraj V., Hunt D.E., Benoit J., Sarma-Rupavtarm R., Distel D.L., Polz M.F. 2005 – Genotypic diversity within a coastal bacterioplankton population – *Science*, 307: 1311–1313.
- Torsvik V., Øvreås L., Thingstad T.F. 2002 – Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors – *Science*, 296: 1064–1066.
- Turesson G. 1922 – The genotypic response of the plant species to the habitat – *Hereditas*, 3: 211–350.
- Van der Gucht K., Sabbe K., De Meester L., Vloemans N., Zwart G., Gillis M., Vyverman W. 2001 – Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes – *Environ. Microbiol.* 3: 680–690.
- Van der Gucht K., Vandekerckhove T., Vloemans N., Cousin S., Muylaert K., Sabbe K., Gillis M., Declerck S., De Meester L., Vyverman W. 2005 – Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure – *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 205–220.
- Vandermere J.H. 1972 – Niche theory – *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 3: 107–132.
- Van Valen L. 1976 – Ecological species, multispecies, and oaks – *Taxon*, 25: 233–239.
- Walochnik J., Michel R., Aspöck H. 2002 – Discrepancy between morphological and molecular biological characters in a strain of *Hartmannella vermiformis* Page 1967 (Lobosea, Gymnamoebia) – *Protistology*, 2: 185–188.
- Waples R.S. 1991 – Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of “species” under the Endangered Species Act – *Mar. Fish. Rev.* 53: 11–22.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler P., Krichevsky M.I., Moore L.H., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P., Trüper H.G. 1987 – Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463–464.
- Weisse T. 2003 – Pelagic microbes – Protozoa and the microbial food web (In: The lakes handbook, Vol. 1, Eds: P. O’Sullivan, C.S. Reynolds) – Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 417–460.
- Weisse T., Karstens N., Meyer V.C.M., Janke L., Lettner S., Teichgräber K. 2001 – Niche separation in common prostome freshwater ciliates: the effect of food and temperature – *Aquat. Microb. Ecol.* 26: 167–179.
- Weisse T., Lettner S. 2002 – The ecological significance of intraspecific variation among freshwater ciliates – *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28: 1880–1884.
- Weisse T., Montagnes D.J.S. 1998 – Effect of temperature on inter- and intraspecific isolates of *Urotricha* (Prostomatida, Ciliophora) – *Aquat. Microb. Ecol.* 15: 285–291.
- Weisse T., Rammer S. 2006 – Pronounced ecophysiological clonal differences of two common freshwater ciliates, *Coleps spetai* (Prostomatida) and *Rimostrombidium lacustris* (Oligotrichida), challenge the morpho-species concept – *J. Plankton Res.* 27: 55–63. (<http://www.doi.org/10.1093/plankt/fbi100>).
- Weisse T., Stadler P., Lindström E.S., Kimmance S.A., Montagnes D.J.S. 2002 – Interactive effect of temperature and food concentration on growth rate: A test case using the small freshwater ciliate *Urotricha farcta* – *Limnol. Oceanogr.* 47: 1447–1455.
- Whitfield J. 2005 – Biogeography: Is everything everywhere? – *Science*, 310: 960–961.
- Whittaker R.H., Grogan D.W., Taylor J.W. 2003 – Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic Archaea – *Science*, 299: 925–926.
- Whittaker R.H. 1970 – Communities and ecosystems – Macmillan, New York, 162 pp.
- Williams P.J. le B. 1981 – Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web – *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* 1: 1–28.

- Wilson O.E. 1992 – *The Diversity of Life* – Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 432 pp.
- Wu Q.L., Boenigk J., Hahn M.W. 2004 – Successful predation of filamentous bacteria by a nanoflagellate challenges current models of flagellate bacterivory – *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 332–339.
- Wu Q.L., Hahn M.W. 2006 – Differences in structure and dynamics of Polynucleobacter communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels – *FEMS Microbiol. Ecol.* 57: 67–79.
- Yannarell A.C., Triplett E.W. 2004 – Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: Investigations using multiple spatial scales – *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 214–223.
- Zwart G., Crump B.C., Kamst-van-Agterveld M.P., Hagen F., Han S.-K. 2002 – Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers – *Aquat. Microb. Ecol.* 28: 141–155.
- Zwisler W., Selje N., Simon M. 2003 – Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake – *Aquat. Microb. Ecol.* 31: 211–225.

(Received after revising December 2005)

Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution

Thomas Weisse¹ and Peter Stadler

Institute for Limnology of the Austrian Academy of Sciences, Mondseestr. 9, A-5310 Mondsee, Austria

Abstract

We investigated the effect of pH on growth, cell volume, and production of the freshwater ciliates *Urotricha farcta*, *U. furcata*, and *U. castalia* in laboratory cultures with *Cryptomonas* sp. as food. Overall, pH had a significant, species-specific effect on all parameters investigated. The food alga, *Cryptomonas* sp., showed a wide pH tolerance, with positive growth rates between pH 4.4 and pH 9.65. Among the ciliates, *U. farcta* was the most pH-tolerant and *U. castalia* was the most pH-sensitive species, with positive growth being confined to pH 6.5–8.2. The pH optimum was derived from cellular production rates. The pH optima of the three ciliate species were shifted; their production rates peaked at pH 4.4–5.3 (*U. farcta*), pH 5.9–7.3 (*U. furcata*), and pH 6.8–7.9 (*U. castalia*). The pH effect on growth and survival of the ciliates was minor at circumneutral and moderately alkaline pH values, relative to the effect of temperature and food measured in earlier experiments. The widths of the pH tolerances of the ciliates were positively related to the widths of their temperature niches and to their natural distributions. *U. farcta* and *U. furcata* were characterized as euryoecious species, with broad pH and temperature tolerances and ubiquitous distribution; *U. castalia* is a rare, stenoecious species, requiring specific pH and temperature conditions.

pH is a major environmental factor of aquatic ecosystems at the interface of physicochemical and biological processes. It is regulated by carbonate equilibrium, both in the ocean and in most inland waters, and is impacted by biological processes such as photosynthesis and respiration. Although pH is relatively constant in the ocean, 8 ± 0.5 (Lalli and Parsons 1993), it varies between <2 and 12 in lakes and rivers (Wetzel 2001), in close relation to the geology (rock type) and hydrology of their drainage basins. Weathering of soils and rocks primarily controls the ion supply and, thus, the pH of inland waters. The effects of biological processes are less important when comparing the pH across different ecosystems, but may largely control seasonal pH fluctuations within a given water body. Biologically-driven seasonal variation in temperate, moderately-productive and moderately-hard-water lakes is typically ≤ 1 pH unit (e.g., BfW 2002). Larger pH fluctuations, up to >2 pH units, occur in lakes where the buffering capacity of the carbonate system is less efficient, in highly productive small water bodies, and in the littoral zones of shallow lakes with intense primary production (Talling 1976; Krambeck et al. 1994; Edmonson 2005).

Effects of hydrogen ion activity on aquatic biota have received the most attention at the extremes of the pH range; in particular, the impact of lowered pH in poorly buffered waters as a consequence of acidic deposition was studied in great detail in Northern Europe and North America during the closing decades of the last century (Schindler 1988; Battarbee 1990; Charles 1991). Similarly, interdisciplinary

studies investigated the impact of acid mine drainage on aquatic communities (Geller et al. 1998). As a result of those efforts, the general reduction of species diversity with decreasing pH and the tolerance limits for low pH are known for major aquatic taxa such as fish, zooplankton, and algae (Schindler 1988; Baker and Christensen 1991). Algal taxa with solid cell walls, such as diatoms and chrysophytes, are used by paleolimnologists to infer the natural and man-made changes of pH in lakes over the past 10,000 years (Smol et al. 1986; Psenner and Schmidt 1992). With the exception of the pioneering work by Beaver and Crisman in Florida lakes (Beaver and Crisman 1981; Bienert et al. 1991), protozoa, although they are important components of all aquatic food webs (Sherr and Sherr 1984; Laybourn-Parry 1992; Weisse 2003) and may dominate at low pH (Packroff 2000), were largely neglected in the previous investigations cited above. Beaver and Crisman (1981) reported a shift in the taxonomic composition of ciliates with decreasing pH, with oligotrichs becoming the dominant group at pH <5 . A recent review concluded that Prostomatida, Hypotricha, and Peritricha are the dominant ciliate orders in acidic lakes (Packroff 2000).

Although there is some evidence for species-specific pH tolerance of planktonic freshwater ciliate species, primarily originating from cursory field measurements (compiled by Foissner et al. 1999), an experimental laboratory investigation of the pH reaction norm of common species is still lacking. Temperature, food, and predators are assumed to control the population dynamics of natural ciliate communities (Fenchel 1987; Laybourn-Parry 1992; Weisse 2003) and are responsible for niche partitioning among sympatric, closely related taxa (Weisse et al. 2001). The significance of pH for the occurrence and competitiveness of planktonic freshwater ciliates is virtually unknown. This may result from the assumption that daily and seasonal

¹ Corresponding author (thomas.weisse@oeaw.ac.at).

Acknowledgments

We thank Ulrike Scheffel and Nicole Laufenstein for technical assistance. Jens Boenigk, Martin Hahn, and two anonymous reviewers provided helpful comments on an earlier version of this manuscript.

fluctuations in pH are minor, relative to those of temperature and biological interactions. However, pH fluctuations by 1–2 units imply 10- to 100-fold changes in free hydrogen ion activity. It is well known that hydrogen ion concentration gradients affect many transport processes across cellular membranes and metabolic functions in the cytoplasm and cellular organelles (Anderson 1988; Prescott et al. 2002). Further, pH has a strong impact on the solubility, bioavailability, and toxicity of ammonium/ammonia, iron, aluminum, and some other heavy metals (Anderson 1988; Wetzel 2001). Physiological mechanisms and adaptations to withstand fluctuating pH have been studied in some protist species (e.g., Knitt and Herschlag 1996; Davis et al. 1998). Irrespective of the specific cellular strategy for coping with changing pH, to maintain a stable pH gradient under fluctuating external hydrogen ion concentrations requires energy that is unavailable for anabolic processes. It is, therefore, likely that pH changes affect the growth rates of aquatic protists negatively. This effect has already been demonstrated at high pH for several marine protist species (Hansen 2002; Pedersen and Hansen 2003) and for some freshwater algae, mainly at low pH (Gerloff-Elias et al. 2005 and references therein).

The present study investigated the pH reaction norm of ecologically contrasting planktonic freshwater ciliates under standard laboratory conditions. We chose two common and one rare small species of the genus *Urotricha* (Foissner et al. 1999; Weisse et al. 2001) to test for interspecific differences among closely related ciliates. The common species *U. furcata* and *U. farcta* seem to be tolerant of a wide range of pH values; these and/or morphologically similar small *Urotricha* species were recorded in lakes at pH <2 to >9 (Foissner et al. 1999; Packroff 2000; Packroff and Woelfl 2000). Little is known of the ecology of the third species, *U. castalia* (Weisse et al. 2001). Our investigation had two goals: first, we tested the hypothesis that the pH tolerance of the species would be related to their occurrence and distribution, i.e., that the two ubiquitous species would have broader pH reaction norms than the rare species; second, we wanted to assess the extent of minor pH fluctuations in the circumneutral and moderately alkaline range on the growth and production rates of the respective species. The latter aimed at evaluating the potential significance of temporal and spatial pH fluctuations in the natural environment, relative to the effects of temperature and food known from earlier experiments with the same species (Weisse and Montagnes 1998; Weisse et al. 2001, 2002).

Material and methods

Study organisms—All protist species investigated in this study have been reared in our laboratory as nonclonal, nonaxenic batch cultures for several years. Ciliate stock cultures were maintained in modified Woods Hole Medium (MWC; UKNCC 2001) on a 12 : 12 light : dark (LD) cycle at an irradiance of 30–40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 15 \pm 1°C. The small cryptophyte *Cryptomonas* sp. (SAG strain No. 26.80, provided by the Culture Collection of Algae in Göttingen, Germany) served as food. Earlier experiments

with the same combination of ciliates and food investigated the effect of temperature and food on growth and survival of the ciliates (Weisse and Montagnes 1998; Weisse et al. 2001, 2002).

The strain of *Urotricha furcata* Schewiakoff 1893 used in this study was isolated from surface waters of Lake Schöhsee, northern Germany, during summer 1995. *U. farcta* Claparède and Lachmann 1859 was isolated from the littoral zone of the same lake in spring 1996. *Urotricha castalia* Muñoz, Téletz, and Fernandez-Galiano 1987 is the largest of the 3 prostome ciliate species investigated. The species was first described by Muñoz et al. (1987) from an artificial Spanish pond and was redescribed by Foissner and Pfister (1997) with material provided by H. Müller from Lake Constance. This isolate was also used in the present study. With a maximum length of 42 μm of Lugol's-fixed cells, *U. castalia* is the largest of the three *Urotricha* species investigated (Table 1). The pH in all ciliate stock cultures ranged from 7.4 to 8.1.

pH measurements—pH was measured using a microprocessor pH-mV meter (model pH 526, WTW) to the nearest 0.01 unit. The pH sensor was two-point calibrated with standard buffer solutions of pH = 6.87 and pH = 9.18 prior to each series of measurement. The pH in each experimental flask was adjusted by the addition of 0.1 mol L⁻¹ NaOH or HCl.

Experimental design—Experiments were carried out in 50-mL culture tissue flasks in dim light (10–30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under a 14 : 10 LD cycle. Experimental volume in each flask was 40 mL. Experimental temperature was 15 \pm 0.2°C. The food and ciliate species were stepwise acclimated to the experimental conditions over a period of 2–5 d; the longest period was applied at the extremes of the pH range. We used this acclimation period to render this study comparable to earlier experimental investigations with the same ciliate and algal species (Weisse et al. 2001, 2002). At the beginning of each experiment, algae were diluted with MWC medium and distilled water to yield saturating food concentrations for the ciliates (60,000–110,000 cells mL⁻¹; Weisse et al. 2001, 2002). Between 2 and 20 mL of the acclimated ciliate cultures were added to yield initial ciliate levels of 100–500 cells mL⁻¹. Each pH experiment was run in triplicate. Containers with the same algal levels and pH but without ciliates served as controls.

The experimental duration was 24 h; pH was measured in each flask at 0, 3, 6, 12, and 24 h after the beginning of the experiment. If the pH differed by more than 0.2 from the target pH, it was adjusted by addition of small amounts (15–35 μL) of 0.1 mol L⁻¹ NaOH or HCl. At pH <6, small amounts (3–5% final concentration, vol/vol) of sterilized soil and peat extract were added as buffer. Preliminary experiments with an oligotrich ciliate species had shown that this addition stabilizes the pH without negatively affecting the food algae (Weisse et al., unpubl.). Algal abundance in each container was measured at the beginning and end of each experiment in unfixed samples with an electronic particle counter (CASY® 1-Model TTC, Schärfe System) and in formalin-fixed samples by flow

Table 1. Range of cell length, pH tolerance, and pH optimum of *Cryptomonas* sp. and three *Urotricha* species (n denotes number of Lugol's-fixed cells measured for size; cell length of *Cryptomonas* sp. was measured over the pH range 5.1–9.3).

Species	Cell length (μm)	n	pH tolerance	pH optimum
<i>Cryptomonas</i> sp.	9.9–16.4	140	4.4–9.65	5.8–8.1
<i>Urotricha farcta</i>	13.2–28.3	1,050	4.1–9.5	4.4–5.3
<i>Urotricha furcata</i>	11.1–25.2	900	5.4–9.2	5.9–7.3
<i>Urotricha castalia</i>	18.7–42.0	600	6.5–8.2	6.8–7.9

cytometry (FCM; FACSCalibur, Becton Dickinson Austria; Weisse et al. 2002). Samples for ciliates were taken at the beginning and end of each experiment and fixed with acid Lugol's.

Analyses and calculation of experimental results—The average pH in each experimental flask was estimated from the logarithms of the reciprocals of the concentration of free hydrogen ions measured at 0, 3, 6, 12, and 24 h after the beginning of the experiment, i.e., from log pH, and subsequent power transformation. Ciliate cell numbers were measured microscopically using a Sedgewick Rafter cell (1 mL volume) or settling chambers of 3 mL volume. Algal concentrations were also measured in some of these samples to check for the precision of the electronic and optical (FCM) cell count measurements. Cell volume of ciliates was determined from length and width measurements of Lugol's-fixed material, assuming a prolate spheroid shape with circular cross-section. Measurements were made on 50 ciliates obtained at the end of the experiment from each experimental series at a given pH, using an inverted microscope and an image analysis system (LUCIA version 4.51, Laboratory Imaging Ltd.). Subsamples for the ciliate size measurements were pooled if pH differed by <0.05 units.

Algal and ciliate population growth rates were determined from end-point measurements of cell numbers, assuming exponential growth over the experimental period according to

$$\mu = \ln(N_t/N_0)/t \quad (1)$$

where N_0 and N_t are algal or ciliate numbers at the beginning and end of the experiment, respectively; μ (d^{-1}) is the intrinsic rate of increase; and t is the duration of the experiment. Ciliate production ($\mu\text{m}^3 \text{d}^{-1}$) was calculated as the product of growth rate (μ) and the corresponding cell volume.

A second order polynomial regression of the form $y = y_0 + ax + bx^2$ (Eq. 2) was used to fit the curves of the ciliate growth and volume response versus pH. If the shape of the curves was inadequately represented by the second order polynomial regression, least-squares linear regression and Student's t -test were used to analyze differences within a given species. All statistical analyses were performed with SigmaStat for Windows, version 2.03 (SPSS Inc., Chicago).

Results

pH effect on Cryptomonas sp.—Our investigation of the pH impact on the ciliates was limited by the pH tolerance

of their prey. We therefore report the response of *Cryptomonas* sp. to pH measured in the control bottles without ciliates first. *Cryptomonas* sp. showed positive population growth rates over a wide pH range, from 4.4 to 9.65 (Fig. 1A). The cell volume of the algae remained constant over the same pH range (Fig. 1B); it increased rapidly at pH <4.4. Visual inspection under the microscope revealed that the cells looked inflated under highly acidic conditions. Cells died quickly at pH >10, and it was impossible to accurately estimate growth rate and cell volume under highly alkaline conditions.

pH effect on growth rates of Urotricha spp.—Among the 3 *Urotricha* species investigated, population numbers of *U. farcta* increased over the widest pH range (4.1–9.5) and reached the highest maximum growth rates (μ_{max}), 1.8 d^{-1} at pH 5.2 (Fig. 2A). Average growth rates of this species at its pH optimum (pH 4.4–5.3, Table 1) were $1.41 \pm 0.29 \text{ d}^{-1}$, i.e., significantly higher (Student's t -test, $p < 0.01$) than at pH 6.0–8.0 ($1.00 \pm 0.34 \text{ d}^{-1}$). From pH 6.3 to pH 9.4, growth rate declined linearly ($\mu = 3.042 - 0.281 \text{ pH}$, $r^2 = 0.613$, $n = 25$, $p < 0.001$; Eq. 3). Positive population growth of *U. furcata* was confined to the pH range of ~5.4–9.2 (Fig. 2B); highest growth rates of ~0.6 d^{-1} were measured between pH 6.0 and pH 7.0. Mean growth rates in this range ($0.43 \pm 0.10 \text{ d}^{-1}$) were significantly higher than at pH 7.5–8.1 ($0.24 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$). As with *U. farcta*, growth rates declined linearly between pH 7.0 and 9.2 ($\mu = 1.562 - 0.168 \text{ pH}$, $r^2 = 0.650$, $n = 20$, $p < 0.001$; Eq. 4). The largest species investigated, *U. castalia*, grew over a narrow pH range only, from pH 6.5 to pH 8.2 (Fig. 2C). Its growth rates peaked at pH 6.9–7.2; μ_{max} of *U. castalia* was close to 0.4 d^{-1} .

The shape of the pH response curves of all three species was irregular and difficult to model. A second-order polynomial regression yielded, in each case, the best curve fit (data not shown), but left 29% (*U. farcta*) to 44% (*U. castalia*) of the variance of the ciliate growth rates unexplained. In particular, the second-order polynomial regressions did not adequately model the linear part of the growth curve of *U. furcata* (Fig. 2B), and the peak of the growth rate of *U. castalia* (Fig. 2C).

pH effect on cell volume of Urotricha spp.—Cell volume of all 3 *Urotricha* species peaked close to the pH at which each species' respective μ_{max} was recorded (Fig. 3), but we did not measure a significant overall relationship between μ and cell volume in any of the species. A second-order polynomial regression (Eq. 2) yielded a significant association between pH and cell volume for *U. farcta* (Fig. 3A)

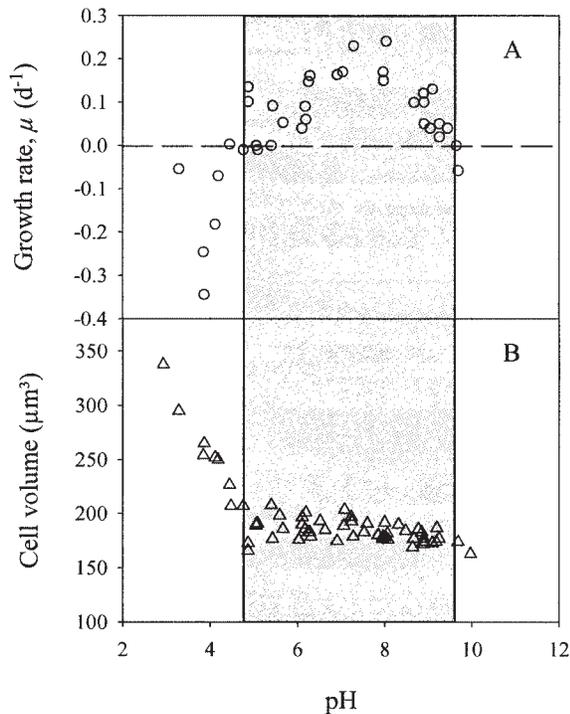


Fig. 1. (A) Population growth rate, μ , and (B) cell volume of *Cryptomonas* sp. versus pH. The shaded area indicates the pH range in which positive population growth was measured.

and *U. furcata* (Fig. 3B), whereas the fit was insignificant for *U. castalia* (Fig. 3C). The relative pH impact on cell volume was highest in *U. furcata*; its mean volume varied by a factor of 3, whereas relative differences in the cell volumes of the other two species were <1.5 . The cell sizes of *U. farcta* ($2,600 \pm 560 \mu\text{m}^3$) and *U. furcata* ($2,020 \pm 230 \mu\text{m}^3$) overlapped in the circumneutral range, but they were significantly different at $\text{pH} < 6$ and > 8 (Student's *t*-test, $p < 0.01$).

Our volume and production estimates are conservative estimates, because Lugol's fixation may underestimate live volume by 30% (Jerome et al. 1993; Müller and Geller 1993).

pH effect on cell production of Urotricha spp.—Cellular production illustrates the combined pH effect on growth rates and cell volume of *Urotricha* spp. Figure 4 shows mainly positive production rates for the 3 species, i.e., over the pH range in which their respective growth rates were positive (cf. Fig. 2). Therefore, and because cells from the growth rate versus pH experiments were pooled for the size measurements, there are fewer data points in Fig. 4 than in Fig. 2. In *U. castalia*, we included the slightly negative production rates measured at pH 6.7 and pH 8.3 to illustrate more clearly the drastic decline at both sides beyond the pH optimum (Fig. 4C). If the pH optimum is defined as the range at which production is $>80\%$ of the maximum production, the pH optima of the three *Urotricha* species (shaded areas in Fig. 4) overlap not at all (*U. farcta* vs. *U. furcata* and *U. castalia*) or only little

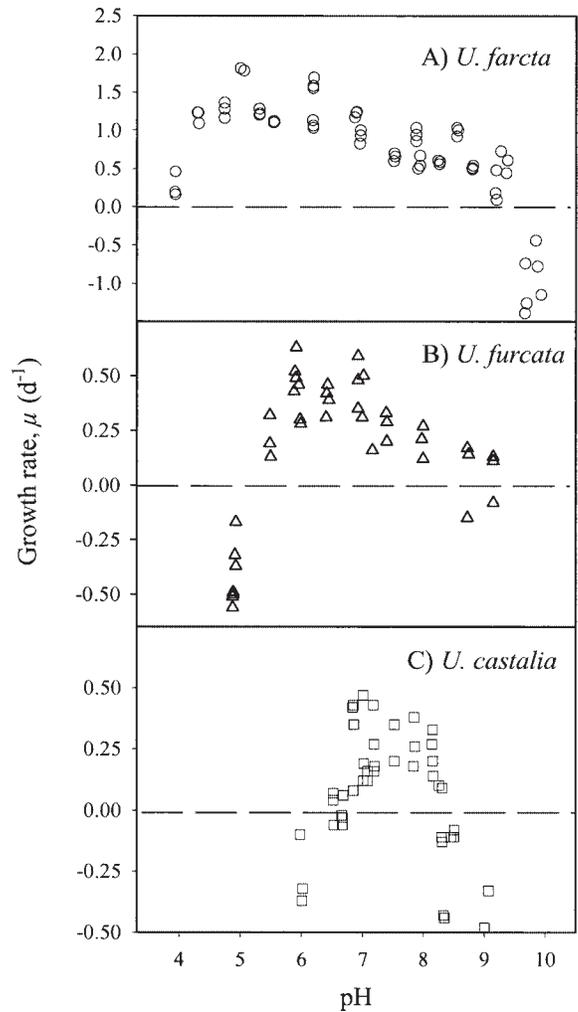


Fig. 2. Population growth rate, μ , of three *Urotricha* species versus pH. (A) *U. farcta*, (B) *U. furcata*, and (C) *U. castalia*.

(*U. furcata* vs. *U. castalia*). For *Cryptomonas* sp., the pH optimum thus defined ranged from 5.8 to 8.1 (Table 1).

Discussion

Methodological constraints—acclimation and food quality may affect species-specific physiological response to changing pH—It appears obvious that we have not covered the full ranges of pH tolerance, i.e., the fundamental pH niches of the species in our experiments. This is primarily because we used only one food species at particular light, temperature, and medium conditions. More research with different food and experimental conditions is needed before the in situ pH responses of the respective species can be predicted based on an empirical model. We can rule out that food limitation was responsible for declining ciliate growth rates, because, in all experiments, the food concentration was kept at the saturation range known for each species from previous experiments (Weisse et al. 2001, 2002). Furthermore, growth rates of all three ciliate species measured in the present study were not different from earlier results obtained with the same species under

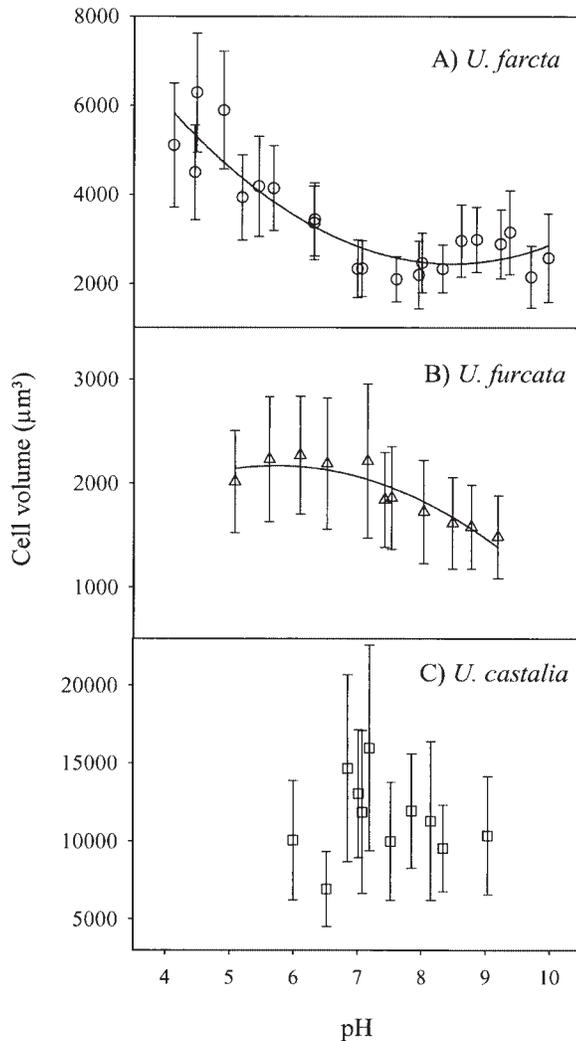


Fig. 3. Mean cell volume of three *Urotricha* species versus pH. Error bars denote 1 SD. Solid lines in (A) and (B) indicate the fit to a nonlinear polynomial regression (see text). (A) *U. farcta*, (B) *U. furcata*, and (C) *U. castalia*.

comparable experimental conditions (Weisse et al. 2001, 2002).

We measured the impact of pH on population growth rate because, in asexually reproducing protists, increase in cell numbers may be used as a proxy for Darwinian fitness. The pH response might have been affected by long-term adaptation in the laboratory, because the pH in our stock cultures usually varies between 7.6 and 7.9. Similarly, longer acclimation to the experimental conditions may expand the pH tolerance and/or yield somewhat higher growth rates at the extremes of the pH range. The shift in the pH optimum of *U. farcta* and, less obviously, of *U. furcata* towards acidic conditions (Table 1) illustrates, however, that adaptation and acclimation cannot explain the pH reaction norm of these species.

The physiological mechanisms by which the protist species maintained internal (cytoplasmic) pH homeostasis under changing external pH were beyond the scope of this study. If the ability to regulate cell size is taken as a crude

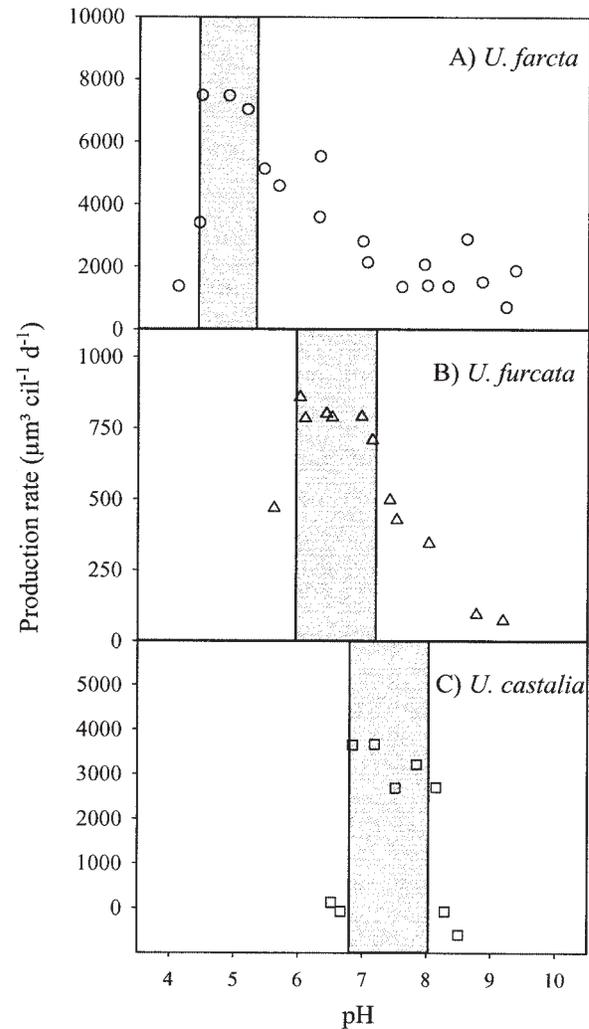


Fig. 4. Cellular production rate of three *Urotricha* species versus pH. The shaded area indicate the pH optimum at which production reached >80% of the respective maximum. (A) *U. farcta*, (B) *U. furcata*, and (C) *U. castalia*.

indicator of pH stress, species-specific differences between the ciliates and their prey become apparent. The food alga, *Cryptomonas* sp., kept its cell size constant and small over a wide range (pH 4.5–9.6, Fig. 1), i.e., relatively high growth rates were associated with small cell size. The constant cell size does not necessarily imply that food quality did not change, because algal growth rates varied over this range. The pH responses of the ciliates were most likely determined by a combination of direct pH effects and indirect effects through the nutritional quality of their food.

In the two smaller of the three ciliate species investigated, cell volume was significantly affected by pH changes, whereas there was no significant pH effect on the cell size of *U. castalia*. The data basis of our study is, however, too limited, and the scattering around the mean intrinsically too high in cell volume, to reveal any more statistically significant effects between pH tolerance and cell size. The high standard deviation of cell volume results from the fact that in actively growing protist populations

there are always large, “old” cells present, ready to divide, and small, “young” cells that have just completed cell division. The relative pH effect on cell volume was twice as high in *U. farcta* as in their congeners (Fig. 3), indicating species-specifically different regulatory processes.

We used one nonclonal isolate for each species in this study; recent evidence suggests that intraspecific ecophysiological differences may be pronounced in ciliates and other protists (Weisse and Montagnes 1998; Weisse 2003; Weisse and Rammer 2006). Our own preliminary experiments with several clones of an oligotrich freshwater ciliate under comparable experimental conditions as used in the present study revealed intraspecific differences in the pH reaction norm by up to 0.5 pH units (Weisse et al. unpubl. data). The pH tolerance of the three *Urotricha* species reported in this study (Table 1) may therefore be expanded if several clonal cultures of each species obtained from different environments are measured.

The significance of pH as an environmental factor for freshwater ciliates—To our knowledge, ours is the first experimental study that reports the pH reaction norm not only of three small *Urotricha* species, but of any ecologically relevant freshwater ciliate. The pH tolerance of planktonic ciliates and other free-living protists is poorly documented in the literature, although it has been known for a long time that pH is an important physicochemical environmental parameter affecting ciliate species composition and species richness (Noland 1925; Lackey 1938; Doflein and Reichenow 1949). Similar to investigations on the pH effect on metazoans and at the ecosystem level (Schindler 1988; Charles 1991), the impact of pH on protists has been studied primarily at the extremes, such as in acid mining drainages, humic lakes, or soda lakes (Laybourn-Parry 1992; Packroff 2000). With some remarkable exceptions (Anderson 1988), the ecological impact of pH on freshwater protists has been largely neglected in recent textbooks and reviews (e.g., Fenchel 1987; Laybourn-Parry 1992).

To some extent, our results seem to support the view of little ecological significance of hydrogen ion concentration for freshwater protists. At circumneutral and moderately alkaline pH values, which are characteristic of most natural fresh waters, the effect of pH on *Cryptomonas* and the three prostome ciliate species investigated was minor. All species showed positive growth rates at pH values ranging from 6.5 to 8 (Table 1). We used *U. farcta* as a model organism to evaluate the potential significance of seasonal pH changes in the natural environment on growth rates of planktonic ciliates, relative to the effect of seasonally fluctuating temperature and food levels. An increase in pH from 7.4 to 8.4 reduced mean growth rates of this species from 0.96 d^{-1} to 0.68 d^{-1} . Previous investigations in our laboratory with the same ciliate and food alga revealed that the growth rate of *U. farcta* declined from 2.95 d^{-1} at 24°C to 0.04 d^{-1} at 5°C (Weisse et al. 2001) and from 1.67 d^{-1} at a food concentration of 1 mg C L^{-1} to 0.61 d^{-1} at 0.05 mg C L^{-1} (measured at 18°C , Weisse et al. 2002). These are the ranges of seasonal variation of pH, temperature, and food levels typically encountered in Lake Schöhsee and other meso-

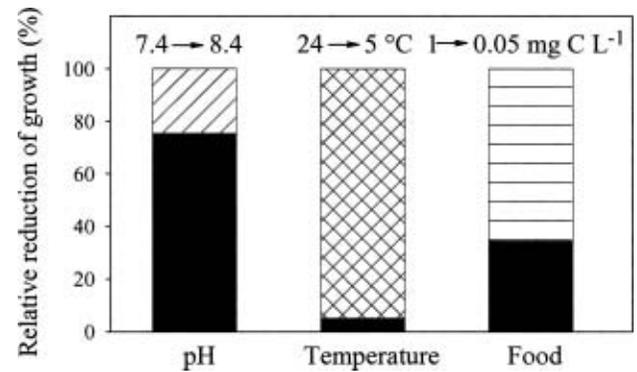


Fig. 5. The effect of pH, temperature, and food on growth rates of *Urotricha farcta*. The solid bars indicate the relative reduction of growth from near-optimal (hatched bars, growth = 100%) to suboptimal conditions for the three variables; the shift of each environmental factor from near-optimal to suboptimal conditions is given on top of the respective bars.

trophic, temperate, hard-water lakes where *U. farcta* is prominent (Foissner et al. 1999). The relative effects of these environmental variables on growth rates of *U. farcta* are illustrated in Fig. 5. In each case, ciliate cell numbers predicted from Eq. 1 after 24 h under less favorable environmental conditions (i.e., pH = 8.4, T = 5°C , food = 0.05 mg C L^{-1}) were compared to ciliate cell numbers obtained under more favorable or near-optimum conditions (pH = 7.4, T = 24°C , food = 1 mg C L^{-1}). To render the results comparable, the impact of the three environmental variables is expressed in terms of percentage reduction of growth under the suboptimal conditions. It is obvious that the potential effect of seasonal pH changes is minor relative to that of temperature and food (Fig. 5).

This general conclusion holds true for ciliates with a wide pH tolerance, such as *U. farcta* and *U. furcata*. Note that for pH-sensitive species, such as *U. castalia*, pH may limit their distribution in many inland waters. The ciliate fauna has been investigated in detail in north German Lake Plußsee (Reck 1987), which is located less than 3 km from Lake Schöhsee, and from which two of the three ciliate species used in this study had been isolated. Seasonal changes of the ciliate community were not studied in Lake Schöhsee. In contrast to the latter and most other lakes in the Schleswig-Holstein area, Lake Plußsee is less strongly buffered by the carbonate system, and seasonal pH changes are, therefore, wider, ranging from 7.3 to 9.5 in the epilimnion (Reck 1987; Krambeck et al. 1994). In accordance with the experimental results of the present study, *U. farcta* was the only *Urotricha* species that was recorded during all seasons in Lake Plußsee, whereas *U. castalia* was not found (Reck 1987). In prealpine Lake Mondsee, where all three *Urotricha* species occur (Foissner and Weisse unpubl. data), seasonal changes in pH are confined to the range 7.6–8.5 (BfW 2002).

The pH niches of Urotricha spp.—Relative to the other two species, *U. castalia* had a narrow niche width, with positive growth rates limited to the circumneutral range. In contrast to this stenoeicous species, both *U. farcta* and *U.*

furcata are euryoecious species with a wide pH tolerance. Similar to the effect of temperature (Weisse et al. 2002), the highest growth rates of ciliates measured under saturating food conditions may not necessarily indicate their pH optima. We suggest the use of cellular production, which includes the pH effect on cell volume, to characterize the pH optimum of the various ciliate species. According to the pH optima thus defined, *U. castalia* and *U. furcata* are neutrophil species, whereas *U. farcta* is an acidophil species (e.g., Prescott et al. 2002). Similar to the effect of temperature investigated earlier (Weisse et al. 2001), *U. farcta* was the most competitive of the three *Urotricha* species with respect to the effect of pH; it not only tolerated the widest pH range of all three *Urotricha* species, but also showed the highest growth rates at all pH levels investigated. The results of the present study expand the pH range of *U. farcta* hitherto reported in the literature (6.4–9.2, Foissner et al. 1999). According to our results, *U. farcta* is a candidate species to be encountered in acidic lakes. Note, however, that the species identity of small *Urotricha* species recorded from highly acidic water bodies (pH <3) remained, in most cases, obscure (Packroff 2000; Packroff and Woelfl 2000).

In conclusion, the extent of pH tolerance was positively correlated to the occurrence and distribution of the species, i.e., the two common species were pH-tolerant and the rare species was pH-sensitive. The pH tolerance may thus limit the distribution of ciliate species across freshwater ecosystems with widely different pH. The relative tolerance towards temperature and pH were coupled, declining in the order *U. farcta* > *U. furcata* > *U. castalia*. Further research is needed to reveal whether this coupling between temperature and pH tolerance is a general trait of planktonic ciliates.

References

- ANDERSON, O. R. 1988. Comparative Protozoology. Springer.
- BAKER, J. P., AND S. W. CHRISTENSEN. 1993. Effects of acidification on biological communities in aquatic ecosystems, p. 861–874. In D. F. Charles [ed.], Acidic deposition and aquatic ecosystems: Regional case studies. Springer.
- BATTARBEE, R. W. 1990. The causes of lake acidification, with special reference to the role of acid deposition. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B **327**: 339–347.
- BEAVER, J. R., AND T. L. CRISMAN. 1981. Acid precipitation and the response of ciliated protozoans in Florida lakes. Verh. Int. Ver. Limnol. **21**: 353–358.
- BIENERT, R. W., J. R. BEAVER, AND T. L. CRISMAN. 1991. The contribution of ciliated protozoa to zooplankton biomass in an acidic, subtropical lake. J. Protozool. **38**: 352–354.
- [BfW] BUNDESAMT FÜR WASSERWIRTSCHAFT. 2002. Die Wassergüte ausgewählter Seen des oberösterreichischen und steirischen Salzkammergutes. Schriftenreihe des Bundesamtes für Wasserwirtschaft, Band 15, Wien.
- CHARLES, D. F. 1991. Acidic deposition and aquatic ecosystems: Regional case studies. Springer.
- DAVIS, D., J. FIEKERS, AND J. L. VAN HOUTEN. 1998. Intracellular pH and chemoresponse to NH₄⁺ in *Paramecium*. Cell Motil. Cytoskelet. **40**: 107–117.
- DOPLEIN, F., AND E. REICHENOW. 1949. Lehrbuch der Protozoenkunde. Fischer.
- EDMONSON, W. T. 2005. Lake Washington, p. 96–116. In P. E. O'Sullivan and C. S. Reynolds [eds.], The lakes handbook. V. 2. Blackwell.
- FENCHEL, T. 1987. Ecology of protozoa. The biology of free-living phagotrophic protists. Science Tech/Springer.
- FOISSNER, W., H. BERGER, AND J. SCHAUMBURG. 1999. Identification and ecology of limnetic plankton ciliates. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft 3/99. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft.
- , AND G. PFISTER. 1997. Taxonomic and ecologic revision of urotrichs (Ciliophora, Prostomatida) with three or more caudal cilia, including a user-friendly key. Limnologica **27**: 311–347.
- GELLER, W., H. KLAPPER, AND W. SALOMONS [EDS.]. 1998. Acidic mining lakes: Acid mine drainage, limnology and reclamation. Springer.
- GERLOFF-ELIAS, A., E. SPIJKERMAN, AND T. PRÖSCHOLD. 2005. Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from an extremely acid lake (pH 2.6). Plant Cell Environ. **28**: 1218–1229.
- HANSEN, P. J. 2002. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. Aquat. Microb. Ecol. **28**: 279–288.
- JEROME, C. A., D. J. S. MONTAGNES, AND F. J. R. TAYLOR. 1993. The effect of the quantitative protargol stain and Lugol's and Bouin's fixatives on cell size: a more accurate estimate of ciliate species biomass. J. Eukaryot. Microbiol. **40**: 254–259.
- KNITT, D. S., AND D. HERSCHLAG. 1996. pH dependencies of the *Tetrahymena* ribozyme reveal an unconventional origin of an apparent pK₂. Biochemistry **35**: 1560–1570.
- KRAMBECK, H.-J., D. ALBRECHT, B. HICKEL, W. HOFMANN, AND H.-H. ARZBACH. 1994. Limnology of the Plußsee, p. 1–23. In J. Overbeck and R. J. Chróst [eds.], Microbial ecology of Lake Plußsee. Ecological studies V. 105. Springer.
- LACKEY, J. B. 1938. A study of some ecological factors affecting the distribution of Protozoa. Ecol. Monogr. **8**: 501–527.
- LALLI, C. M., AND T. R. PARSONS. 1993. Biological oceanography: An introduction. Pergamon.
- LAYBOURN-PARRY, J. 1992. Protozoan plankton ecology. Chapman and Hall.
- MÜLLER, H., AND W. GELLER. 1993. Maximum growth rates of aquatic ciliated protozoa: The dependence on body size and temperature reconsidered. Arch. Hydrobiol. **126**: 315–327.
- MUNOZ, A., C. TÉLLEZ, AND D. FERNÁNDEZ-GALIANO. 1987. Morphology and infraciliature in *Urotricha nais* sp. n. and *Urotricha castalia* sp. n. (Ciliophora, Prorodontida). Acta Protozool **26**: 197–204.
- NOLAND, L. E. 1925. Factors influencing the distribution of freshwater ciliates. Ecology **6**: 437–452.
- PACKROFF, G. 2000. Protozooplankton in acidic mining lakes with special respect to ciliates. Hydrobiologia **433**: 157–166.
- , AND S. WOELFL. 2000. A review on the occurrence and taxonomy of heterotrophic protists in extreme acidic environments of pH values <3. Hydrobiologia **433**: 153–156.
- PEDERSEN, M. F., AND P. J. HANSEN. 2003. Effects of high pH on the growth and survival of six marine heterotrophic protists. Mar. Ecol. Prog. Ser. **260**: 33–41.
- PRESCOTT, L., D. A. KLEIN, AND J. P. HARLEY. 2002. Microbiology. 5th ed. McGraw-Hill.
- PSENNER, R., AND R. SCHMIDT. 1992. Climate-driven pH control of remote alpine lakes and effects of acid deposition. Nature **356**: 781–783.
- RECK, E. M. 1987. Zur Ökologie der pelagischen Ciliaten des Plußsees. Ph.D. thesis, Christian-Albrechts-Univ. Kiel.

- SCHINDLER, D. W. 1988. Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science* **239**: 149–157.
- SHERR, B. F., AND E. B. SHERR. 1984. Role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystems, p. 412–423. *In* M. J. Klug and C. A. Reddy [eds.], *Current perspectives in microbial ecology*. American Society for Microbiology.
- SMOL, J. P., R. W. BATTARBEE, R. B. DAVIS, AND J. MERILÄINEN [EDS.]. 1986. Diatoms and lake acidity. *Developments in hydrobiology*. Dr. W. Junk Publ.
- TALLING, J. F. 1976. The depletion of carbon dioxide from lake water by phytoplankton. *J. Ecol.* **64**: 79–121.
- UKNCC. 2001. Catalogue of the UK national culture collection—list of algae and protozoa. Dunstaffnage Marine Laboratory.
- WEISSE, T. 2003. Pelagic microbes—protozoa and the microbial food web, p. 417–460. *In* P. E. O'Sullivan and C. S. Reynolds [eds.], *The lakes handbook*. V. 1. Blackwell.
- , N. KARSTENS, V. C. M. MEYER, L. JANKE, S. LETTNER, AND K. TEICHGRÄBER. 2001. Niche separation in common prostome freshwater ciliates: The effect of food and temperature. *Aquat. Microb. Ecol.* **26**: 167–179.
- , AND D. J. S. MONTAGNES. 1998. Effect of temperature on inter- and intraspecific isolates of *Urotricha* (Protomatida, Ciliophora). *Aquat. Microb. Ecol.* **15**: 285–291.
- , AND S. RAMMER. 2006. Pronounced ecophysiological clonal differences of two common freshwater ciliates, *Coleps spetai* (Protomatida) and *Rimostrombidium lacustris* (Oligotrichida), challenge the morphospecies concept. *J. Plankton Res.* **28**: 55–63.
- , P. STADLER, E. S. LINDSTRÖM, S. A. KIMMANCE, AND D. J. S. MONTAGNES. 2002. Interactive effect of temperature and food concentration on growth rate: A test case using the small freshwater ciliate *Urotricha farcta*. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 1447–14.
- WETZEL, R. G. 2001. *Limnology—Lake and river ecosystems*. Academic.

Received: 8 November 2005
Accepted: 23 February 2006
Amended: 14 March 2006

Genetic, Morphological, and Ecological Diversity of Spatially Separated Clones of *Meseres corlissi* Petz & Foissner, 1992 (Ciliophora, Spirotrichea)

THOMAS WEISSE,^a MICHAELA C. STRÜDER-KYPKE,^b HELMUT BERGER^c and WILHELM FOISSNER^d

^aInstitute for Limnology of the Austrian Academy of Sciences, 5310 Mondsee, Austria, and

^bDepartment of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada, and

^cConsulting Engineering Office for Ecology, Radetzkystrasse 10, 5020 Salzburg, Austria, and

^dDepartment of Organismic Biology, University of Salzburg, 5020 Salzburg, Austria

ABSTRACT. We investigated the intraspecific variation of the spirotrich freshwater ciliate *Meseres corlissi* at the level of genes (SSrDNA, ITS), morphology (14 characters), and ecophysiology (response to temperature and pH). Five of the eight clonal *M. corlissi* cultures isolated from five localities on four continents were studied at all levels. The null hypothesis was that geographic distance plays no role: *M. corlissi* lacks biogeography. The intraspecific variation was low at the genetic level (0%–4%), moderate at the morphological level (5%–15%), and high at the ecophysiological level (10%–100%). One clone, isolated from subtropical China, differed significantly at all levels from all other clones, suggesting limited dispersal and local adaptation among *M. corlissi*. However, other clones from distant areas, such as Australia and Austria, were genetically identical and differed only slightly in morphology and temperature response. We speculate that our findings may be typical for rare species; the chances may be equally high for both global dispersal of *most* and local adaptation of *some* populations in areas where dispersal has been permanently or temporarily reduced.

Key Words. Biogeography, ciliates, ecophysiology, morphology, phylogeny.

MESERES corlissi is a widely distributed but rare planktonic freshwater ciliate. Trophic cells seem to be restricted to ephemeric habitats and, therefore, short time periods (Gächter and Weisse 2006; Weisse et al. 2007). So far, the species has been recorded from eight localities on five continents (Fig. 1). Ecophysiological investigations of *M. corlissi* have shown significant clonal differences in temperature and pH preference and encystment pattern (Gächter and Weisse 2006; Müller, Foissner, and Weisse 2006; Weisse 2004; Weisse et al. 2007). Morphological studies described high similarity of trophic and cystic specimens from bromelia tanks in the Dominican Republic (DR) and from puddles in Austria (Foissner, Müller, and Weisse 2005; Petz and Foissner 1992). These results raise questions about the extent of genotypic and phenotypic divergence between different clones of *M. corlissi*, and how the variation measured at different levels is interrelated.

It is possible that *M. corlissi* comprises sibling species that account for the ecological differences, as we know from other ciliates, such as *Paramecium aurelia* and *Tetrahymena pyriformis* (Jerome and Lynn 1996; Jerome, Simon, and Lynn 1996; Stoeck et al. 2000). Ciliate identification by molecular methods does not always yield unequivocal results. While some *Tetrahymena* species share identical SSrDNA sequences (Sogin et al. 1986; Strüder-Kypke et al. 2001), the SSrDNA has been proven a suitable molecular marker for species identification in other ciliates. Furthermore, some studies have shown that the SSrDNA of spatially distant populations can be identical (Agatha, Strüder-Kypke, and Beran 2004; Strüder-Kypke et al. 2000), while other studies have found some genetic variation among populations of morphologically identical ciliates (Finlay et al. 2006; Katz et al. 2005; Schmidt, Ammerman, and Schlegel 2006). Foissner, Chao, and Katz (2008) suggest that future studies on those morphospecies will likely lead to the description of several distinct species to account for the observed genetic diversity.

Similar to the analysis of the SSrDNA, varying results were obtained with the ITS region to determine intraspecific variation of ciliate species. Snoeyenbos-West et al. (2002) have shown that there was only minimal clonal divergence within some oligotrich and choreotrich species. Coleman (2005), Barth et al. (2006), and

Wright (1999) reported identical ITS sequences for *Paramecium* and *Isotricha* isolates from distant localities. In contrast, Miao et al. (2004) have found ITS sequences useful for establishing a phylogeography for *Carchesium polypinum* populations in China. Diggles and Adlard (1997) have also shown intraspecific variation in geographic isolates of the marine fish parasite *Cryptocaryon irritans*. With respect to the ongoing discussion about distribution and endemism of ciliate species (summarized in Foissner 2006; Foissner et al. 2008), our goal was a detailed analysis of the intraspecific variation in *M. corlissi* to determine patterns of evolutionary divergence and to infer and explain mechanisms of adaptation that may differ at the various levels of cellular organization (i.e. genes, ultrastructure, physiology, and behavior). We investigated whether clonal differences in molecular, morphological, and ecological features (1) increase with increasing geographical distance and (2) if those differences can be related to the break up of Pangaea into Gondwana and Laurasia. The null hypothesis was that geographic distance plays no role: *M. corlissi* lacks biogeography. Our study integrates, for the first time, molecular (SSrDNA, ITS) features with light microscopical (e.g. number of ciliary rows and of adoral membranelles, size of resting cysts), ultrastructural (e.g. number of cortical microtubules), and ecophysiological (temperature and pH response) characteristics to investigate intraspecific differences in a free-living ciliate.

MATERIALS AND METHODS

Collection of populations. Populations of *M. corlissi* Petz & Foissner, 1992 were collected from five sites representing four continents (Fig. 1). The origin, sampling date, collector/isolator, and GenBank accession number of the clones are summarized in Table 1. Clones AU1, AU2, AU3, and AU5 are from the type locality—soil and mud of an ephemeral meadow puddle in the City of Salzburg, Austria. For further details on sampling sites, see Gächter and Weisse (2006) and Weisse et al. (2007). The populations from soil were isolated with the non-flooded Petri dish method as described in Foissner, Agatha, and Berger (2002).

Cultivation. Clonal cultures for ecophysiological experiments were established and maintained as described by Weisse et al. (2007), with the exception of the DR population where cultures were established from several individuals. All cultures were maintained under controlled light and temperature conditions with the freshwater flagellate *Cryptomonas* sp. as food source. Specimens for the genetic investigations were harvested from exponentially

Corresponding Author: T. Weisse, Institute for Limnology of the Austrian Academy of Sciences, 5310 Mondsee, Austria—Telephone number: 43 6232 312512; FAX number: 43 6232 3578; e-mail: thomas.weisse@oew.ac.at

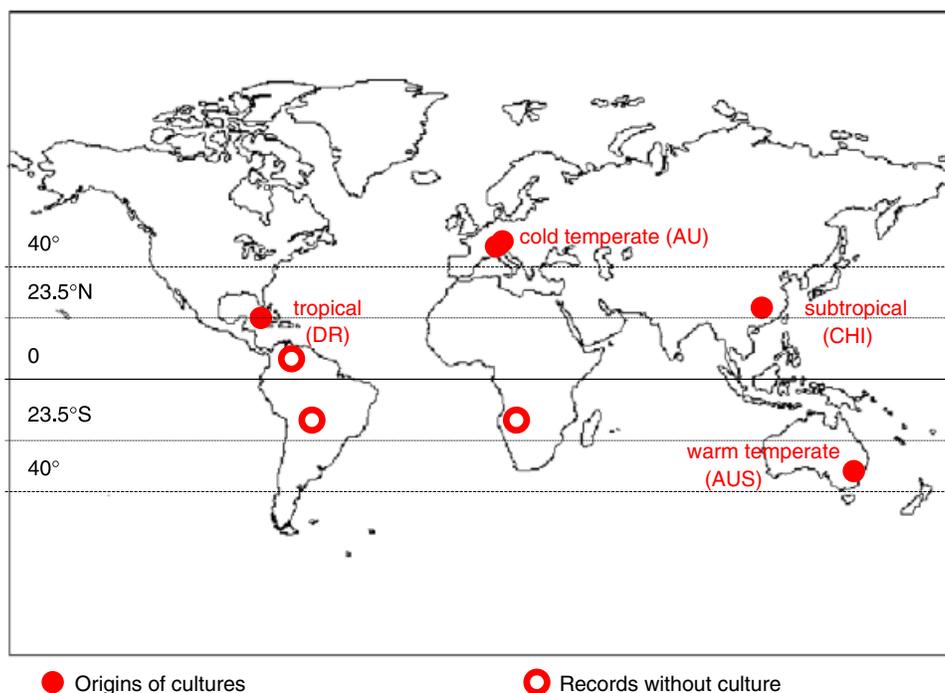


Fig. 1. Map showing records of *Meseres corlissi* (open circles) and origin of the cultures with abbreviations of clones used in this study (closed circles).

growing cultures. Several hundred individual cells of the clones were fixed in 80% ethanol for DNA extraction.

Resting cysts were obtained from old cultures. When sufficient cysts had been formed, the medium was decanted and replaced by Eau de Volvic for 2 wk to be sure to investigate mature cysts. For the other morphological investigations, culturing was modified as described below (under subheading Light microscopy and morphometry).

DNA extraction and sequencing. DNA was extracted either following the protocol of Walsh, Metzger, and Higuchi (1991) as described by Strüder-Kypke and Lynn (2003) using 100 μ l of 5% Chelex[®] 100 (Sigma, Oakville, ON, Canada) or using the MasterPure[™] DNA Purification Kit (Epicentre, Madison, WI). Typically 4–10 μ l of template were used in the subsequent PCR amplifications. PCR amplification of the rRNA genes was performed in a Perkin-Elmer GeneAmp 2400 thermocycler (PE Applied Biosystems, Mississauga, ON, Canada), following the procedure described in Wright, Dehority, and Lynn (1997) and using the universal forward primer A (5'-AACCTGGTTG

ATCCTGCCAGT-3'; Medlin et al. 1988) and the reverse primer C (5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACG-3'; Jerome and Lynn 1996). PCR products were purified using the GeneClean kit (Qbiogen, Carlsbad, CA) and in some cases cloned with the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The cloned products were re-amplified and purified as described above. DNA was sequenced in both directions with a 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, California), using ABI Prism BigDye Terminator (ver. 3.1) and Cycle Sequencing Ready Reaction kit. Usually, the SSrDNA sequence was obtained with three forward and three reverse internal universal SSrDNA primers (Elwood, Olsen, and Sogin 1985), while the ITS region was sequenced using the internal forward primer 1055F (5'-GGTGGTGCATGGCG-3'; Elwood et al. 1985) and reverse primer C.

Sequence availability and phylogenetic analyses. The nucleotide sequences used for our analyses are available from the GenBank/EMBL databases under the following Accession numbers:

Table 1. Sampling data and GenBank Accession numbers for the studied clones of *Meseres corlissi*.

Clone	Sampling date	Origin	Collector/isolator	GenBank Accession number
<i>Meseres corlissi</i>				
DR	Spring 2002	Bromelia tank reservoir, fog rain forest, Santiago, Dominican Rep.	W. Till, W. Foissner/T. Weisse	EU399522
AU1	November 2002	Ephemeral meadow pond, Salzburg, Austria*	W. Foissner/H. Müller	EU399523
AU5	November 2002	Ephemeral meadow pond, Salzburg, Austria*	W. Foissner/H. Müller	EU399524
AU2	December 2003	Ephemeral meadow pond, Salzburg, Austria*	W. Foissner/E. Gächter	EU399525
AU3	December 2003	Ephemeral meadow pond, Salzburg, Austria*	W. Foissner/T. Weisse	EU399526
AU6	November 2004	Ephemeral meadow pond, Kefermarkt, Upper Austria	W. Foissner/T. Weisse	EU399527
AU7	November 2004	Ephemeral meadow pond, Kefermarkt, Upper Austria	W. Foissner/T. Weisse	—
CHI	October 2005	Zhu Jiang River, Guangzhou, China	W. Foissner/T. Weisse	EU399529
AUS	March 2006	Soil from the Murray River floodplain, Albury, Australia	W. Foissner/T. Weisse	EU399528

The asterisk marks the type locality of *M. corlissi*.

Engelmanniella mobilis AF164134, AF508757 (Hewitt et al. 2003), *Halteria grandinella* AF508759 (Hewitt et al. 2003), *Oxytricha granulifera* X53485 (Schlegel, Elwood, and Sogin 1991), and *Paraurostyla viridis* AF508766 (Hewitt et al. 2003). The sequences of the *M. corlissi* clones are reported in Table 1.

The sequence fragments were imported into Sequencher ver. 4.0.5 (Gene Codes Corp. Ann Arbor, MI), trimmed at the ends, assembled into contigs, and checked for sequencing errors. The SSrDNA sequences for the clones of *M. corlissi* were added to the existing Dedicated Comparative Sequence Editor (DCSE; De Rijk and De Wachter 1993) database and automatically aligned to the sequence of *H. grandinella* (Hewitt et al. 2003). We further refined the alignment by considering secondary structural features of the SSrRNA molecule.

For the phylogenetic analyses, MrModeltest (Nylander 2004) was employed to find the model of DNA substitution that best fits our data. The parameters were implemented into MrBayes ver. 3.1.1 (Huelsenbeck and Ronquist 2001; Ronquist and Huelsenbeck 2003) and two parallel runs of a Bayesian Inference (BI) analysis were performed over 1,000,000 generations, with every 50th tree sampled. The maximum posterior probability was determined out of the sampled trees, approximating it with the Markov Chain Monte Carlo (MCMC). The first 2,000 trees were discarded as burn-in. A maximum parsimony analysis with random sequence addition (MP) was performed with PAUP* ver. 4.0b10 (Swofford 2002). Genetic distances were calculated using DNADIST and the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980) of the PHYLIP ver. 3.6a2 package (Felsenstein 2004) and Neighbor-Joining analysis (NJ; Saitou and Nei 1987) was performed to compute a tree. Both parsimony and distance data were bootstrap resampled 1,000 times.

Light microscopy and morphometry. Since the cells of the clonal cultures were too fragile for ordinary protargol impregnation, the cultures were maintained at room temperature with some crushed wheat grains and 1 ml of *Cryptomonas* sp. added as food source. After 2 wk cells stabilized and could be preserved with a fixative composed of 40-ml saturated mercuric chloride and 40-ml glutaraldehyde (25%, v/v). For fixation, 40 ml of an exponentially

growing culture were poured into 40-ml fixative. Protargol impregnation was performed as described by Foissner (1991). For the morphological investigations, 21 well-prepared morphostatic specimens were selected from the permanent slides. The features investigated are shown in Fig. 2 and Table 5. The slides have been deposited in the Biologiezentrum of the Oberösterreichische Landesmuseum in Linz, Upper Austria.

Scanning electron microscopy (SEM). This was performed as described in Foissner (1991), but using 4% (w/v) osmium tetroxide. Further, specimens were mounted as described by Foissner and AL-Rasheid (2006).

Transmission electron microscopy (TEM). Exponentially growing cultures were fixed in a “strong” fixative composed of 10 ml of 25% (v/v) glutaraldehyde, 6 ml of 2% (w/v) aqueous osmium tetroxide, and 10 ml saturated mercuric chloride for 1 h at room temperature. Further manipulations were as described by Foissner (2005).

Since the investigations were very time consuming, only 7–12 specimens per population (actually twice as many, because transverse and longitudinal sections were needed) and only four populations were investigated (Table 6). To increase the accuracy of the values, we studied 6–12 sections from the middle third of each specimen. The data obtained were averaged and then analyzed statistically.

Ecophysiological experiments. Laboratory experiments on temperature and pH response were conducted with nine, and five *M. corlissi* clones, respectively, all harvested from cultures in exponential growth phase. Small culture flasks (50-ml vol.), 6-well (6-ml vol.), or 12-well (4-ml vol.) tissue plates, served as experimental containers. Ciliates were fed with *Cryptomonas* sp. at satiating levels during the experiments and acclimated step-wise, over several generations, to the respective experimental conditions. Ciliate cell size was measured with Lugol’s fixed material using a semi-automatic image analysis system. Details of the experimental set up and the analyses have been reported by Gächter and Weisse (2006), Weisse (2004), and Weisse et al. (2007).

Statistical analyses. Morphological characters of the populations reported in Table 5 were compared by the non-parametric method according to Nemenyi (Sachs 1984). This analysis assumes k treatment groups (or populations, in our study) with equal sample sizes. We used $k = 7$ for the interphase specimen features, $k = 5$ for the resting cyst features, and $k = 4$ for the TEM features (Table 5). For each character, all ($n \times k$) observations were ranked from smallest to largest. In case of ties, we computed the average ranks. We then summed the ranks separately for each population and computed all possible absolute differences of these sums. If an observed difference between two treatments (populations) reached or exceeded a critical value D (Table 180 in Sachs 1984), the difference was significant. The critical value D is adjusted to the number of treatments (populations); thus, a Bonferroni adjustment is not needed. The results for 22 features are presented in the right part of Table 5. In order to discern geographical differences, we added the “number of not significantly different characters” (NNSDC; Berger, Foissner, and Adam 1985) for each pair of populations at three significance levels. These values were converted to percentages, with 22 characters = 100%, which denotes “total similarity” (Table 6). The higher overall similarity at the higher level of significance (i.e. smaller P values) denotes that the number of significantly different characters decreases if P increases from 0.1 to 0.05 and 0.01. The populations AU5, AU6, and DR were not considered for the NNSDC method because resting cyst and/or TEM features were lacking.

We compared the morphological and ecophysiological diversity of five clones (AU2/AU3, AU5, AU6, AUS and CHI) for which all parameters were investigated. To render morphological

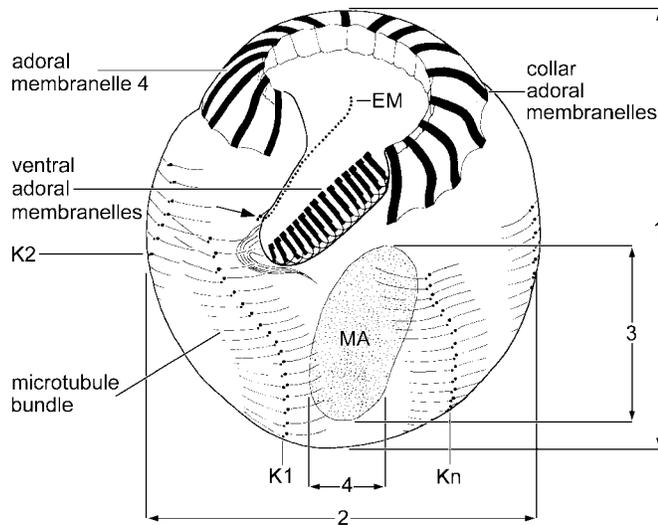


Fig. 2. A slightly schematized ventral view of a protargol-impregnated specimen of *Meseres corlissi*, showing some of the features measured and counted (cf. Table 5). Arrow marks the minute paroral membrane. EM—endoral membrane; K1, K2—somatic kinetia; Kn—last somatic kinetia; MA—macronucleus; 1—body length; 2—body width; 3—macronucleus length; 4—macronucleus width.

and ecophysiological measurements comparable, the raw data were converted to rank numbers for each clone and each parameter measured (i.e. the clone with the longest linear dimension, the highest number of kineties or the highest physiological rate received rank number 1). We used 13 of the 14 morphological characters of the interphase specimens listed in Table 5 for this statistical analysis; the number of collar adoral membranelles was discarded because it was constant among all clones. Similarly, we used the 14 features of the temperature (*T*) and pH response experiments listed in Table 7. The dataset was analyzed by ANOVA on ranks and pairwise post hoc tests (Student–Newman–Keuls method) to test for significant differences between the clones. Cluster analyses with unweighted pair-group average and nearest neighbor methods with Euclidean, squared Euclidean, and city block distance metrics were used to construct dendrograms (Statgraphics Plus 4.0, Manugistics Inc., Rockville, MD; Electronic Manual). We first calculated separate dendrograms for the morphological and the ecophysiological dataset, and then a dendrogram for the combined dataset. Since all cluster analysis methods yielded virtually identical results, we report results from the group average analysis and city block distance metric only. Statistical analyses were conducted using SigmaStat 2.03 and Statgraphics Plus 4.0.

RESULTS

Intraspecific genetic differences. We observed intraspecific conservation of length and GC content in all sequenced regions of the rDNA molecule of *M. corlissi*. The divergences among the clones of *M. corlissi* occurred mainly in the SSrDNA. The SSrDNA was generally 1,774 nucleotides long and had a GC content of 44%, and the 5.8S rDNA was conserved (153 nucleotides long, GC content 49%) in all studied clones. ITS 1 and ITS 2 were identical for all clones (125 and 199 nucleotides long, GC content 41% and 45%), except the Chinese one (CHI; 126 and 201 nucleotides long, GC content 40% and 45%), which showed eight differences to all other clones. Within the SSrDNA, we found differing nucleotide positions for clones DR (1), AU1 (4), AU5 (5), AU2 (2), and CHI (1) (Table 2).

The Austrian clone from Kefermarkt (AU6) was identical to clone AU3 from Salzburg and to the Australian clone (AUS). Sequences of *M. corlissi* clones AU2 and AU3 were inferred partly from the primary purified PCR product and partly from the re-amplified clonal product. During sequence analysis with Sequencher ver 4.05, we discovered distinct nucleotide differences (A/G) in one (AU3) and two (AU2) positions of the SSrDNA between the primary and the clonal PCR product.

Table 3. Similarities (in %) within the SSrDNA and ITS sequences of *Meseres corlissi* clones and *Halteria grandinella*.

	ITS1	5.8SrDNA	ITS2	All ITS	SSrDNA & ITS
CHI/other <i>M. corlissi</i>	96	100	98	98	99
Other <i>M. corlissi</i> / <i>H. grandinella</i>	84	99	89	91	97
CHI/ <i>H. grandinella</i>	82	99	89	90	97

CHI, Chinese *M. corlissi*.

The phylogenetic placement of *M. corlissi* was inferred from the SSrDNA sequence analysis of two clones of *M. corlissi* and *H. grandinella* (data not shown). Modeltest ver. 3 defined the Tamura-Nei model (TrN, Tamura and Nei 1993) with gamma distribution as the most suitable model for nucleotide substitution. A sister-group relationship of *Meseres* and *Halteria* is highly supported by ML (100%) and moderately supported by MP (54%) and NJ (64%). All clones of *M. corlissi* shared 99%–100% SSrDNA sequence similarity and showed only minimal evolutionary divergence (Table 3). The clones AU3, AU6, and AUS were identical. *Halteria grandinella* and *M. corlissi* shared over 98% similarity and the genetic divergence was 1.5%.

The phylogenetic analyses of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA of *M. corlissi* included the ITS sequences of *H. grandinella*; three stichotrich species were used as out-group (data not shown). The ITS region was identical for the *Meseres* clones AU1, AU2, AU3, AU5, AUS, and DR: all clones formed a polytomy. The Chinese clone (CHI) branched basally. Modeltest ver. 3 defined the model of HKY model (Hasegawa, Kishino, and Yano 1985) with gamma distribution as most suited for our ITS dataset. Based on the secondary structure model of the ITS2 (Coleman 2005), we constructed a model for the ITS2 of *Meseres* and *Halteria* (Fig. 3), illustrating the variable regions between the two genera. The substitutions are located in the loop of helix A, as well as in the subhelices and loops of helix B.

The third phylogenetic analysis was based on the combined data of both SSrDNA and ITS for *M. corlissi* and *H. grandinella* (Fig. 4). The stichotrichs *E. mobilis*, *Oxytricha granulifera*, and *Paraurostyla viridis* were used as out-group as these three species also have complete SSrDNA and ITS sequences. The tree topology is identical to the previous topologies: the Chinese clone (CHI) branched basally to the polychotomous clade of the remaining *M. corlissi* clones (Fig. 4). Table 3 lists the genetic divergences for the group of almost identical *M. corlissi* clones, the Chinese *M. corlissi* clones, and *H. grandinella*. The data show clearly that the ITS1 is the most diverse region: 4% divergence

Table 2. Variable nucleotide positions among the clones of *Meseres corlissi* (SSrDNA).

<i>Meseres corlissi</i>	SSrDNA ^a													ITS1 ^a				ITS2 ^a			
	118	146	206	273	318	499	511	687	736	1206	1359	1528	1694	1861	1893	1894	1895	1899	2179	2180	2253
DR	T	G	T	A	C	A	A	T	C	C	C	G	T	C	—	T	A	C	—	—	A
AU1	C	.	.	G	.	.	G	.	T	T
AU5	.	.	—	.	.	G	.	C	T	.	G	A
AU2	.	C	.	.	T	.	.	.	T
AU3	T
AU6	T
AUS	T
CHI	T	.	.	.	C	T	A	C	C	A	G	C	T

^aPositions 118–1694 occur in the SSrDNA gene, positions 1861–1899 in the ITS1 region, and positions 2179–2253 in the ITS2 region.

^bFor designation of clones, see Table 1.

Positions are numbered with respect to the position in our SSrDNA alignment (Position 1).

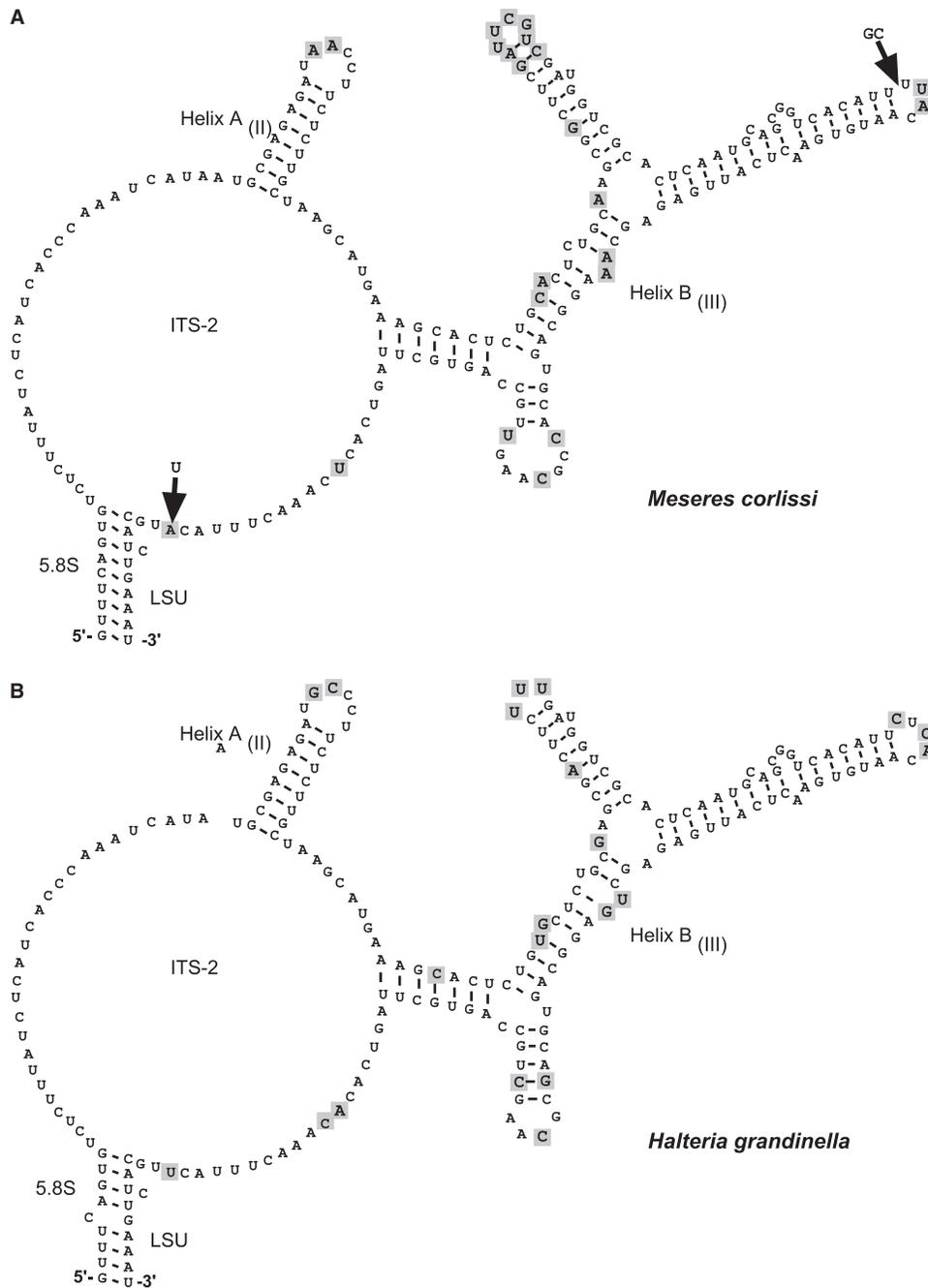


Fig. 3. Models of the secondary structure of the ITS2 region of *Meseres corlissi* (A) and *Halteria grandinella* (B). Variable positions among *Meseres* and *Halteria* are highlighted by a grey background. The arrows in (A) mark the differences of the clone CHI to all other clones of *M. corlissi*.

within *M. corlissi* and 16%–18% divergence between *M. corlissi* and *H. grandinella*, while SSrDNA and 5.8S rDNA are more conserved. ITS2 shows mostly intergeneric variation (11% between *M. corlissi* and *H. grandinella*), but little intraspecific divergence (2% within *M. corlissi*).

Morphological variation. The most important morphological features investigated by light microscopy are shown schematically in Fig. 2; Table 4 summarizes the 14 morphological characters investigated in seven *M. corlissi* clones from different geographic regions. Ultrastructural details revealed by SEM and TEM are provided in the captions to Fig. 5–8.

The seven *M. corlissi* populations investigated showed conspicuous morphological differences (Tables 5 and 6). Even clones of the same population revealed significant differences; as an example, clones AU2 and AU5, both from the Austrian type locality, differed significantly in the number of ciliary rows: 8 and 9 on average respectively (Table 5). However, if only the presumably most important, (= presumably functional) morphological characters (i.e. number of ciliary rows, kinetids within a ciliary row, adoral membranelles, cortical microtubules) are considered, the populations are more similar. The variability of the main features was often so low that even minor differences between populations

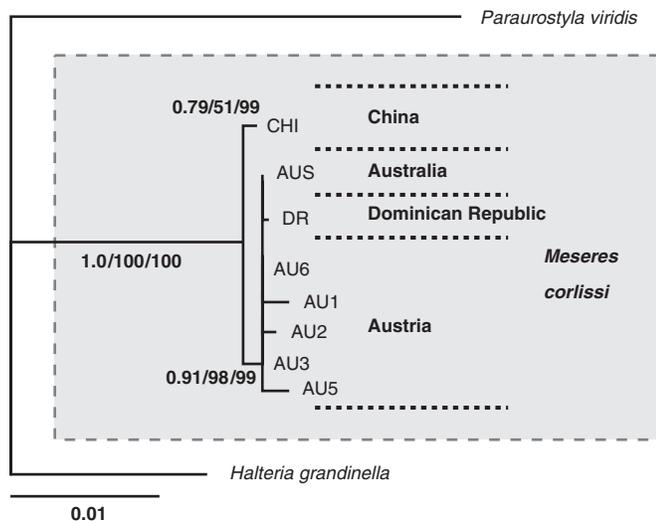


Fig. 4. Neighbor joining tree of the combined small subunit rDNA and ITS sequences computed with NEIGHBOR and derived from the evolutionary distances computed by DNADIST (both PHYLIP ver. 3.6a2) using the Kimura-2-parameter model. Branch lengths represent evolutionary distance. The first numbers at the nodes represent the posterior probability values of the Bayesian analysis and the second and third numbers represent bootstrap values (percent out of 1,000 replicates) for maximum parsimony and neighbor joining, respectively. The scale bar represents one substitution per 100 nucleotide positions.

were significant; for instance, the number of ciliary rows was significantly different ($P \leq 0.01$, Table 5) between clones AU5 and AU7, although they differed by only 1 kiny on average. No significant differences were found in the fine structural (TEM) features selected (Table 5, Fig. 6–8).

Overall, there was a statistically significant difference between the populations (one-way ANOVA on ranks, $P < 0.001$). The Chinese clone was not different from the Austrian clones AU2 and AU5 from the type locality in Salzburg (pair-wise SNK post-hoc tests); similarly, there was no statistical difference between AU2 and AU5 and between the Australian clone (AUS) and the Austrian clone from Kefermarkt (AU6). Pair-wise comparisons of all other clones yielded significant differences (data not shown). The differences obtained appear unrelated to geographical distance and historical break up of Pangaea because cluster analysis revealed that an Austrian population each (AU2, respectively AU6) was associated with the Chinese and Australian populations (Fig. 9(A)).

Ecophysiological variation. Significant differences between populations of *M. corlissi* have already been reported for the temperature response of nine clones (Gächter and Weisse 2006) and for the pH response of five clones (Weisse et al. 2007). Major results are summarized in Table 7 for the five *M. corlissi* clones that

Table 4. Morphological features investigated in *Meseres corlissi*.

Feature	Population						
	AU2	AU5	AU6	AU7	AUS	CHI	DR
Interphase (Protargol)	x	x	x	x	x	x	x
Cyst (in vivo)	x			x	x	x	x
Interphase (TEM)	x			x	x	x	

For designation of populations, see Table 1.

DR, Dominican Republic; TEM, transmission electron microscopy.

were investigated in both previous studies. If all 14 ecophysiological characters investigated were combined, all clones were different from each other with two exceptions: the Austrian clones AU3 and AU5 from Salzburg and the Austrian clone from Kefermarkt (AU6) vs. the Australian clone (AUS) did not differ (one-way ANOVA on ranks, pair-wise SNK post-hoc tests). Cluster analysis confirmed and illustrated these results; the Salzburg clones formed one sister group, the Australian (AUS) and Chinese (CHI) clones another one, and the Austrian clone AU6 from Kefermarkt was more closely associated with the other Austrian than with the Asian/Australian clones (Fig. 9(B)).

Morphological and ecophysiological variation combined. If the datasets reported in Tables 5 and 7 are combined, a one-way ANOVA on ranks and pair-wise post-hoc comparisons suggest that all clones but the clones from the type locality (AU2/AU3 vs. AU5) and the Australian clone (AUS) vs. the Austrian clone AU6 are significantly different from each other (data not shown). The Chinese clone differed from all other clones, while the Australian clone was identical with one Austrian clone. A biogeographic pattern is less obvious from cluster analysis (Fig. 9(C)) than with the ecological data alone (Fig. 9(B)).

DISCUSSION

Our study demonstrates that the level of detecting intraspecific differences was lowest in the conserved SSrDNA gene (<0.5% sequence divergence) and highest in ecological features, such as growth and production rates (up to >100% difference between maximum and minimum values). In the following, we will first address the question how to evaluate and rank variation of different characters at each level (i.e. genes, morphology, ecology) and whether biogeographic patterns emerge at each level. We will then synthesize the intraspecific variation across the three levels investigated with respect to our overall goal: does *M. corlissi* show biogeographic variability?

Genetic variation within *Meseres corlissi*. Among the eight clones of *M. corlissi*, we found 13 variable nucleotide positions in the SSrDNA sequence. The most divergent clones were AU1 and AU5 (0.47%)—both collected at the same locality and the same time. On the contrary, clones AU2 and AU3, also collected simultaneously at the type locality 1 yr later showed only 0.12% divergence. The clone from Kefermarkt (AU6) was identical to the Australian clone (AUS). The clone from the DR also showed little divergence to the Austrian clones—and less divergence to AU1 and AU5 (0.3%) than these two clones to each other. Snoeyenbos-West et al. (2002) have found 0.3%–0.9% intraspecific variation in other choreotrich and oligotrich clones, independent of sampling locality and sampling date. Katz et al. (2005) were able to distinguish three different clusters of *H. grandinella* sampled in locations on four continents. All clusters were separated by genetic divergences larger than 2% while the intraclade divergences were always smaller than 0.5%. Therefore, we conclude that all collected clones belong indeed to the same species, *M. corlissi*. The variations in the SSrDNA were all single nucleotide changes, occurring throughout the gene. A possible explanation is that these differences were introduced by the cloning procedure, since they only occurred in those strains that were cloned. The observed mismatches in the sequences of the primary purified PCR product and the clonal product in clones AU2 and AU3 (see Methods) do affirm this possibility. However, we do not have an explanation why the differences occur only in the SSrDNA but not in the ITS sequences. Previous studies have shown either identical sequences for both ITS and SSrDNA (Wright 1999) or evolutionary divergence to a similar degree in both regions or higher in ITS regions (Miao et al. 2004; Snoeyenbos-West et al. 2002).

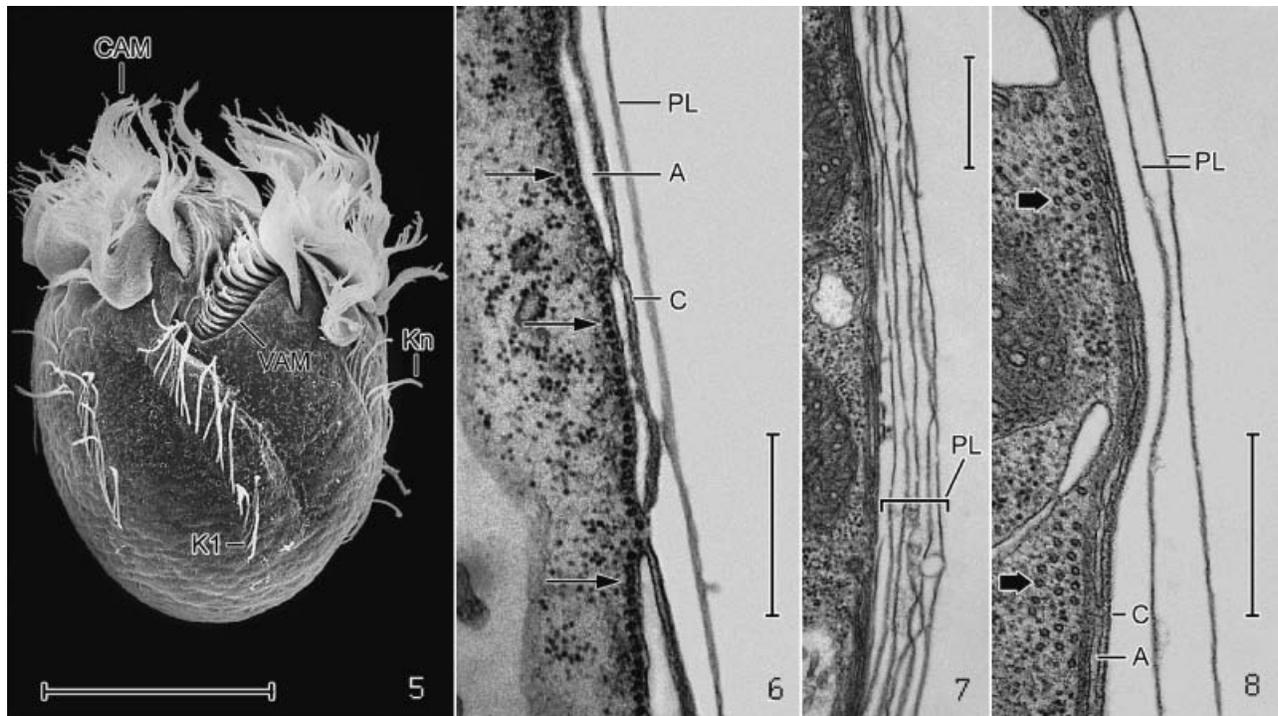


Fig. 5–8. *Meseres corlissi*, Salzburg population in the scanning (5) and transmission (6–8) electron microscope, showing the general organization and most of the features investigated (cf. Table 5). 5. Ventral view showing somatic kineties (K1, Kn) and collar (CAM) and ventral (VAM) adoral membranelles. 6. Transverse section showing the cortical microtubules (arrows) whose number was counted in a length of 1 μm . 7. Longitudinal section showing the perilemma sheets whose number is highly variable (cf. Fig. 6, 8). 8. Longitudinal section showing two laterally extending microtubule bundles (arrows). The number of microtubules comprising the individual bundles was counted. Scale bars: 30 μm (Fig. 5) and 500 nm (Fig. 6–8). A—cortical alveoli, C—cell membrane, CAM—collar adoral membranelles, K1—somatic kinety 1, Kn—last somatic kinety, PL—perilemma sheets, VAM—ventral adoral membranelles.

The phylogenetic analyses of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA revealed that the Chinese clone (CHI) differed by 2% from all other *M. corlissi* populations. Accordingly, the Chinese clone grouped separately and basally to all other clones. Since the Australian clone was identical in its ITS to the Austrian and the Central-American clones, the genetic data do not confirm our hypothesis that increasing geographical distance will show increased genetic divergence.

Intraspecific morphological variation. We found many morphological features that were significantly different within and between the *M. corlissi* populations. If all 13 variable characters reported were combined, the factor “clone” significantly affected the results (one-way ANOVA on ranks). However, seen with the taxonomist’s eye, this variation is within the phenotypic range common in ciliates. For numeric characters, such as the number of ciliary rows and adoral membranelles, an intraspecific coefficient of variation (CV) of 5% is typical for most ciliates (Foissner 1984, 1993), and we found a CV of 4.5% for *M. corlissi*. Size-related distance measures, such as body length or macronucleus width, typically show a CV of 15% (Foissner 1984, 1993). *Meseres corlissi* adheres to this rule: if the first 4 morphometric characters reported in Table 5 are averaged, the CV of each population was 13.5%.

Similar to the genetic data reported above, we found significant differences in 10 out of 13 variable characters between the Austrian clones AU5 and AU6 and even significant differences between clones isolated from the same locality at the same time (AU6 vs. AU7), while the geographically distant clones from the DR and Australia (AUS) differed only little. The cluster analysis confirmed that the morphological re-

sults do not suggest increasing divergence with geographic distance.

Intraspecific ecological variation. The intraspecific differences that we obtained for the response to temperature and pH were relatively larger than the respective genetic and morphological differences. The maximum growth rate (μ_{max}), the average cell volume, and the maximum production rate measured in the temperature response experiments all varied by a factor of up to >2 between the clones. Note that some of the ecological features, such as the minimum pH tolerated, were measured at non-linear scales that cannot easily be compared with metric measures. Similarly, it is difficult to compare relative thermal sensitivity to relative morphological variations because little information is available on inter- and intraspecific variation of the former.

Large intraspecific differences have been reported for growth, feeding, and production rates of several freshwater oligotrich and prostome ciliate species under experimental conditions comparable to those used in the present study (reviewed by Weisse 2006). While most of the previous investigations were conducted with clonal isolates obtained from different habitats or from the same locality at different years, Weisse and Rammer (2006) reported pronounced ecophysiological differences for sympatric clones of two freshwater ciliate species. These authors also discussed the ecological implications of presumably minor differences: 10% growth rate difference may significantly alter the clonal composition in the course of a ciliate peak, which typically lasts for 2–3 wk in temperate lakes (Weisse et al. 1990).

If the average μ_{max} of the temperature response experiments is calculated from the five clones investigated, the CV is 31.9%. In the pH response experiments, the CV of μ_{max} was somewhat lower

Table 5. Morphometric characterization and comparison of seven populations of *Meseres corlissi*.

Characteristics ^a	Po	x	M	SD	SE	CV	Min	Max	N	Po	AU7	AU6	AU5	AU2	CH1	AUS
<i>Interphase specimens</i>																
Body, length	AU7	75.0	75.0	10.4	2.3	13.8	50.0	95.0	21	AU7						
	AU6	80.6	80.0	9.0	2.0	11.2	62.0	96.0	21	AU6	NS					
	AU5	62.4	62.0	12.4	2.7	19.9	43.0	90.0	21	AU5	*	**				
	AU2	69.9	70.0	9.7	2.1	13.9	56.0	88.0	21	AU2	NS	*	NS			
	CH1	66.7	67.0	8.5	1.9	12.7	55.0	83.0	21	CH1	NS	**	NS	NS		
	AUS	82.1	82.0	9.1	2.0	11.0	66.0	104.0	21	AUS	NS	NS	**	**	**	
	DR	76.4	80.0	9.7	2.1	12.7	55.0	95.0	21	DR	NS	NS	**	NS	x	NS
Body, width	AU7	64.6	68.0	9.2	2.0	14.3	42.0	78.0	21	AU7						
	AU6	69.2	67.0	8.4	1.8	12.2	55.0	87.0	21	AU6	NS					
	AU5	51.1	50.0	7.9	1.7	15.4	40.0	75.0	21	AU5	**	**				
	AU2	57.1	56.0	5.7	1.2	9.9	46.0	68.0	21	AU2	*	**	NS			
	CH1	55.6	56.0	4.1	0.9	7.5	49.0	62.0	21	CH1	**	**	NS	NS		
	AUS	68.3	69.0	4.0	0.9	5.8	62.0	76.0	21	AUS	NS	NS	**	**	**	
	DR	63.8	65.0	6.3	1.4	9.9	52.0	75.0	21	DR	NS	NS	**	NS	*	NS
Macronucleus, length	AU7	30.8	30.0	3.9	0.9	12.7	25.0	40.0	21	AU7						
	AU6	31.0	30.0	5.8	1.3	18.7	21.0	40.0	21	AU6	NS					
	AU5	32.1	32.0	7.2	1.6	22.3	22.0	50.0	21	AU5	NS	NS				
	AU2	31.9	32.0	4.4	1.0	13.9	25.0	39.0	21	AU2	NS	NS	NS			
	CH1	26.1	26.0	5.3	1.2	20.2	18.0	35.0	21	CH1	NS	NS	x	*		
	AUS	35.5	35.0	2.5	0.6	7.0	32.0	40.0	21	AUS	*	x	NS	NS	**	
	DR	31.5	32.0	5.3	1.2	16.7	23.0	40.0	21	DR	NS	NS	NS	NS	x	NS
Macronucleus, width	AU7	12.1	12.0	1.5	0.3	12.5	10.0	15.0	21	AU7						
	AU6	14.7	15.0	1.9	0.4	12.9	9.0	18.0	21	AU6	**					
	AU5	18.3	18.0	4.2	0.9	22.8	13.0	30.0	21	AU5	**	NS				
	AU2	14.1	14.0	2.0	0.4	14.5	10.0	17.0	21	AU2	x	NS	**			
	CH1	12.6	12.0	1.9	0.4	15.1	10.0	16.0	21	CH1	NS	*	**	NS		
	AUS	14.6	15.0	1.4	0.3	9.6	12.0	17.0	21	AUS	**	NS	NS	NS	*	
	DR	14.2	14.0	1.4	0.3	9.9	12.0	16.0	21	DR	*	NS	*	NS	NS	NS
Collar adoral membranelles, number	AU7	16.0	16.0	0.2	0.1	1.4	15.0	16.0	21	AU7						
	AU6	16.0	16.0	0.2	0.1	1.4	15.0	16.0	21	AU6	NS					
	AU5	16.0	16.0	0.5	0.1	2.8	15.0	17.0	21	AU5	NS	NS				
	AU2	16.1	16.0	1.0	0.2	6.5	13.0	17.0	21	AU2	NS	NS	NS			
	CH1	16.1	16.0	0.5	0.1	3.1	15.0	17.0	21	CH1	NS	NS	NS	NS		
	AUS	15.9	16.0	0.3	0.1	1.9	15.0	16.0	21	AUS	NS	NS	NS	NS	NS	
	DR	16.1	16.0	0.2	0.1	1.4	16.0	17.0	21	DR	NS	NS	NS	NS	NS	
Ventral adoral membranelles, number	AU7	15.1	15.0	0.9	0.2	6.1	14.0	17.0	21	AU7						
	AU6	14.5	14.0	1.0	0.2	7.1	13.0	16.0	21	AU6	NS					
	AU5	16.9	17.0	1.6	0.4	9.4	15.0	20.0	21	AU5	*	**				
	AU2	15.2	15.0	1.1	0.2	7.1	12.0	16.0	21	AU2	NS	NS	NS			
	CH1	14.5	14.0	0.8	0.2	5.2	13.0	16.0	21	CH1	NS	NS	**	NS		
	AUS	15.4	15.0	0.7	0.2	4.4	14.0	17.0	21	AUS	NS	NS	NS	NS	NS	
	DR	13.0	13.0	0.7	0.2	5.7	12.0	14.0	21	DR	**	*	**	**	*	**
Kinetids in kinety 1, number	AU7	13.4	14.0	1.7	0.4	12.4	10.0	15.0	21	AU7						
	AU6	17.4	18.0	1.8	0.4	10.0	12.0	20.0	21	AU6	**					
	AU5	10.9	11.0	2.3	0.5	21.1	4.0	16.0	21	AU5	NS	**				
	AU2	12.9	13.0	2.3	0.5	17.5	8.0	16.0	21	AU2	NS	**	NS			
	CH1	16.5	16.0	1.7	0.4	10.3	14.0	20.0	21	CH1	**	NS	**	**		
	AUS	17.1	17.0	1.1	0.2	6.6	15.0	19.0	21	AUS	**	NS	**	**	NS	
	DR	14.2	15.0	1.9	0.4	13.3	9.0	16.0	21	DR	NS	**	*	NS	x	**
Kinetids in kinety 4, number	AU7	14.3	14.0	1.0	0.2	6.7	13.0	16.0	21	AU7						
	AU6	16.6	17.0	1.0	0.2	5.9	15.0	18.0	21	AU6	**					
	AU5	12.4	12.0	1.8	0.4	14.7	9.0	16.0	21	AU5	NS	**				
	AU2	14.5	14.0	1.9	0.4	13.4	12.0	19.0	21	AU2	NS	**	NS			
	CH1	15.0	15.0	0.9	0.2	5.8	14.0	17.0	21	CH1	NS	**	**	NS		
	AUS	15.5	15.0	0.8	0.2	5.3	14.0	17.0	21	AUS	x	NS	**	NS	NS	
	DR	15.4	16.0	1.3	0.3	8.4	13.0	18.0	21	DR	NS	NS	**	NS	NS	NS
Kinetids in kinety n, number	AU7	14.2	14.0	1.4	0.3	9.9	12.0	17.0	21	AU7						
	AU6	18.0	18.0	2.4	0.5	13.6	14.0	24.0	21	AU6	**					

Table 5. (Continued).

Characteristics ^a	Po	x	M	SD	SE	CV	Min	Max	N	Po	AU7	AU6	AU5	AU2	CH1	AUS
	AU5	10.9	11.0	2.2	0.5	19.9	6.0	14.0	21	AU5	*	**				
	AU2	12.9	13.0	2.6	0.6	20.3	8.0	17.0	21	AU2	NS	**	NS			
	CH1	16.4	16.0	1.3	0.3	8.1	14.0	19.0	21	CH1	*	NS	**	**		
	AUS	15.6	16.0	1.6	0.3	10.1	11.0	18.0	21	AUS	NS	NS	**	*	NS	
	DR	14.8	14.0	3.3	0.7	22.1	12.0	28.0	21	DR	NS	**	*	NS	*	NS
Kinety 1, length	AU7	33.7	33.0	6.8	1.5	20.0	20.0	53.0	21	AU7						
	AU6	36.6	36.0	7.2	1.6	19.5	23.0	53.0	21	AU6	NS					
	AU5	24.5	23.0	6.8	1.5	27.8	12.0	40.0	21	AU5	*	**				
	AU2	31.8	33.0	5.4	1.2	16.8	24.0	42.0	21	AU2	NS	NS	NS			
	CH1	30.1	30.0	3.5	0.8	11.7	24.0	35.0	21	CH1	NS	*	NS	NS		
	AUS	43.0	42.0	5.8	1.3	13.4	33.0	57.0	21	AUS	**	NS	**	**	**	
	DR	39.1	40.0	10.7	2.3	27.4	20.0	68.0	21	DR	NS	NS	**	NS	*	NS
Kinety 4, length	AU7	26.4	26.0	3.2	0.7	12.2	20.0	32.0	21	AU7						
	AU6	29.8	30.0	3.1	0.7	10.5	22.0	37.0	21	AU6	x					
	AU5	25.6	25.0	6.3	1.4	24.4	16.0	41.0	21	AU5	NS	**				
	AU2	29.9	28.0	5.6	1.2	18.8	22.0	45.0	21	AU2	NS	NS	NS			
	CH1	23.5	25.0	2.4	0.5	10.2	18.0	27.0	21	CH1	NS	**	NS	**		
	AUS	29.0	29.0	2.9	0.6	9.9	25.0	35.0	21	AUS	NS	NS	x	NS	**	
	DR	27.4	28.0	2.7	0.6	10.0	22.0	30.0	21	DR	NS	NS	NS	NS	*	NS
Kinety n, length	AU7	27.8	28.0	4.2	0.9	15.3	18.0	35.0	21	AU7						
	AU6	34.6	34.0	5.8	1.3	16.7	22.0	43.0	21	AU6	*					
	AU5	22.1	22.0	5.7	1.3	26.0	11.0	32.0	21	AU5	x	**				
	AU2	28.6	28.0	7.3	1.6	25.4	20.0	45.0	21	AU2	NS	*	x			
	CH1	24.9	25.0	2.6	0.6	10.6	17.0	30.0	21	CH1	NS	**	NS	NS		
	AUS	31.7	32.0	3.1	0.7	9.9	24.0	36.0	21	AUS	NS	NS	**	NS	**	
	DR	31.1	32.0	6.2	1.4	19.9	15.0	42.0	21	DR	NS	NS	**	NS	**	NS
Adoral membranelle 4, length	AU7	13.2	13.0	1.0	0.2	7.9	11.0	15.0	21	AU7						
	AU6	15.1	15.0	0.5	0.1	3.3	14.0	16.0	21	AU6	**					
	AU5	13.6	14.0	0.8	0.2	5.9	12.0	15.0	21	AU5	NS	**				
	AU2	15.1	15.0	1.1	0.3	7.5	13.0	17.0	21	AU2	**	NS	**			
	CH1	13.4	13.0	1.4	0.3	10.2	10.0	15.0	21	CH1	NS	**	NS	**		
	AUS	14.1	14.0	0.7	0.2	5.1	13.0	15.0	21	AUS	NS	NS	NS	NS	NS	
	DR	12.3	13.0	0.9	0.2	7.4	11.0	14.0	21	DR	NS	**	x	**	NS	**
Somatic kineties, number	AU7	8.0	8.0	0.0	0.0	0.0	8.0	8.0	21	AU7						
	AU6	7.9	8.0	0.3	0.1	3.8	7.0	8.0	21	AU6	NS					
	AU5	9.3	9.0	0.9	0.2	9.2	8.0	11.0	21	AU5	**	**				
	AU2	7.8	8.0	0.6	0.1	8.1	6.0	9.0	21	AU2	NS	NS	**			
	CH1	8.0	8.0	0.2	0.1	2.7	7.0	8.0	21	CH1	NS	NS	**	NS		
	AUS	8.0	8.0	0.0	0.0	0.0	8.0	8.0	21	AUS	NS	NS	**	NS	NS	
	DR	7.9	8.0	0.4	0.1	4.6	7.0	8.0	21	DR	NS	NS	**	NS	NS	NS
Resting cysts																
Cyst, length in vivo	AU7	45.6	45.0	2.8	0.6	6.2	40.0	52.0	21	AU7						
	AU2	53.4	53.0	4.7	1.0	8.9	47.0	65.0	21	AU2	**					
	CH1	48.4	49.0	2.0	0.4	4.2	45.0	52.0	21	CH1	NS			**		
	AUS	50.1	50.0	3.5	0.8	7.0	42.0	55.0	21	AUS	**			NS	NS	
	DR	47.2	47.0	3.2	0.7	6.8	42.0	55.0	21	DR	NS			**	NS	x
Cyst, width in vivo	AU7	42.5	42.0	3.2	0.7	7.5	37.0	48.0	21	AU7						
	AU2	50.6	50.0	5.2	1.1	10.3	42.0	58.0	21	AU2	**					
	CH1	49.5	48.0	5.6	1.2	11.4	42.0	65.0	21	CH1	**			NS		
	AUS	47.3	48.0	4.3	0.9	9.1	40.0	55.0	21	AUS	**			NS	NS	
	DR	45.4	45.0	4.0	0.9	8.7	40.0	55.0	21	DR	NS			*	NS	NS
Cyst, length in vivo including lepidosomes	AU7	62.8	63.0	4.0	0.9	6.4	55.0	70.0	21	AU7						
	AU2	66.6	65.0	6.1	1.3	9.1	57.0	82.0	21	AU2	NS					
	CH1	59.1	60.0	5.1	1.1	8.7	48.0	65.0	21	CH1	NS			**		
	AUS	67.0	68.0	3.6	0.8	5.4	58.0	75.0	21	AUS	*			NS	**	
	DR	59.5	58.0	5.0	1.1	8.3	50.0	70.0	21	DR	NS			**	NS	**
Cyst, width in vivo including	AU7	60.0	60.0	4.0	0.9	6.7	50.0	66.0	21	AU7						

Table 5. (Continued).

Characteristics ^a	Po	x	M	SD	SE	CV	Min	Max	N	Po	AU7	AU6	AU5	AU2	CHI	AUS
lepidosomes	AU2	63.6	62.0	7.0	1.5	11.0	50.0	75.0	21	AU2	NS					
	CHI	60.4	60.0	2.9	0.6	4.9	55.0	65.0	21	CHI	NS			NS		
	AUS	63.6	63.0	4.0	0.9	6.3	57.0	73.0	21	AUS	NS			NS	NS	**
	DR	58.2	58.0	5.2	1.1	8.9	50.0	68.0	21	DR	NS			*	NS	
Largest lepidosome, length in vivo	AU7	9.7	10.0	1.1	0.2	11.3	8.0	12.0	21	AU7						
	AU2	12.6	13.0	1.7	0.4	13.6	10.0	15.0	21	AU2	**					
	CHI	8.8	8.0	0.9	0.2	10.8	8.0	11.0	21	CHI	NS			**		
	AUS	11.4	11.0	1.1	0.2	9.8	10.0	13.0	21	AUS	*			NS	**	
	DR	9.1	9.0	1.7	0.4	19.0	6.0	14.0	21	DR	NS			**	NS	**
<i>Transmission electron microscopy</i> ^b																
TEM character 1	AU7	1.7	1.7	0.6	0.3	36.0	1.0	2.7	6	AU7						
	AU2	2.0	2.0	1.6	0.6	77.5	0.0	3.8	6	AU2	NS					
	CHI	1.7	1.6	0.7	0.3	43.3	0.7	2.8	6	CHI	NS			NS		
	AUS	1.1	1.0	0.3	0.1	31.1	0.8	1.7	6	AUS	NS			NS	NS	
TEM character 2	AU7	11.3	10.9	1.8	0.7	15.6	9.3	13.4	6	AU7						
	AU2	10.1	10.3	1.7	0.7	16.8	7.3	12.2	6	AU2	NS					
	CHI	10.9	12.0	3.3	1.4	30.3	5.3	14.0	6	CHI	NS			NS		
	AUS	14.1	12.9	3.6	1.5	25.3	10.4	20.0	6	AUS	NS			NS	NS	
TEM character 3	AU7	18.8	19.5	5.4	2.2	28.5	9.0	24.7	6	AU7						
	AU2	17.1	17.0	2.7	1.1	16.1	13.5	21.3	6	AU2	NS					
	CHI	15.9	15.9	2.6	1.1	16.3	13.0	19.3	6	CHI	NS			NS		
	AUS	17.8	16.8	3.5	1.4	19.8	14.8	24.5	6	AUS	NS			NS	NS	

^aAll measurements in μm .

^bTEM character 1, number of perilemma sheets; TEM character 2, number of microtubules per bundle; TEM character 3, number of cortical microtubules per μm .

Multiple statistical comparison: NS = $P > 0.1$; $x = 0.1 > P > 0.05$;

* $0.05 > P > 0.01$;

** $P < 0.01$; two-tailed.

CV, coefficient of variation (in %); M, median; Max, maximum value; Min, minimum value; n, sample size; Po, population, SD, standard deviation, SE, standard error of the arithmetic mean, x , arithmetic mean.

at 14.3%. In both cases, the variance between populations was distinctly higher than within populations. More importantly, the populations did not vary at random, but the difference increased with geographic distance. Gächter and Weisse (2006) demonstrated that the minimum temperature tolerated by clones of *M. corlissi* was positively related to the minimum temperature encountered in their natural habitats and that differences in the thermal sensitivity of the clones increased with increasing geographical distance and habitat difference. The clone-specific difference in temperature response did not result from phenotypic plasticity, since all strains used in this study had been kept under identical laboratory conditions for many generations prior to the beginning of the experiments. The effect of long-term acclimation of growth rates was studied with three Austrian clones of *M. corlissi* (Gächter and Weisse 2008). Although the acclimation effect was significant, its extent was minor relative to differences

in the temperature response measured with the clones of *M. corlissi* originating from different climate zones (Gächter and Weisse 2006).

We conclude that, in contrast to the genetic and morphological characters, results from the ecophysiological laboratory experiments suggest a biogeographic pattern among populations of *M. corlissi*.

Comparing genetic with morphological and ecological clonal variation. How do we relate to each other the various levels of divergence within and between populations of *M. corlissi* shown by genes, morphology and ecophysiology? In other words, is there a correspondence between 1% genetic diversity, 10% morphological diversity, and 100% ecological diversity? The obvious answer is no, there is no direct correspondence. However, a more detailed comparison of our datasets suggests otherwise. The Chinese clone CHI differed by 1% in its combined SSrDNA and ITS sequence from all other *M. corlissi* clones. If this clone is compared morphologically with the Austrian clone AU6, it is obvious that they are different in all but one of the eight size-related characters: only the macronucleus length of clone CHI ($26.1 \pm 5.3 \mu\text{m}$, SD) was not significantly smaller than that of AU6 ($31.0 \pm 5.8 \mu\text{m}$, SD). Corresponding to these morphological results, the mean cell length and cell volume of CHI were significantly smaller than those of AU6 in both the temperature and pH response experiments. Similar size-related differences are apparent between CHI and the Australian clone (AUS), but less obvious between CHI and AU7, although the latter was isolated from the same locality as AU6. There were even fewer differences between CHI and AU5: only one out of the eight size-related features reported in Table 5 differed significantly between these clones. However, these clones differed significantly in all five numerical features investigated. Note that CHI did not differ in any of those numer-

Table 6. Morphological similarity in percentages between four populations and at three significance levels (for details to the NNSDC method, see "Material and Methods" section).

Population	Significance level								
	x(0.10)			*(0.05)			**(0.01)		
	AU7	AU2	CHI	AU7	AU2	CHI	AU7	AU2	CHI
AU2	72.7	—	—	77.3	—	—	81.8	—	—
CHI	81.8	63.6	—	81.8	63.6	—	86.4	68.2	—
AUS	59.1	77.3	59.1	63.6	77.3	59.1	77.3	81.8	63.6

For designation of populations, see Table 1.

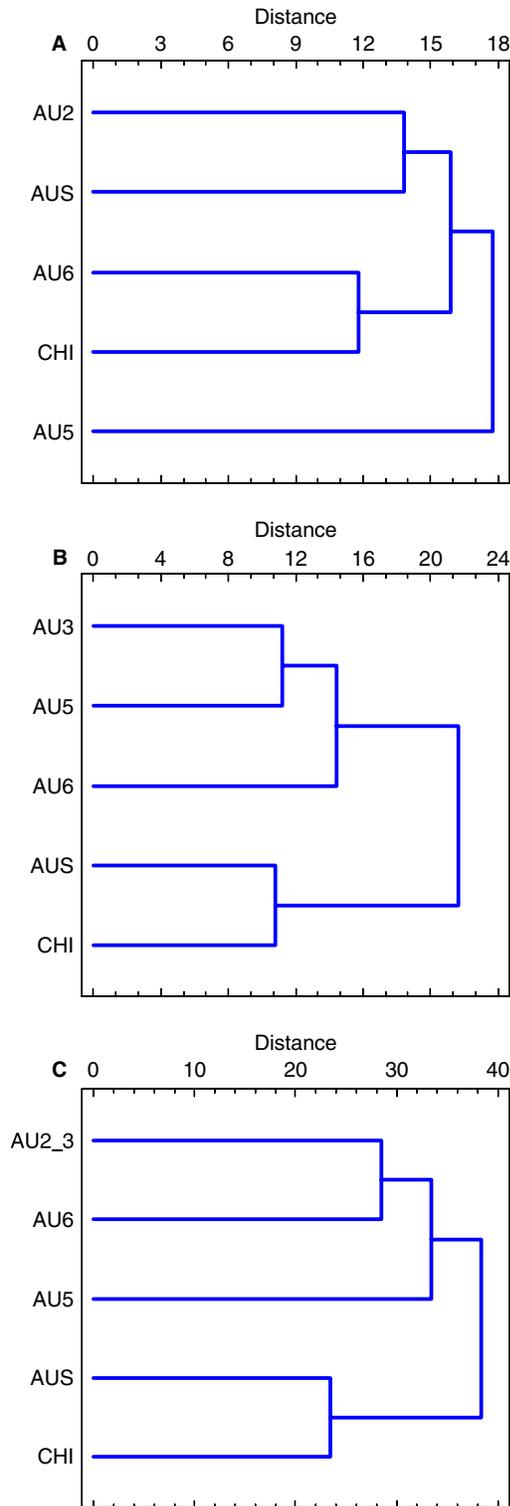


Fig. 9. Cluster analysis of five clones of *Meseres corlissi* representing 13 morphological parameters (A), 14 ecophysiological parameters (B), and the combined 27 morphological and ecophysiological parameters (C). A biogeographic pattern is suggested by the ecophysiological parameters, but not obvious from the morphological parameters.

ical features from AUS and only in one numerical character from AU5. Accordingly, the Chinese clone was different from the Austrian clones AU5 and AU6 and the Australian clone in size-related **or** numerical characters. Ecologically, the Chinese clone was clearly separated from all other clones (our Results, details reported by Gächter and Weisse 2006; Weisse et al. 2007). The intraspecific ecological variation was as large as differences observed between ciliate species under comparable laboratory conditions as used in our study (Weisse 2006).

In conclusion, we demonstrated that small genetic intraspecific differences of 0%–4% in the SSrDNA and ITS sequences may correspond to a 5%–15%—approximately 10-fold larger—morphological variation in numerical and morphometric characters, and to an even larger ecophysiological variation (i.e. 10%–100% in pH and temperature response).

Meseres corlissi—a rare ciliate species with biogeography?

The late discovery (Petz and Foissner 1992) and the as yet only eight known records suggest that *M. corlissi* is a rare ciliate, likely preferring temporarily flooded habitats, such as small meadow ponds, floodplain soils, and tanks of bromeliads (WF., unpubl. data; Gächter and Weisse 2006; Petz and Foissner 1992; Weisse 2004). Accordingly, the possibilities for long-distance genetic exchange within metapopulations of this species may be limited. We never observed conjugation in non-clonal natural isolates or in the experimental clonal cultures. The ciliate swims continuously in the medium, and the ecological characteristics observed in our laboratory suggest that *M. corlissi* is a potentially highly competitive planktonic species (Weisse 2004). However, in the course of this study it became obvious that this ciliate is sensitive to particular environmental conditions and is difficult to cultivate in the trophic phase for an extended period of time (Müller et al. 2006; TW., unpubl. data). Furthermore, field studies showed that, for unknown reasons, it sometimes could not be reactivated from the cyst-containing mud and soil of the type locality (WF., unpubl. data). This is corroborated by laboratory observations (Müller 2007; Müller et al. 2006). Although cysts are readily formed and look “healthy”, we were usually unable to initiate excystment: only when thousands of cysts were brought into fresh medium did some excyst. Similar observations have been made earlier with other ciliates (cited in Müller 2007), but the reason for the low percentage of successful excystment remained usually unknown. Foissner and Pichler (2006) suggested that the unusually complex structure of the cyst wall (five layers, each with a specific precursor) of *M. corlissi* might be responsible for this behavior. Since our methods of isolation and cultivation are all selective (Foissner 1999; Weisse 2006), *M. corlissi* may be much more common than indicated by the few records; likely, it needs highly specific conditions to excyst. If only some clones with certain predispositions excysted under our laboratory conditions, this could explain their high genetic similarity in spite of their wide distribution.

The peculiarities of the Chinese clone that we observed at all levels is consistent with local adaptation and, therefore, limited dispersal. Given our limited samples size, we cannot rule out that this clone is also present elsewhere. However, we found no clone that came close to the Chinese one at both Austrian localities. It remains an open question if dispersal of *M. corlissi* from other continents to the locality in China is rare or if local adaptation of the Chinese clone has progressed to an extent that immigration by other clones will be prevented, in spite of high dispersal rates. If the latter is the case and this situation persists, *M. corlissi* would undergo allopatric speciation (Weisse 2008). However, the fact that the Australian clone AUS and the Austrian clone AU6 were genetically identical in their SSrDNA and ITS sequences and did not differ significantly if all morphological and ecological characters were combined is consistent with cross-continental dispers-

Table 7. Overview of the major results obtained by ecophysiological laboratory experiments with five *Meseres corlissi* clones (Gächter and Weisse 2006; Weisse et al. 2007) that were used for statistical analysis in this study.

Clone	μ_{\max} (d ⁻¹)	V_{avg} (μm ³)	P_{\max} (μm ³ /cil/d)	T at P_{\max} (°C)	T_{\min}	μ at 30 °C	T_{sens} (%)
Temperature response							
AU3	1.23 ^a ± 0.25	71,290 ± 17,200	78,091 ± 38,295	20.0	7.65	0.6	5.45
AU5	1.25 ± 0.43	79,400 ± 20,840	88,832 ± 60,823	25.0	7.71	0.2	4.07
AU6	1.42 ± 0.41	87,250 ± 23,050	106,822 ± 35,986	30.0	7.67	1.4	8.11
AUS	2.40 ± 0.47	94,570 ± 11,170	162,078 ± 59,050	25.0	10.6	2.2	2.75
CHI	2.10 ± 0.16	48,220 ± 10,220	90,164 ± 36,016	30.8	14.3	2.0	5.42

For designation of populations, see Table 1.

pH response			pH at P_{\max}	pH _{min}	pH _{tol}	L_{avg} (μm)	
AU3	2.56 ± 0.04	88,766 ± 15,362	256,000 ± 13,840	7.09 ± 0.02	5.9	2.7	64.44 ± 4.82
AU5	2.53 ± 0.13	97,412 ± 14,974	265,200 ± 19,740	7.26 ± 0.65	5.7	2.9	64.31 ± 4.89
AU6	2.76 ± 0.04	102,543 ± 15,063	283,900 ± 15,230	7.12 ± 0.34	5.5	3.1	66.46 ± 3.62
AUS	2.24 ± 0.19	86,110 ± 23,585	255,100 ± 20,690	5.82 ± 0.40	<4.4	>4.2	62.49 ± 6.12
CHI	1.88 ± 0.09	52,295 ± 12,018	112,100 ± 15,370	7.65 ± 0.39	5.1	3.6	53.57 ± 5.16

^aResults reported are mean values ± 1 standard deviation.

μ_{\max} , maximum growth rate; L_{avg} , average cell length; V_{avg} , average cell volume; P_{\max} , maximum cellular production; T at P_{\max} , temperature at maximum cellular production; T_{\min} , minimum temperature tolerated [i.e., where $\mu \geq 0$]; μ at 30 °C, growth rate at 30 °C; T_{sens} , temperature sensitivity [i.e., % decrease in cell volume °C⁻¹]; pH at P_{\max} , pH at maximum P , pH_{min}, minimum pH tolerated; pH_{tol}, width of pH tolerance [i.e., where $\mu \geq 0$; in pH units].

al of these clones. Given the large population sizes and high number of potentially suitable habitats of many ciliate species, we speculate that our findings may be typical for rare species; the chances may be equally high for both global dispersal of *most* and local adaptation of *some* populations in areas where dispersal has been permanently or temporarily reduced.

Methodological constraints and implications for future research. We have used selective methods of isolation, cultivation, and fixation of the ciliates that may have compromised our results. We can, for instance, not rule out that our isolation and cultivation procedures selected positively or negatively for certain *M. corlissi* clones. We did not succeed in isolating clones from encysted cells in each case; our attempts to isolate another *M. corlissi* clone from a soil sample in Brazil failed (reported in Weisse et al. 2007). Similarly, our analysis is limited with respect to the spatial and temporal dimensions of sampling and, accordingly, to the number of clones investigated. In addition to our comparatively small sample sizes, we are aware that each of the genetic, morphological, and ecological traits investigated has its own variability and so different sample sizes may be required to detect differences at the different levels (Martínez-Abraín 2007). Finally, ranking the results without weighing them may not be adequate; this is a principal problem with non-parametric statistics that cannot fully explore the information inherent in the datasets. It is, therefore, safe to conclude that our study provides a conservative estimate of the natural, intraspecific variation of *M. corlissi*.

In many cases the population variance estimated from sample means was larger than expected from the variability within the samples (= clones). Thus, we conclude that differences between the populations are real (i.e. exceed random effects). A corollary of this finding is that, rather than increasing the number of individuals/replicates studied, the number of different populations investigated should be increased to characterize adequately the morphological and ecophysiological variation within a species. This leads, however, to a principal dilemma with rare species; if a species can only be detected in <2% of all presumably suitable habitats, as it was the case with *M. corlissi* (Foissner et al. 2002), the efforts necessary for sampling and isolation easily exceed the means of most research projects.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by the Austrian Science Foundation (F.W.F., projects P16796-B06 to T.W. and P-15017 to W.F.) and by the Austrian Academy of Sciences (APART, Austrian Programme for Advanced Research and Technology, Project 10940) to H.B. We also acknowledge support by the Discovery Grant 044228 from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) awarded to Denis H. Lynn, University of Guelph, Canada, for the molecular work by M.S.K. The technical assistance of Maria Pichler, Birgit Peukert, Ulrike Scheffel, and Andreas Zankl is greatly acknowledged. We appreciate comments by Helga Müller on the draft manuscript.

LITERATURE CITED

- Agatha, S., Strüder-Kypke, M. C. & Beran, A. 2004. Morphologic and genetic variability in the marine planktonic ciliate *Laboea strobila* Lohmann, 1908 (Ciliophora, Oligotrichia), with notes on its ontogenesis. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **51**:267–281.
- Barth, D., Krenek, S., Fokin, S. I. & Berendonk, T. U. 2006. Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**:20–25.
- Berger, H., Foissner, W. & Adam, H. 1985. Morphological variation and comparative analysis of morphogenesis in *Parakahliella macrostoma* (Foissner, 1982) nov. gen. and *Histiculus muscorum* (Kahl, 1932), (Ciliophora, Hypotrichida). *Protistologica*, **21**:295–311.
- Coleman, A. W. 2005. *Paramecium aurelia* revisited. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **52**:68–77.
- De Rijk, P. & De Wachter, R. 1993. DCSE, an interactive tool for sequence alignment and secondary structure research. *CABIOS*, **9**:735–740.
- Diggles, B. K. & Adlard, R. D. 1997. Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **44**:25–32.
- Elwood, H. J., Olsen, G. J. & Sogin, M. L. 1985. The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. *Mol. Biol. Evol.*, **2**:399–410.
- Finlay, B. J., Esteban, G. F., Brown, S., Fenchel, T. & Hoef-Emden, K. 2006. Multiple cosmopolitan ecotypes within a microbial eukaryote morphospecies. *Protist*, **157**:377–390.

- Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Interference Package) version 3.62a. Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.
- Foissner, W. 1984. Infraciliatur, Silberliniensystem und Biometrie einiger neuer und wenig bekannter terrestrischer, limnischer und mariner Ciliaten (Protozoa: Ciliophora) aus den Klassen Kinetofragminophora, Colpodea und Polyhymenophora. *Stapfia*, **12**:1–165.
- Foissner, W. 1991. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. *Eur. J. Protistol.*, **27**: 313–330.
- Foissner, W. 1993. Colpodea (Ciliophora). G. Fischer, Stuttgart. I–X + 798 p.
- Foissner, W. 1999. Protist diversity: estimates of the near-imponderable. *Protist*, **150**:363–368.
- Foissner, W. 2005. The unusual, lepidosome-coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): transmission electron microscopy and phylogeny. *Acta Protozool.*, **44**:217–230.
- Foissner, W. 2006. Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozool.*, **45**:111–136.
- Foissner, W. & AL-Rasheid, K. 2006. A unified organization of the stichotrichine oral apparatus, including a description of the buccal seal (Ciliophora: Spirotrichea). *Acta Protozool.*, **45**:1–16.
- Foissner, W. & Pichler, M. 2006. The unusual, lepidosome-coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): genesis of four complex types of wall precursors and assemblage of the cyst wall. *Acta Protozool.*, **45**:339–366.
- Foissner, W., Agatha, S. & Berger, H. 2002. Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha region and the Namib Desert. *Denisia*, **5**:1–1459.
- Foissner, W., Chao, A. & Katz, L. 2008. Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista: Ciliophora). *Biodivers. Conserv.*, **17**:345–363.
- Foissner, W., Müller, H. & Weisse, T. 2005. The unusual, lepidosome-coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): light and scanning electron microscopy, cytochemistry. *Acta Protozool.*, **44**:201–215.
- Gächter, E. & Weisse, T. 2006. Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. I. Temperature response. *Aquat. Microb. Ecol.*, **45**:291–300.
- Gächter, E. & Weisse, T. 2008. Long-term acclimation of growth rates in the oligotrich freshwater ciliate *Meseres corlissi*. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, **30** (in press).
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. 1985. Dating of the human–ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, **22**:160–174.
- Hewitt, E. A., Müller, K. M., Cannone, J., Hogan, D. J., Gutell, R. & Prescott, D. M. 2003. Phylogenetic relationships among 28 spirotrichous ciliates documented by rDNA. *Mol. Phylog. Evol.*, **29**:258–267.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**:754–755.
- Jerome, C. A. & Lynn, D. H. 1996. Identifying and distinguishing sibling species in the *Tetrahymena pyriformis* complex (Ciliophora, Oligohymenophorea) using PCR/RFLP analysis of nuclear ribosomal DNA. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **43**:492–497.
- Jerome, C. A., Simon, E. M. & Lynn, D. H. 1996. Description of *Tetrahymena empidokyrea* n. sp., a new species in the *Tetrahymena pyriformis* sibling species complex (Ciliophora, Oligohymenophorea), and an assessment of its phylogenetic position using small-subunit rRNA sequences. *Can. J. Zool.*, **74**:1898–1906.
- Katz, L. A., McManus, G. B., Snoeyenbos-West, O. L. O., Griffin, A., Pirog, K., Costas, B. & Foissner, W. 2005. Reframing the ‘Everything is everywhere’ debate: evidence for high gene flow and diversity in ciliate morphospecies. *Aquat. Microb. Ecol.*, **41**:55–65.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**:111–120.
- Martínez-Abraín, A. 2007. Are there any differences? A non-sensical question in ecology. *Acta Oecol.*, **32**:203–206.
- Medlin, L. K., Elwood, H. J., Stickel, S. & Sogin, M. L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, **71**:491–499.
- Miao, W., Yu, Y., Shen, Y. & Zhang, X. 2004. Intraspecific phylogeography of *Carchesium polypinum* (Peritrichia, Ciliophora) from China, inferred from 18S-ITS1-5.8S ribosomal DNA. *Sci. China (Series C)*, **47**:11–17.
- Müller, H. 2007. Live observation of excystment in the spirotrich ciliate *Meseres corlissi*. *Eur. J. Protistol.*, **43**:95–100.
- Müller, H., Foissner, W. & Weisse, T. 2006. Role of soil in the life cycle of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): experiments with two clonal strains from the type locality, an astatic meadow pond. *Aquat. Microb. Ecol.*, **42**:199–208.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Department of Systematic Zoology, EBC, Uppsala University, Sweden. <http://www.abc.se/~nylander/>.
- Petz, W. & Foissner, W. 1992. Morphology and morphogenesis of *Strobilidium caudatum* (Fromental), *Meseres corlissi* n. sp., *Halteria grandinella* (Müller), and *Strombidium rehwaldi* n. sp., and a proposed phylogenetic system for oligotrich ciliates (Protozoa, Ciliophora). *J. Protozool.*, **39**:159–176.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes3: Bayesian inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**:1572–1574.
- Sachs, L. 1984. *Angewandte Statistik*. 6th ed. Springer, Berlin.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**:406–425.
- Schlegel, M., Elwood, H. J. & Sogin, M. L. 1991. Molecular evolution in hypotrichous ciliates: sequence of the small subunit ribosomal RNA genes from *Onychodromus quadricornutus* and *Oxytricha granulifera* (Oxytrichidae, Hypotrichida, Ciliophora). *J. Mol. Evol.*, **32**:64–69.
- Schmidt, S. L., Ammermann, D. & Schlegel, M. 2006. *Stylonychia lemnae* strains from North American sites differ in a single nucleotide within the small subunit rDNA from Eurasian strains. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**:308–309.
- Snoeyenbos-West, O. L. O., Salcedo, T., McManus, G. B. & Katz, L. A. 2002. Insights into the diversity of choreotrich and oligotrich ciliates (Class: Spirotrichea) based on genealogical analyses of multiple loci. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**:1901–1913.
- Sogin, M. L., Ingold, A., Karlok, M., Nielsen, H. & Engberg, J. 1986. Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major *Tetrahymena* groups. *EMBO J.*, **5**:3625–3630.
- Stoeck, T., Przybos, E., Kusch, J. & Schmidt, H. J. 2000. Intra-species differentiation and level of inbreeding of different sibling species of the *Paramecium aurelia* complex. *Acta Protozool.*, **39**:15–22.
- Strüder-Kypke, M. C. & Lynn, D. H. 2003. Sequence analyses of the small subunit rRNA gene confirm the paraphyly of oligotrich ciliates sensu lato and support the monophyly of the subclasses Oligotrichia and Choreotrichia (Ciliophora, Spirotrichea). *J. Zool. Lond.*, **260**:87–97.
- Strüder-Kypke, M. C., Wright, A.-D. G., Fokin, S. I. & Lynn, D. H. 2000. Phylogenetic relationships of the genus *Paramecium* inferred from small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylog. Evol.*, **14**:122–130.
- Strüder-Kypke, M. C., Wright, A.-D. G., Jerome, C. A. & Lynn, D. H. 2001. Parallel evolution of histophagy in ciliates of the genus *Tetrahymena*. *BMC Evol. Biol.*, **1**:5.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Sinauer, Sunderland, MA.
- Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, **10**:512–526.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, **10**:506–513.
- Weisse, T. 2004. *Meseres corlissi*: a rare oligotrich ciliate adapted to warm water and temporary habitats. *Aquat. Microb. Ecol.*, **37**:75–83.
- Weisse, T. 2006. Freshwater ciliates as ecophysiological model organisms—lessons from *Daphnia*, major achievements, and future perspectives. *Arch. Hydrobiol.*, **167**:371–402.
- Weisse, T. 2008. Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective. *Biodivers. Conserv.*, **17**:243–259.
- Weisse, T. & Rammer, S. 2006. Pronounced ecophysiological clonal differences of two common freshwater ciliates, *Coleps spetai* (Protozoa) and *Rimostrombidium lacustris* (Oligotricha), challenge the morphospecies concept. *J. Plankton Res.*, **28**:55–63.
- Weisse, T., Scheffel, U., Stadler, P. & Foissner, W. 2007. Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater

- ciliate *Meseres corlissi*. II. Response to pH. *Aquat. Microb. Ecol.*, **47**:289–297.
- Weisse, T., Müller, H., Pinto-Coelho, R. M., Schweizer, A., Springmann, D. & Baldringer, G. 1990. Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake. *Limnol. Oceanogr.*, **35**:781–794.
- Wright, A.-D. G. 1999. Analysis of intraspecific sequence variation among eight isolates of the rumen symbiont, *Isotricha prostoma* (Ciliophora) from two continents. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **46**:445–446.
- Wright, A.-D. G., Dehority, B. A. & Lynn, D. H. 1997. Phylogeny of the rumen ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea: Entodiniomorphida) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **44**:61–67.

Received: 11/09/07, 03/03/08; accepted: 03/04/08

Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels

Qinglong L. Wu^{1,2} & Martin W. Hahn¹

¹Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondsee, Austria; and ²Nanjing Institute of Geography & Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, China

Correspondence: Martin W. Hahn, Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria. Tel.: + 43 6232 3125-29; fax: + 43 6232 3578; e-mail: martin.hahn@oeaw.ac.at

Received 11 August 2005; revised 24 November 2005; accepted 28 November 2005.
First published online 7 March 2006.

doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00105.x

Editor: Riks Laanbroek

Keywords

freshwater bacterioplankton; fluorescent *in situ* hybridization; phylogenetic resolution of probes; niche separation; population dynamics; seasonality.

Introduction

Studies employing cultivation-independent techniques revealed several cosmopolitan groups of bacteria specifically inhabiting freshwater, marine or terrestrial habitats (e.g. Morris *et al.*, 2002; Zwart *et al.*, 2002; Schauer & Hahn, 2005). Examples of such groups are the SAR11 clade (Morris *et al.*, 2002) and the *Polynucleobacter* cluster (Zwart *et al.*, 2002; Hahn, 2003), which are exclusively known from marine and freshwater systems, respectively. Most of such cosmopolitan groups represent relatively broad phylogenetic groups, and potentially harbor several undescribed species. Little is known about potential ecological diversification within these phylogenetic groups, and attempts to reveal potential ecological diversification might depend on the phylogenetic resolution of the applied methods. We tested whether the application of tools providing higher phylogenetic resolution was resulting in better insights into the ecology of important freshwater bacteria. We investigated the community structure and dynamics of beta II bacteria

Abstract

The results of ecological studies investigating bacteria by cultivation-independent methods are expected to be influenced by the phylogenetic resolution of the applied molecular tools. This potential influence was investigated in a comparative community study on *Polynucleobacter* cluster bacteria (*Betaproteobacteria*) inhabiting the pelagic of the large, shallow, partially hypertrophic Taihu Lake located in subtropical East Asia, and the deep oligo-mesotrophic Lake Mondsee located in temperate Central Europe. The two contrasting habitats were sampled over the same period of 12 months. The community dynamics were investigated at three phylogenetic levels by fluorescent *in situ* hybridizations with a set of nested probes specific for the beta II clade (including the *Polynucleobacter* cluster), the genus-like monophyletic *Polynucleobacter* cluster, and four species-like subclusters. Subcluster B was the numerically dominating subcluster in both lakes over the investigation periods, but demonstrated different population dynamics in the two habitats. Interhabitat comparisons of the *Polynucleobacter* community structure in the two lakes in the study, and a previously investigated acidic pond indicated ecological diversification within the phylogenetically narrow *Polynucleobacter* cluster. These results could be obtained by help of the subcluster-specific probes, but would have been missed with probes of a lower phylogenetic resolution.

(Glöckner *et al.*, 2000; Burkert *et al.*, 2003) inhabiting two contrasting lakes located c. 10 000 km apart in different climatic zones, with a set of nested fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probes providing three different levels of phylogenetic resolution.

The beta II group (*Betaproteobacteria*) is a relatively broad (91% minimum 16S rRNA gene sequence similarity) group of bacteria (Fig. 1). Most of the sequences affiliated with this group clustered within the monophyletic *Polynucleobacter* cluster (Zwart *et al.*, 2002; Hahn, 2003), which is characterized by a minimum 16S rRNA gene sequence similarity of 95.8%. Members of the *Polynucleobacter* cluster have been detected in climatically and ecologically highly contrasting freshwater habitats including the Arctic Toolik Lake (Crump *et al.*, 2003); Lake Mondsee and other freshwater habitats of the temperate northern hemisphere (e.g. Hiorns *et al.*, 1997; Semenova & Kuznedelov, 1998; Hahn, 2003; Lindström & Bergström, 2004); man-made habitats like Řimov Reservoir (Šimek *et al.*, 2001); Lake Taihu and other habitats in subtropical East Asia (Sekiguchi *et al.*, 2002; Hahn, 2003);

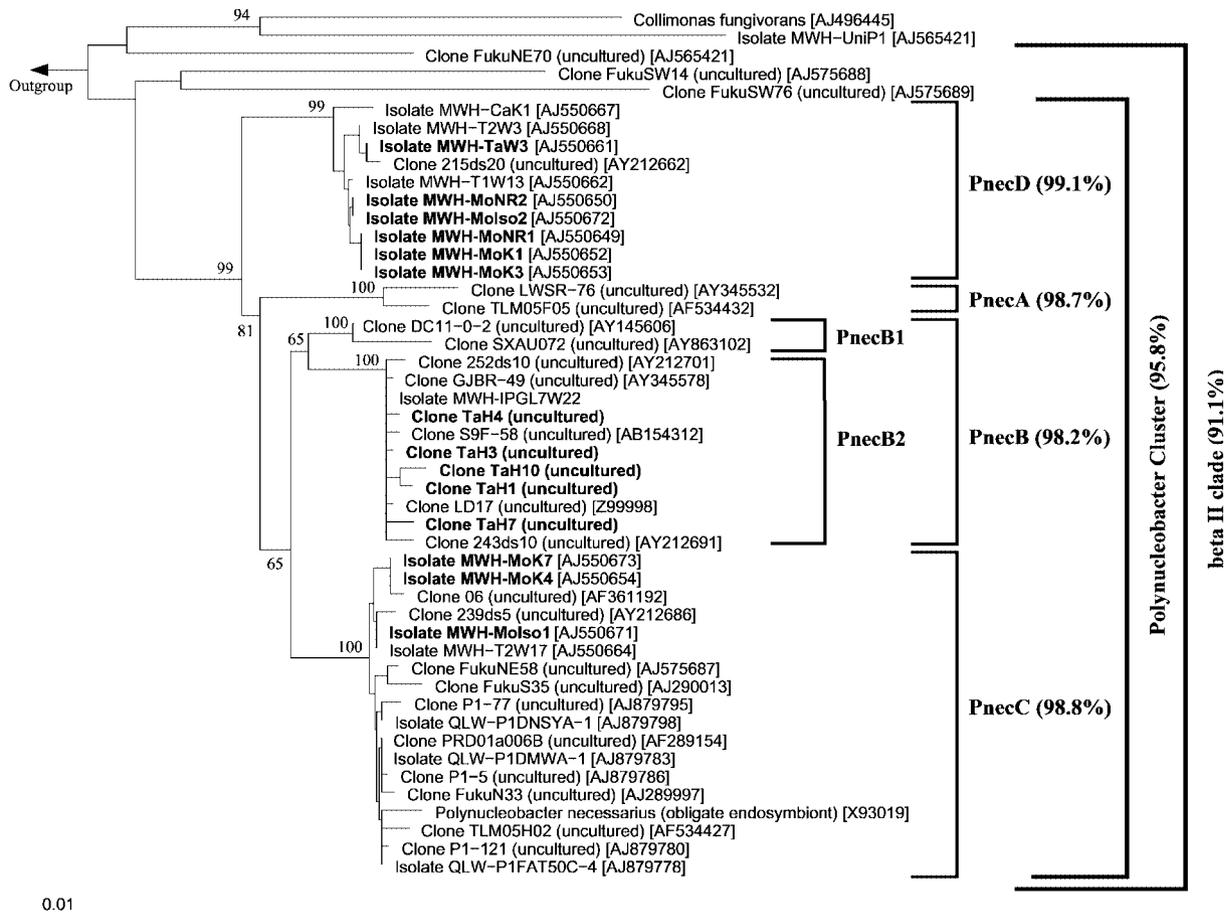


Fig. 1. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic groups targeted by the applied set of nested fluorescence *in situ* hybridization probes. The tree was calculated with sequence fragments of the 16S rRNA genes ranging from sequence position 49–1406 (*Escherichia coli* numbering). The four subclusters (PnecA, PnecB, PnecC, and PnecD), the *Polynucleobacter* cluster, and the beta II clade are indicated by parentheses. The minimum sequence similarity found within these groups is given behind the group names. The sequence of clone SXAU072 was omitted in the calculation of the minimum sequence similarity within subcluster PnecB because of its low sequence quality. Bootstrap (1000 iterations) values > 60% are shown for nodes defining phylogenetic groups. The scale bar indicates 1% estimated sequence divergence. Sequences obtained from bacteria inhabiting the two investigated lakes are shown in bold face. Sequence names containing 'Mo' or 'Ta' originate from bacteria from Lake Mondsee and Taihu Lake, respectively. The PnecB sequences from Taihu Lake were obtained by amplification with PnecB-specific primers.

freshwater habitats at the Hawaiian archipelago (Donachie *et al.*, 2004); tropical Lake Victoria (East Africa) (Hahn, 2003); freshwater habitats located in the temperate southern hemisphere (M.W. Hahn, unpublished data); and in Antarctic freshwater habitats (Pearce *et al.*, 2003).

The *Polynucleobacter* cluster consists of at least four subclusters (PnecA, PnecB, PnecC, and PnecD), which represent monophyletic species-like groups characterized by minimum 16S rRNA gene similarities > 98% (Hahn, 2003). *Polynucleobacter necessarius*, the sole described species in the genus, is affiliated to PnecC, and represents endosymbionts of the benthic ciliate *Euplotes aediculatus* (Heckmann & Schmidt, 1987). Recently, other endosymbiotic *Polynucleobacter* sp. strains affiliated to PnecC were reported from another *Euplotes* species (Vannini *et al.*,

2005). In contrast to the previously investigated *Euplotes aediculatus*, the second *Euplotes* species (*Euplotes harpa*) harboring *Polynucleobacter* endosymbionts inhabits brackish water habitats and has so far not been detected in freshwater systems (Vannini *et al.* 2005). On the other hand, the occurrence of PnecC bacteria as free-living cells in the pelagic of a freshwater habitat was demonstrated by FISH (Hahn *et al.*, 2005). Currently, it is not known if PnecC bacteria possess a complex lifestyle with endosymbiotic and free-living stages, or if obligately endosymbiotic and obligately free-living strains are affiliated to the same species-like phylogenetic group. No *in situ* detections by FISH or detailed information about the lifestyles of members of the other three *Polynucleobacter* subclusters have been published. Therefore, it is not known whether members of the

same subcluster possess a similar autecology, nor if there are relevant differences in the ecology of *Polynucleobacter* strains affiliated with different subclusters. Pure cultures of strains affiliated to subclusters PnecC and PnecD were recently established (Hahn, 2003), while cultivation of PnecB and PnecA strains in pure culture have not been reported.

Materials and methods

Study sites and sampling

Taihu Lake is the third largest lake in China. It is located between 30°55'–31°32' N and 119°52'–120°36' E in the subtropical Yangtze River delta plain. The lake is shallow, and its trophic status ranges from eutrophic (central part of the lake) to hypertrophic (some bays). The lake was sampled at a station located in the hypertrophic Meiliang Bay. Lake Mondsee is a pre-alpine deep oligo-mesotrophic lake located in Austria (47°50' N, 13°20' E). The lake was sampled at a station located in the central part of the lake. Surface waters (Taihu, 0.5 m depth; Mondsee, 1 m depth) of both lakes were sampled at fortnightly intervals from September 2002 to September 2003. Lake Mondsee could not be sampled during a period of permanent ice-cover in February 2003. Several chemical and physical parameters were measured using standard methods (Greenberg *et al.*, 1992).

Determination of microbial numbers

Samples for the determination of total bacterial numbers were fixed with formaldehyde (2% final concentration). Subsamples of 1 or 2 mL were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.1% weight in volume, final concentration), filtered onto black 0.2 µm-pore-size Nuclepore filters (Millipore, Vienna, Austria) and counted under UV

excitation at a 1250-fold magnification using an epifluorescence microscope.

Isolation of a PnecB strain

Many isolation experiments were performed in order to isolate a broad diversity of *Polynucleobacter* bacteria. Water samples from many ecologically diverse freshwater habitats located on four continents were used for these experiments (Hahn, 2003; Hahn *et al.*, 2003). All experiments were performed using the standard protocol of the filtration acclimatization method (Hahn *et al.*, 2004). The obtained PnecB isolate was used for development and testing of PnecB-specific FISH probes and PCR primers.

Development of probes for FISH

A set of eight probes (Table 1), including three newly developed probes, was used for the investigation of the *Polynucleobacter* community structure. The new probes were designed and evaluated as described previously (Hahn *et al.*, 2005). In the case of probe PnecB-23S-166, the determination of stringent hybridization conditions was performed with paraformaldehyde-fixed cells from isolates, which were targeted (isolate MWH-IPGL7W22) or not targeted (PnecC and PnecD strains) by the probes. Fluorescence intensities of hybridized cells were analyzed in experiments with series of increasing concentrations of formamide in the hybridization buffer. In the case of the two probes (PnecA1-151 and PnecA2-151) targeting PnecA bacteria, no cultivated strains targeted by the probe were available for the determination of stringent hybridization conditions. Therefore, we used samples from Swedish habitats, in which PnecA bacteria have been detected previously (Zwart *et al.*, 2003), for determination of stringent conditions. Even hybridizing of these

Table 1. Cluster- and subcluster-specific oligonucleotide probes for investigation of *Polynucleobacter* bacteria by nested fluorescent in situ hybridization

Probe	Specificity	Probe sequences	Targeted site*	% FA†	Reference
BET2-870	Beta II clade (including the <i>Polynucleobacter</i> cluster)‡	5'-CCCAGGCGGCTGACTTCA-3'	16S (870–888)	35	Burkert <i>et al.</i> (2003)
PnecABD-445	Subclusters PnecA, PnecB, and PnecD§	5'-GAGCTGCTGTTTCTTCCC-3'	16S (445–463)	35	Hahn <i>et al.</i> (2005)
PnecC-445	Subcluster PnecC§	5'-GAGCCGGTGTTTCTTCCC-3'	16S (445–463)	35	Hahn <i>et al.</i> (2005)
PnecD1-181	Part of subcluster PnecD	5'-TTTCCCCTAAGGGATT-3'	16S (181–197)	15	Hahn <i>et al.</i> (2005)
PnecD2-181	Other part of subcluster PnecD	5'-TTTCCCCTTAGGGATT-3'	16S (181–197)	15	Hahn <i>et al.</i> (2005)
PnecA1-151	Part of subcluster PnecA¶	5'-TTACCGCAACTTTCGCTG-3'	16S (151–169)	15**	This study
PnecA2-151	Other part of subcluster PnecA¶	5'-TTATCGCAACTTTCGCTG-3'	16S (151–169)	15**	This study
PnecB-23S-166	Subcluster PnecB††	5'-GTTTCGCTCCACACACCCT-3'	23S (166–182)	40	This study

**Escherichia coli* numbering.

†Percentage of formamide (FA) in hybridization buffer.

‡Probe BET2-870 does not match with sequences of clone DC11-0-2 and clone SXAU072 (both belong to PnecB; Fig. 1).

§Probes PnecABD and PnecC cover together the entire *Polynucleobacter* cluster.

|| Probes PnecD1-181 and PnecD2-181 cover together the entire subcluster PnecD.

¶Probes PnecA1-151 and PnecA2-151 cover together the entire subcluster PnecA.

**Most likely nonstringent hybridization conditions.

††It is not known if the probe covers the part of subcluster PnecB, which is represented by clone DC11-0-2 and clone SXAU072 (Fig. 1).

Table 2. Primers developed for PnecB-specific amplification of fragments of the 16S rRNA gene (nested PCR), as well as long fragments of the ribosomal operon including almost complete 16S rRNA genes, complete ITS sequences, and partial 23S rRNA genes

Primer	Type	Sequences (5'–3')	Target (position)*	Annealing temp. (°C)	Specificity
PnecAll-52F [†]	Forward	CAC ATG CAA GTC GAA CGG CAG CAC	16S rDNA (52–75)	66	Many bacteria
PnecPlus-876R [†]	Reverse	CGT ACT CCC CAG GCG GCY G	16S rDNA (876–894)	66	> Beta II [‡]
PnecB-151F [§]	Forward	AAC GCA GCG AAA GTT GCG C	16S rDNA (151–170)	65	PnecB
PnecPlus-848R [§]	Reverse	GCG TTA GCT ACG TTA CTG AGA	16S rDNA (848–868)	65	> Beta II [‡]
PnecB23S-R [¶]	Reverse	ACA ACA TTT AGC AGA ACG GAA TG	23S rDNA	55	PnecB**
19F [¶]	Forward	MTG GCT CAG ATT GAA CGC T	16S rDNA (19–37)	55	Many bacteria

*Corresponding to sequence position in the *Escherichia coli* 16S rRNA gene.

[†]Nested PCR for detection of PnecB bacteria: first primer pair.

[‡]Beta II clade (Burkert et al., 2003) and some more phylotypes.

[§]Nested PCR for detection of PnecB bacteria: second primer pair.

[¶]Primer pair for specific amplification of large fragments of the ribosomal operon of PnecB bacteria.

^{||}Target position is c. 100 bp upstream of the 5'-end of the 23S rRNA gene.

**Owing to the availability of only a single 23S rRNA sequence of a PnecB bacterium it is not certain if this primer targets all members of the PnecB subcluster.

samples with 0% formamide did not result in detection of hybridized cells. Owing to this lack of appropriate target cells, we were not able to determine the stringent hybridization conditions. In order to get hints on the potential presence of PnecA bacteria in the two investigated lakes, samples were hybridized at low formamide concentrations of 15%. These hybridization conditions are most likely nonstringent, because hybridization of samples from a pond, in which *Polynucleobacter* bacteria could not be detected by probes Beta2-870 and PnecABD-445, resulted in hybridization of bacteria. Hybridization of samples from Lake Mondsee and Taihu Lake with the two PnecA-targeted probes under these most likely nonstringent conditions resulted in no detection of hybridized cells.

Analysis of samples by FISH

Subsamples (5 mL, Taihu Lake; 20 mL Lake Mondsee) were fixed with paraformaldehyde solution [2% (weight in volume) final concentration] at room temperature for 2–4 h. After fixation, samples were filtered onto 0.2 µm-pore-size Isopore membrane filters (47 mm; Millipore), rinsed with PBS buffer and sterile Milli-Q water, dried at room temperature, and stored at –20 °C. Probes used for the investigation of the *Polynucleobacter* community structure (Table 1) were purchased as Cy3-monolabeled oligonucleotides (Thermo Electron, Ulm, Germany). The abundance of beta II bacteria, PnecC bacteria, PnecB bacteria were determined with probe BET2-870, PnecC-445, and PnecB-23S-166, respectively. The total abundance of *Polynucleobacter* bacteria was determined by summation of abundance of PnecC and PnecABD, which were determined by probes PnecC-445 and PnecABD-445. For determination of PnecD abundance hybridization with equal mixtures of probes PnecD1-181, and PnecD2-181 were performed. In a similar way, determination of PnecA abundance was tried using

equal mixtures of probes PnecA1-151 and PnecA2-151. Additionally, hybridizations of samples from both lakes with probe Eub338 targeting most bacteria were performed. The hybridizations and analyses were performed according to the protocol by Alfreider *et al.* (1996).

Confirmation of the presence of PnecB in water samples from the two lakes by PCR

Two independent PCR protocols for specific amplification of fragments of the ribosomal operons of PnecB bacteria were developed. The first PCR protocol, a nested PCR, used forward and reverse primers specifically targeting the 16S rRNA gene of PnecB bacteria. Primers PnecAll-52F and PnecPlus-876R were used in the first PCR step, and primers PnecB-151F and PnecPlus-848R in the second step of the nested PCR (Table 2). The second PCR protocol for detection of PnecB bacteria used a relatively unspecific forward primer (19F) targeting the 5'-end of the 16S rRNA gene and a PnecB-specific reverse primer (PnecB23S-R) targeting a sequence position in the 23S rRNA gene. The first PCR protocol results in fragments of c. 700 bp, and the second protocol yields fragments of c. 2300 bp. The design of the primers for the nested PCR is based on a large number of publicly available sequences from PnecB bacteria, whilst the design of the second PnecB-specific PCR is based on only a single 23S rRNA sequence (isolate MWH-IPGL7W22). Therefore, it was not known if this PCR targets the entire PnecB subcluster or only a fraction of it. The nested PCR amplifying partial 16S rRNA genes was used to confirm FISH results, demonstrating the presence of PnecB bacteria in samples of both investigated lakes. The second PCR amplifying fragments of the ribosomal operon, including the position of the target site of the PnecB-specific FISH probe PnecB-23S-166, was used to confirm the presence of

the target sequence of this FISH probe in *PnecB* bacteria inhabiting the two lakes.

The PCR conditions for both PCR protocols were optimized with a gradient temperature cyler and template DNA from cultivated target and nontarget organisms or plasmid DNA containing cloned 16S rRNA genes. PCR conditions were: 2 mM MgCl₂, 200 μM of each deoxyribonucleotide triphosphate, 200 nM of each primer, 2–10 ng of template DNA, and 1.25 U of Taq DNA polymerase; pre-incubation at 94 °C for 3 min; 30 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at the respective temperature for 1 min, and extension at 72 °C for 1 or 2.5 min; and in the final extension 72 °C for 10 min.

For extraction of DNA from lake water 150–500 mL samples were filtered onto 0.2 μm-pore-size Isopore (Millipore) filters. Samples for extraction of DNA and FISH analysis were taken in parallel. DNA was extracted with the FastDNA kit and the FastPrep instrument [Q-Biogene (MP Biomedicals), Heidelberg, Germany]. PCR Products were analyzed by cloning and sequencing. In a few cases direct sequencing of the amplified *c.* 700 bp fragments of the 16S rRNA genes was performed. In total four clone libraries for samples from Lake Mondsee (13 May, 10 June, and 24 June 2003) and Taihu Lake (17 February 2003) were established by cloning PCR products into pDrive cloning vectors (Qiagen, Hilden, Germany). The libraries were screened with restriction enzyme *EcoNI*, and one to five clones of each library were selected for sequencing.

Statistics

Redundancy analysis (RDA) (Stewart & Love, 1968) was used for revealing the major environmental variables controlling the dynamics of the beta II bacteria, *Polynucleobacter* cluster bacteria, and subcluster *PnecB* and *PnecC* bacteria. The absolute numbers of the respective bacterial groups were used for the RDA analysis. The tested environmental variables were water temperature, pH, chlorophyll *a*, total phosphorus, conductivity, Secchi depth, and phytoplankton biomass. All data were log(*x*+1) transformed. The RDA was performed with the software CANOCO 4.5 (SCIENTIA Software, Budapest, Hungary) by assuming linear species-environment relationships. A linear model was chosen because DCA (Detrended Correspondence Analysis) run on abundance data of the different bacterial groups indicated that the length of the first axis was less than two (ter Braak & Verdonschot, 1995). The variables best describing the bacterial dynamics were identified by forward selection. Explanatory variables were added until addition of further variables did not result in significant (*P* < 0.05) improvements in the model's explanatory power. This was assessed in permutation tests with 499 unrestricted Monte Carlo permutations. The statistical analyses were performed separately for data of Lake Mondsee and Taihu Lake.

Nucleotide sequences

The 16S rRNA gene sequences of the isolate MWH-IPGL7W22 (*PnecB*) and of the cloned environmental sequences have been deposited under the accession numbers AJ876403–AJ876406, and AM072345–AM072349.

Results

Isolation of a *PnecB* strain

Only a single strain (MWH-IPGL7W22) affiliated with *PnecB* was found amongst the *c.* 80 *Polynucleobacter* strains, which were isolated by us in the past 4 years. The *PnecB* strain was isolated from a eutrophic artificial lake near Katmandu, Nepal. The isolated strain is characterized by a small cell size and a C-shaped morphology. The 16S rRNA gene of the isolate possessed a sequence similarity of 99.7% with the environmental clone 243ds10 (Fig. 1) obtained from polluted Shepherds Creek, USA (Simpson *et al.*, 2004).

Ecological characteristics of Taihu Lake and Lake Mondsee

The two compared lakes differ strongly in their size and morphometry (Table 3). The differences in depths resulted in differences in the structure of the water columns between the two lakes. Lake Mondsee is permanently stratified during the warmer seasons, while Taihu Lake is almost permanently mixed. In the study presented here, we compared the *Polynucleobacter* communities in the surface waters of the two lakes. The investigated water samples were, in the case of Taihu Lake, representative for the entire water

Table 3. Main environmental characteristics of Taihu Lake and Lake Mondsee during the investigation period (September 2002–September 2003)

Parameters	Lake Taihu	Lake Mondsee
Climate zone	Subtropical	Temperate
Surface area (km ²)	2338	13.78
Mean depth (m)	1.9	37
Maximum depth (m)	2.6	68
Catchment area (km ²)	36500	247
Retention time (year)	0.7	1.8
Chlorophyll <i>a</i> (μg L ⁻¹)	20.8 (1.7–52.0)	3.4 (1.4–7.4)
Total phosphorus (μg L ⁻¹)	105 (39–213)	9.8 (6.6–12.2)
Orthophosphate (μg L ⁻¹)*	6.0 (0.0–21.0)	0.0 (0.0–0.18)
Total nitrogen (mg L ⁻¹)	3.96 (1.52–10.92)	0.22 (0.17–0.28)
pH	8.4 (8.0–9.0)	8.6 (8.2–9.2)
Water temperature (°C)	(4.3–30.0)	(3.5–25.0)
Conductivity (μs cm ⁻¹)	457 (380–570)	324 (294–351)
COD _{mn} (mg L ⁻¹)	7.6 (4.6–34.2)	ND [‡]

Yearly ranges of some of the parameters are given in parentheses.

*Zero values, below detection limit.

ND, not determined; COD, chemical oxygen demand.

column, whilst in the case of Lake Mondsee they were representative for the epilimnetic water layer. The two lakes differ strongly in many ecologically relevant parameters, for instance in trophic status, which is demonstrated by concentrations of major nutrients, chlorophyll *a* concentrations (Table 3), and total bacterial numbers (Fig. 2).

FISH with cluster and subcluster-specific probes

Application of the subcluster-specific probes resulted in the detection of bacterial cells affiliated to subclusters PnecB, PnecC, and PnecD in samples of both lakes. All detected cells appeared as single freely suspended cells, and no hints on endosymbiotic stages were observed. Furthermore, attachment of *Polynucleobacter* cells to suspended particles, which were abundant in the water column of Taihu Lake, was not observed. The cells detected by FISH were relatively small in size, and no pronounced subcluster-specific differences in cell size were observed.

The seasonal dynamics and structures of the *Polynucleobacter* communities in the two investigated lakes, as revealed by a set of nested FISH probes, are presented in Figs 3 and 4. Maximal relative abundances detected with the phylogenetically broadest probe (BET2-870) were 6.9% in Lake Mondsee and 3.5% in Taihu Lake; however, absolute cell numbers were usually higher in Taihu Lake than in Lake Mondsee (Fig. 3). Relative abundances of beta II bacteria were in both lakes very similar to relative abundances of *Polynucleobacter* cluster bacteria determined with probes PnecABD-445 and PnecC-445 together (Fig. 5a). The majority of the *Polynucleobacter* cells in Taihu Lake were contributed by subclusters PnecB and PnecC (Fig. 4). Subcluster PnecD contributed only a small fraction and hints on the presence of PnecA bacteria were not obtained. In Lake Mondsee, the *Polynucleobacter* community was dominated by subcluster PnecB. Members of subclusters PnecC and PnecD could be detected, but contributed minimally to the entire *Polynucleo-*

bacter community, and PnecA cells could also not be detected in Lake Mondsee. The *Polynucleobacter* communities of the two lakes had in common the dominance of subcluster PnecB, but differed in the relative contribution of PnecC bacteria (Fig. 4), as well as in temporal aspects of the community dynamics (Fig. 3). The absolute abundance of PnecC bacteria was always less than 10% of PnecB bacteria in Lake Mondsee, but increased above 40% in Taihu Lake during the period from December to March. The *Polynucleobacter* community peaked in Taihu Lake in mid winter but in Lake Mondsee in early summer.

Probe PnecB-23S-166 targeting subcluster PnecB yielded in both lakes an average 82% of the relative abundances determined by probe PnecABD-445 (Fig. 5b). Theoretically, the difference between results by probes PnecABD-445 and PnecB-23S-166 is expected to match to the sum of results obtained by PnecD- and PnecA-specific probes. However, the total relative abundances determined for PnecD and PnecA populations were in both lakes too small to explain the observed difference in results by probes PnecB-23S-166 and PnecABD-445.

Comparison of the data for the entire *Polynucleobacter* cluster (sum of PnecABD and PnecC) with the sum of data determined by subcluster-specific probes also indicates an underestimation of at least one subcluster (Fig. 4). This potential underestimation was in the case of Taihu Lake an average 20.6%, and in the case of Lake Mondsee 11.4% of the *Polynucleobacter* community.

Seasonality of PnecB and PnecC populations

The PnecB and PnecC populations showed different seasonal dynamics in the two investigated lakes, as well as in a previously investigated acidic pond (Hahn *et al.*, 2005). The PnecB population peaked during the warm season in Lake Mondsee, during the cold season in Taihu Lake, and was permanently absent in the pond (Hahn *et al.*, 2005). In Taihu Lake the PnecB numbers were on average 3.2-fold higher ($P < 0.05$, Student's *t*-test) during the period with water temperatures lower than 10 °C, whilst the population in Lake Mondsee was on average 3.3 times larger ($P = 0.001$, Student's *t*-test) during the warmer period (greater than 10 °C) than during the colder period. The PnecC population peaked in the previously investigated pond during autumn (Hahn *et al.*, 2005), in Taihu Lake during winter, and in Lake Mondsee seasonality could not be observed.

Verification of the presence of PnecB bacteria by PCR

The nested PCR for PnecB-specific amplification of *c.* 700 bp-long fragments of 16S rRNA genes was used for detection of PnecB bacteria in several water samples. The PCR produced in all investigated samples fragments of the

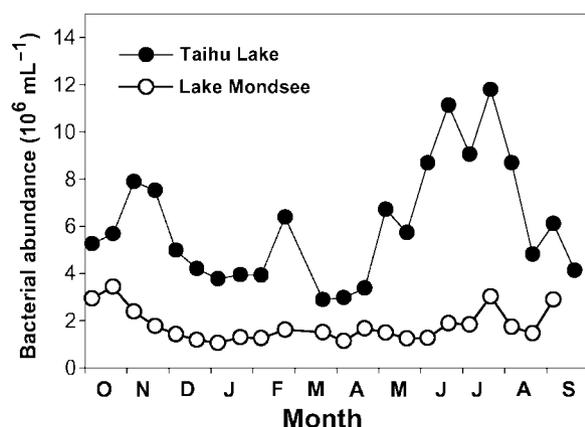


Fig. 2. Total bacterial numbers in Taihu Lake (●) and Lake Mondsee (○) in the period from October 2002 to September 2003.

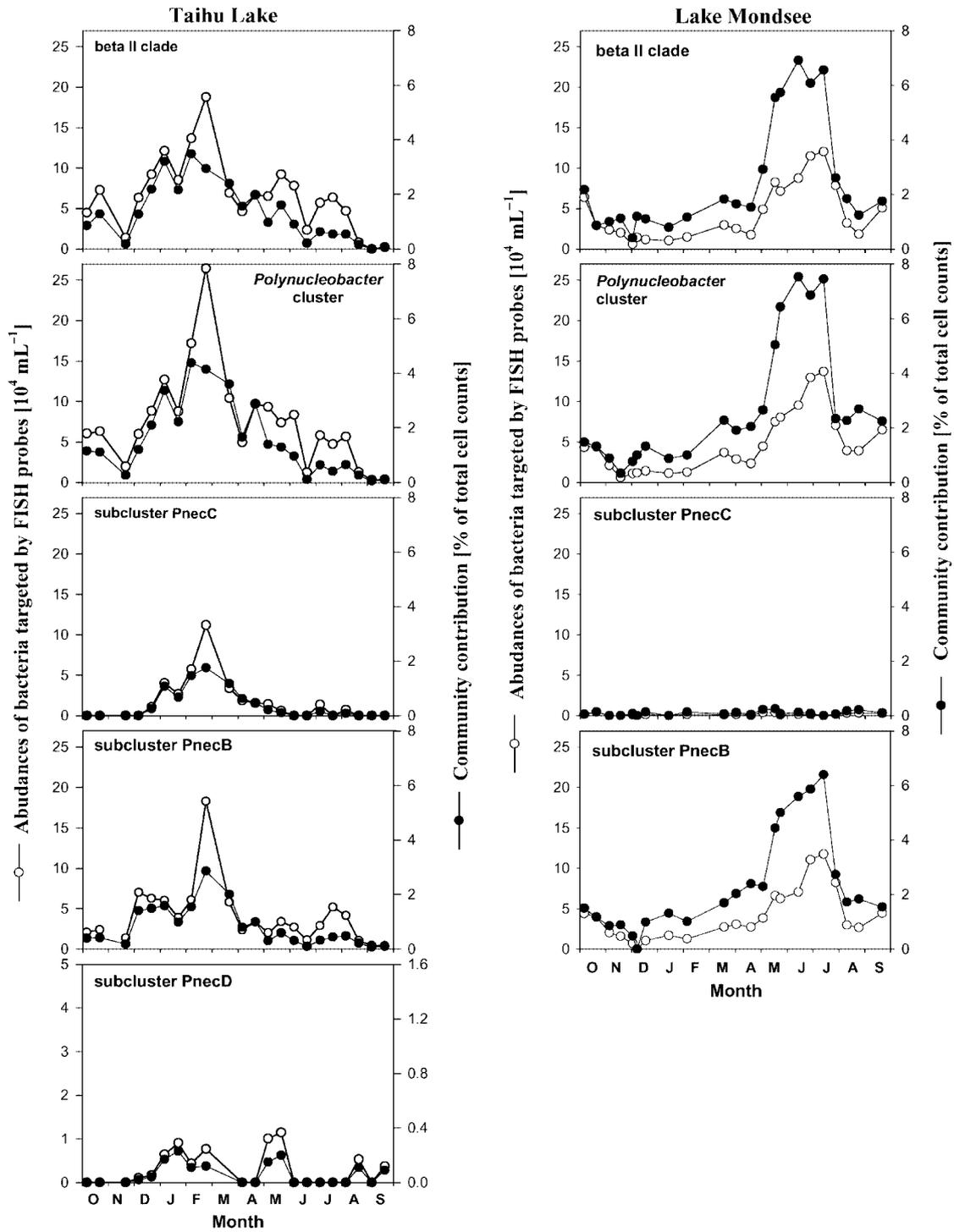


Fig. 3. Seasonal dynamics of beta II clade bacteria (probe BET2-870), *Polynucleobacter* cluster bacteria (probes PnecABD-445 and PnecC-445), and bacteria affiliated with the *Polynucleobacter* subcluster PnecC (probe PnecC-445), subcluster PnecB (probe PnecB-235-166), and subcluster PnecD (combined probes PnecD1-181/PnecD2-181). The combined probes PnecA1-151/PnecA2-151 (specific for subcluster PnecA) did not detect any cells in several investigated samples. The combined probes specific for subcluster PnecD were applied to samples of both lakes but detected only in Taihu Lake significant cell numbers. Note the five times smaller scale of the graph presenting results for PnecD. FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

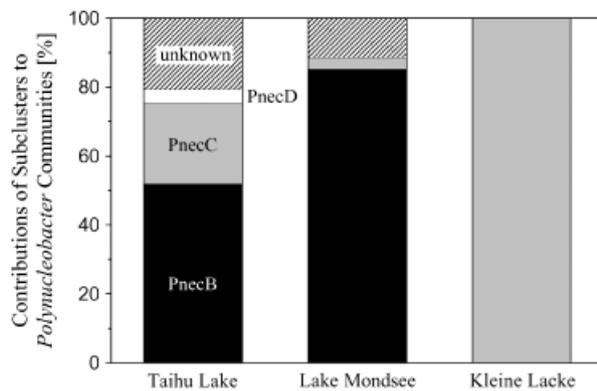


Fig. 4. Contribution of subcluster populations to *Polynucleobacter* communities in Lake Mondsee, Taihu Lake, and the acidic pond Kleine Lacke. Average data of 12-month periods are shown. The data of the pond Kleine Lacke were taken from Hahn *et al.* (2005). The fractions 'unknown' represents the gap between total number of *Polynucleobacter* bacteria and the sum of subclusters PnecB, PnecC, and PnecD, respectively. Note that PnecD bacteria were detected in Lake Mondsee by nested fluorescence *in situ* hybridization, but numbers were too low for quantification, and that PnecA bacteria were not detected in any of the three habitats.

expected length. Cloning and sequencing of PCR products resulted in PnecB sequences clustering within subcluster PnecB (data not shown). The obtained partial 16S rRNA sequences were 99.4–99.6% identical with the sequence of clone GLBR-49 (Fig. 1), which was obtained from a Hawaiian Lake (Donachie *et al.*, 2004). The second PCR for PnecB-specific amplification of longer fragments of the ribosomal operon also generated in all investigated samples amplicons of the expected length. Cloning and sequencing of products resulted in five sequences clustering within the subcluster PnecB (Fig. 1). All five sequences contained the target sequence of the PnecB-specific probe PnecB-23S-166, which is located in the 23S rRNA gene.

Environmental variables related to the observed bacterial dynamics

The RDA model calculated with data of Lake Mondsee explained 62.8% of the variability in abundance of the investigated bacterial groups. Conductivity and pH were found to explain best the variations (Fig. 6). The first axis of the model explained 59.4% (eigenvalue) of the variations, and showed a higher canonical correlation with pH ($r=0.79$) than with conductivity ($r=-0.33$). The second axis of the model explained only 3.4% (eigenvalue) of the observed variation.

The RDA model calculated with data of Taihu Lake explained 44.4% (eigenvalue) of the observed variations of bacterial groups (Fig. 7). Water temperature was found the only variable significantly explaining a part of the variation in the abundances of the investigated bacterial groups in

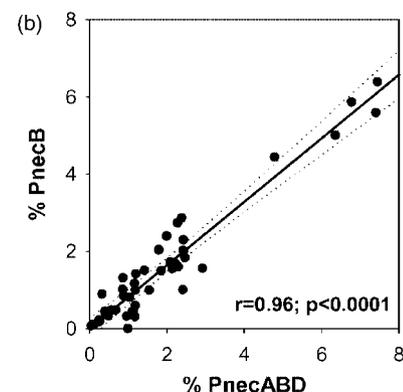
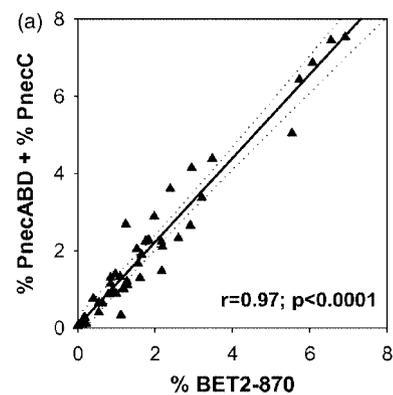


Fig. 5. (a) Relationships between detection by probe BET2-870 (beta II clade) and the sum of detections by probes PnecABD-445 plus PnecC-445 (entire *Polynucleobacter* cluster). (b) Comparison of detections by probe PnecABD-445 (covering the three subclusters PnecA, PnecB, and PnecD) and probe PnecB-23S-166 (covering subcluster PnecB). Both graphs represent combined data sets from Lake Mondsee and Taihu Lake. The 99% confidence intervals are shown as dotted lines.

Taihu Lake. This parameter correlated negatively with axis 1 of the model ($r=-0.71$).

The populations of PnecC and PnecB bacteria showed in RDA of both lakes differences in their relationships to the environmental variables best explaining the variability of the bacterial groups (Figs 6 and 7). In both lakes, the PnecB populations, the entire *Polynucleobacter* community, and the beta II community showed very similar relationships to the most important environmental variables. In both lakes, PnecC bacteria differed in their relationships to the most important environmental variables from the other three investigated taxa (Figs 6 and 7).

Discussion

Although *Polynucleobacter* bacteria have been frequently detected by nonquantitative molecular methods in a broad spectrum of freshwater habitats (e.g. Bahr *et al.*, 1996; Hiorns *et al.*, 1997; Crump *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Eiler & Bertilsson, 2004), only little is known about

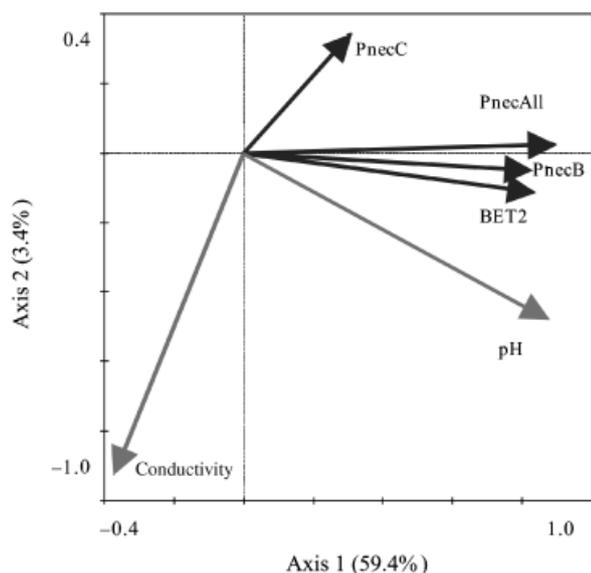


Fig. 6. Redundancy analysis biplot based on data from Lake Mondsee showing the different bacterial groups in relation to the identified strongest environmental variables. The analyzed bacterial groups were the beta II clade (BET2), the entire *Polynucleobacter* cluster (PnecAll), subcluster PnecB (PnecB), and subcluster PnecC (PnecC). The eigenvalues of the two axes are given in parentheses.

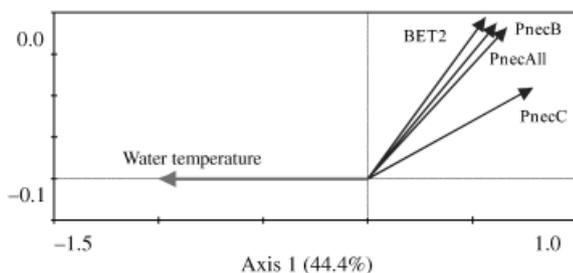


Fig. 7. Redundancy analysis biplot based on data from Taihu Lake showing the different bacterial groups in relation to the identified strongest environmental variable. The analyzed bacterial groups were the beta II clade (BET2), the entire *Polynucleobacter* cluster (PnecAll), subcluster PnecB (PnecB), and subcluster PnecC (PnecC). The eigenvalue of the only significant axes is given in parentheses.

their lifestyle (i.e. free-living vs. endosymbiotic). Furthermore, knowledge regarding their relevance in different types of freshwater habitats, *in situ* cell numbers, community structure, and seasonal dynamics is very limited (Burkert *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2005). Finally, nothing is known about potential ecological diversification within the *Polynucleobacter* cluster. We investigated these aspects in two contrasting freshwater habitats, which differ strongly in their trophic status, size, maximum and average depth, phytoplankton composition, climate, etc.

Our investigation provided first insights in the ecology of *Polynucleobacter* bacteria affiliated with subclusters PnecB

and PnecD. Evidence for a free-living, planktonic lifestyle of bacteria affiliated to these two subclusters was obtained; however, we cannot exclude that these bacteria possess a complex life history including endosymbiotic stages. Furthermore, our data demonstrate that, besides PnecC bacteria (Hahn *et al.*, 2005), members of other *Polynucleobacter* subclusters also can occur in relatively high numbers in freshwater habitats.

High relative abundances of *Polynucleobacter* bacteria affiliated with subcluster PnecB

The observed high relative abundance of bacteria affiliated to the species-like subcluster PnecB in Lake Mondsee is of relevance in the debate on the estimation of the bacterial diversity in different types of habitats (Curtis *et al.*, 2002). Curtis and coauthors proposed estimation of the diversity of a bacterial community using only the two parameters: total number of individuals in the community, and the abundance of the most abundant members of the community. Thus far, however, only a few data on the relative abundance of numerically important bacterial species or species-like taxa were reported, while much more data are available for large phylogenetic groups of bacteria (e.g. Morris *et al.*, 2002; Burkert *et al.*, 2003; Kirchman *et al.*, 2005). In general, it is assumed that the majority of bacterioplankton species comprise $\leq 1\%$ of total bacterial numbers (Curtis *et al.*, 2002; Gich *et al.*, 2005), and only in a few cases higher relative abundances have been reported for species-like groups of bacteria. For instance, contributed *Polynucleobacter* bacteria affiliated with the species-like subcluster PnecC up to 60% (annual average abundance *c.* 25%) of bacterioplankton in a small humic pond (Hahn *et al.*, 2005). Gich and coauthors determined for a species-like group of *Alphaproteobacteria* by dot blot hybridization a relative abundance of 2% (Gich *et al.*, 2005). Schauer *et al.* (2005) reported for the species-like LD2 group (*Bacteroidetes*) maximum relative abundance of 6.9% of the total bacterial, while the average relative abundance of this group over all 115 investigated habitats was 0.5%. The comparison of the maximum and average relative abundances determined for the species-like PnecB populations in Lake Mondsee and Taihu Lake with the above mentioned data for other species-like groups indicated that PnecB bacteria contributed relatively large fractions of the bacterioplankton in the investigated lakes. However, the relative and absolute abundances of PnecC bacteria observed in the humic pond were higher than those of PnecB bacteria in Lake Taihu and Mondsee. Currently, it is not known if relative abundances of greater than 1% reported for a few species-like groups are exceptional cases or if such relative abundances are a general phenomena in freshwater bacterioplankton. More data on the relative contribution of predominant bacterial groups to

the total bacterioplankton are needed for a deeper understanding of the bacterial diversity in the pelagic of aquatic ecosystems.

Ecological relevance of beta II bacteria outside of the *Polynucleobacter* cluster

The beta II clade-specific probe BET2-870 (Burkert *et al.*, 2003), targets the entire *Polynucleobacter* cluster (Zwart *et al.*, 2002; Hahn, 2003) and five environmental sequences outside of this cluster. These five sequences were all obtained from the acidic Lake Große Fuchskuhle (Burkert *et al.*, 2003). The comparison of detections by probe BET2-870 with the sum of detections by probes PnecABD-445 and PnecC-445 (Fig. 5a), which cover together the entire *Polynucleobacter* cluster, indicated that beta II clade bacteria outside of the *Polynucleobacter* cluster do not play a numerically significant role in the water column of the two investigated lakes. The large ratio of published beta II sequences affiliated with the *Polynucleobacter* cluster (> 100 environmental 16S rDNA gene sequences) to published beta II sequences outside of the *Polynucleobacter* cluster (five environmental 16S rDNA gene sequences) may indicate that the later group is in general not of significant numerical importance in freshwater habitats investigated so far.

Potential underestimation of subcluster populations by FISH

The comparisons of data obtained by the nested probes indicated an underestimation of numbers of at least one subcluster (Figs 4 and 5). The difference in results obtained by probes PnecABD (targeting subclusters PnecA, PnecB, and PnecD) and PnecB (Fig. 5b) cannot be explained by the results obtained for subclusters PnecD and PnecA. This lack of match may indicate either an underestimation of the PnecB population by the 23S rRNA targeted probe PnecB-23S-166, or an underestimation of PnecA and/or PnecD populations by the respective 16S rRNA gene targeted probes. The former seems to be more likely, because only six partial 23S rRNA sequences of PnecB sequences are currently available, while the specificity of the PnecD and PnecA-specific probes is confirmed by large sets of 16S rRNA gene sequences. All six PnecB sequences matching to probe PnecB-23S-166 are affiliated with the PnecB2 branch of subcluster PnecB (Fig. 1). Thus, it is not known if the probe also targets the second branch (PnecB1) of the subcluster. Further investigations have to reveal if the subcluster PnecB populations were underestimated in our FISH analysis.

Another potential explanation of the lower detections at the subcluster level, could be the existence of a so far undiscovered fifth *Polynucleobacter* subcluster; however, this alternative seems to be unlikely due to the large number of

published environmental sequences affiliated with the *Polynucleobacter* cluster.

Ecological diversification within the *Polynucleobacter* cluster

Quantitative data on the structure of *Polynucleobacter* communities have been presented before only for a community inhabiting an acidic pond (Hahn *et al.*, 2005). In this habitat the *Polynucleobacter* community comprised up to 60% of total bacterioplankton but consisted exclusively of PnecC strains (Fig. 4). In contrast, the *Polynucleobacter* communities of Lake Mondsee and Taihu Lake consisted of strains from at least three subclusters (PnecB, PnecC, and PnecD). The coexistence of members affiliated with different *Polynucleobacter* subcluster in the same habitat is also confirmed by previous studies employing nonquantitative methods (e.g. Hiorns *et al.*, 1997; Crump *et al.*, 2003; Hahn, 2003).

Subcluster PnecB was the numerically dominating *Polynucleobacter* subcluster in Taihu Lake and in Lake Mondsee throughout the year (Figs 3 and 4). PnecC contributed always 100% to the *Polynucleobacter* community in the acidic pond (Hahn *et al.*, 2005), 0% (not detectable) to almost 50% in alkaline Taihu Lake, and only 0% (not detectable) to 11% in alkaline Lake Mondsee. The community structure obviously strongly differed between the three habitats; however, the structures in the two lakes were more similar to each other than to the structure observed in the pond.

The redundancy analysis indicated that pH and water temperature had the strongest influence on the dynamics of *Polynucleobacter* subcluster populations, as well as on the entire *Polynucleobacter* community. However, the PnecB and PnecC populations showed differences in their relationship to these most important environmental variables in both lakes. Differences in pH may also explain the major differences in the *Polynucleobacter* community composition between the two lakes and the pond. The two lakes share a similar alkaline pH (Table 3), while the pond is acidic (pH 4–6). This difference could be responsible for the major differences in the *Polynucleobacter* community structure observed between the lakes and the pond. This hypothesis is supported by the fact that all published environmental PnecB sequences have been obtained from circumneutral and alkaline habitats (e.g. Zwart *et al.*, 2002; Donachie *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004), while PnecC sequences have been obtained from acidic (e.g. Hiorns *et al.*, 1997), circumneutral (e.g. Crump *et al.*, 2003), and alkaline habitats (e.g. Hahn, 2003). Such differences in pH-dependent distribution in freshwater systems could either be a result of the absence of the trophic niche of PnecB bacteria in acidic freshwater systems, or a result of a lack of ecophysiological adaptation of PnecB bacteria to acidic environments. Both

explanations, however, imply fundamental differences in adaptation of PncC and PncB bacteria, and indicate ecological diversification within the *Polynucleobacter* cluster.

Ecological differentiation within genus-like groups of bacteria has been demonstrated previously for sediment-dwelling *Achromatium* spp. (Gray *et al.*, 2004) and for planktonic SOL bacteria (Schauer *et al.*, 2005). For these two groups of bacteria, water chemistry (i.e. pH, hardness, and redox conditions) was revealed to completely or partially separate the ecological niches of bacteria affiliated to the same genus-like phylogenetic group, and water chemistry seems also to play an important role in the ecological differentiation of bacteria affiliated to the *Polynucleobacter* cluster.

The differences in seasonality of the population dynamics of the same *Polynucleobacter* subcluster in the two investigated lakes (Fig. 3) could have been caused by three different factors. First, the differences could be a result of random influences, causing year-to-year different seasonal pattern in population development. The few studies that have investigated seasonality in freshwater bacterioplankton communities over more than one annual cycle observed only small similarities between seasonal pattern in consecutive years (Lindström, 1998; Yannarell *et al.*, 2003; Kent *et al.*, 2004). This is in contrast to the highly repeatable seasonal patterns observed for limnetic phytoplankton and zooplankton communities, and may indicate a strong influence of random processes on the development of freshwater bacterioplankton communities. Second, the observed inter-habitat differences in seasonality of population dynamics could reflect the occupation of different ecological niches by genotypes of the same *Polynucleobacter* subcluster in the different habitats. A third explanation could be that the two lakes are inhabited by *Polynucleobacter* ecotypes occupying similar ecological niches and important environmental factors, which act in the two habitats with different seasonal patterns, shape the population dynamics differently.

Conclusions

The demonstrated ecological diversification within the *Polynucleobacter* cluster could be revealed by the FISH probes providing higher (subcluster-specific) phylogenetic resolution, but would have been overlooked if tools with lower phylogenetic resolution had been exclusively applied. It is currently not known if the phylogenetic units targeted by the subcluster-specific probes represent groups of bacteria with largely coherent ecology. The observed habitat-specific differences in seasonality of populations belonging to the same *Polynucleobacter* subcluster, as well as the affiliation of strains potentially completely differing in lifestyle (obligately endosymbiotic vs. obligately free-living) to the same subcluster (Heckmann & Schmidt, 1987; Hahn *et al.*, 2005;

Vannini *et al.*, 2005) may indicate pronounced intra-subcluster differences in the ecological adaptation of strains. Previous ecophysiological investigations with freshwater bacteria have revealed pronounced differences in ecologically relevant traits between strains affiliated to the same species-like phylogenetic group (Boenigk *et al.*, 2004; Jaspers & Overmann, 2004; Wu *et al.*, 2004; Hahn & Pöckl, 2005). In terms of their phylogenetic width, these groups are comparable to the subclusters considered in our study. Molecular tools with even higher phylogenetic resolution might be needed to reveal the ecological and functional diversity within such microdiverse phylogenetic groups of bacteria.

Acknowledgements

The authors would like to thank Matthias Pöckl for help in construction of clone libraries; Yuwei Chen, Peter Stadler, Jiang Ji, and Michael Schauer for their assistance in sampling of the lakes; Yuwei Chen for providing phytoplankton data; Manandhar Anjali for providing a water sample from Nepal; Byron C. Crump and Gabriel Zwart for providing clones of 16S rRNA genes of *Polynucleobacter* bacteria; Eva Lindström for providing bacterioplankton samples from Swedish habitats; and three anonymous reviewers for providing constructive comments on an earlier version of the manuscript. The Austrian Science Foundation (grant P15655), the National Science Foundation of China (grant 30370278), the Chinese Academy of Sciences (KZCX1-SW-12), and the Austrian Academy of Sciences supported this work. Q.L.W. was supported by a scholarship from the North-South Dialogue Program, Ministry of Foreign Affairs, Austria (EZA project 894/01).

References

- Alfreider A, Pernthaler J, Amann R, Sattler B, Glöckner F, Wille A & Psenner R (1996) Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2138–2144.
- Bahr M, Hobbie JE & Sogin ML (1996) Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR11 cluster. *Aquat Microb Ecol* **11**: 271–277.
- Boenigk J, Stadler P, Wiedroither A & Hahn MW (2004) Strain-specific differences in the grazing sensitivity of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5787–5793.
- ter Braak CJF & Verdonschot PFM (1995) Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic Sci* **57**: 255–289.
- Burkert U, Warnecke F, Babenzien D, Zwirnmann E & Pernthaler J (2003) Members of a readily enriched β -Proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6550–6559.

- Crump BC, Armbrust EV & Baross JA (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3192–3204.
- Crump BC, Kling GW, Bahr M & Hobbie JE (2003) Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2253–2268.
- Curtis TP, Sloan WT & Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10494–10499.
- Donachie SP, Hou S, Lee KS, *et al.* (2004) The Hawaiian Archipelago: a microbial diversity hotspot. *Microb Ecol* **48**: 509–520.
- Eiler A & Bertilsson S (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol* **6**: 1228–1243.
- Gich F, Schubert K, Bruns A, Hoffelner H & Overmann J (2005) Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5908–5919.
- Glöckner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A & Amann R (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5053–5065.
- Gray ND, Comaskey D, Miskin IP, Pickup RW, Suzuki K & Head IM (2004) Adaptation of sympatric *Achromatium* ssp. to different redox conditions as a mechanism for coexistence of functionally similar sulphur bacteria. *Environ Microbiol* **6**: 669–677.
- Greenberg AE, Clesceri LS & Eaton AD (1992) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Ass., Washington.
- Hahn MW (2003) Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5248–5254.
- Hahn MW & Pöckl M (2005) Ecotypes of planktonic *Actinobacteria* with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical and tropical freshwater habitats. *Appl Environ Microbiol* **71**: 766–773.
- Hahn MW, Lünsdorf H, Wu QL, Schauer M, Höfle MG, Boenigk J & Stadler P (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1442–1451.
- Hahn MW, Stadler P, Wu QL & Pöckl M (2004) The filtration-acclimatization-method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J Microb Methods* **57**: 379–390.
- Hahn MW, Pöckl M & Wu QL (2005) Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4539–4547.
- Heckmann K & Schmidt HJ (1987) *Polynucleobacter necessarius* gen. nov., sp. nov., an obligately endosymbiotic bacterium living in the cytoplasm of *Euplotes aediculatus*. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 456–457.
- Hiorns WD, Methé, BA, Nierzwicki-Bauer SA & Zehr JP (1997) Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2957–2960.
- Jaspers E & Overmann J (2004) Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4831–4839.
- Kent AD, Jones SE, Yannarell AC, Graham JM, Lauster GH, Kratz TK & Triplett EW (2004) Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake. *Microb Ecol* **48**: 550–560.
- Kirchman DL, Dittel AI, Malmstrom RR & Cottrell MT (2005) Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnol Oceanogr* **50**: 1697–1706.
- Lindström ES (1998) Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol Ecol* **27**: 163–174.
- Lindström ES & Bergström A-K (2004) Influence of inlet bacteria on bacterioplankton assemblage composition in lakes of different hydraulic retention time. *Limnol Oceanogr* **49**: 125–136.
- Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson C & Giovannoni SJ (2002) SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**: 806–810.
- Pearce DA, van der Gast CJ, Lawley B & Ellis-Evans JC (2003) Bacterioplankton community diversity in a maritime antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *FEMS Microbiol Ecol* **45**: 59–70.
- Schauer M & Hahn MW (2005) Diversity and phylogenetic affiliations of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1931–1940.
- Schauer M, Kamenik C & Hahn MW (2005) Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, Saprospiraceae, Bacteroidetes). *Appl Environ Microbiol* **71**: 5900–5907.
- Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B & Uchiyama H (2002) Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5142–5150.
- Semenova EA & Kuznedelov KD (1998) A study of the biodiversity of Baikal picoplankton by comparative analysis of 16S rRNA gene 5'-terminal regions. *Mol Biol* **32**: 754–760.
- Šimek K, Pernthaler J, Weinbauer MG, Hornak K, Dolan JR, Nedoma J, Masin M & Amann R (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2723–2733.

- Simpson JM, Santo Domingo JW & Reasoner DJ (2004) Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiol Ecol* **47**: 65–75.
- Stewart DK & Love WA (1968) A General Canonical Correlation Index. *Psychol Bull* **70**: 160–163.
- Vannini C, Petroni G, Verni F & Rosati G (2005) *Polynucleobacter* bacteria in the brackish-water species *Euplotes harpa* (Ciliata Hypotrichia). *J Eukaryot Microbiol* **52**: 116–122.
- Wu QL, Boenigk J & Hahn MW (2004) Successful predation of filamentous bacteria by a nanoflagellate challenges current models of flagellate bacterivory. *Appl Environ Microbiol* **70**: 332–339.
- Yannarell AC, Kent AD, Lauster GL, Kratz TK & Triplett EW (2003) Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microb Ecol* **46**: 391–405.
- Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, Hagen F & Han SK (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* **28**: 141–155.
- Zwart G, Van Hannen EJ, Kamst-van Agterveld MP, Van der Gucht K, Lindström ES, Van Wichelen J, Lauridsen T., Crump B.C., Han S.K. & Declerck S. (2003) Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5875–5883.

Brief report

High predictability of the seasonal dynamics of a species-like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake

Qinglong L. Wu^{1,2} and Martin W. Hahn^{1*}

¹*Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria.*

²*Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, 73 East Beijing Road, Nanjing 210008, China.*

Summary

One of the key questions in microbial ecology is if seasonal patterns of bacterial community composition (BCC) observed in one year repeat in the following years. We have investigated if the recorded annual dynamics of a species-like *Polynucleobacter* (sub-cluster PnecB) population allowed the prediction of the population dynamics in another year. The abundance of PnecB bacteria in the pelagic of temperate Lake Mondsee was investigated by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) over three consecutive years. The PnecB bacteria formed a persistent population, and were present in the entire water body of the lake. Two of the three investigated years differed strongly in summer temperatures and precipitation, which resulted in markedly different growth conditions. But despite of these different environmental conditions, the PnecB population demonstrated remarkably similar seasonal dynamics in the three investigated years. Water temperature was the best predictor of the population dynamics during the first half of the annual cycles. Statistical analysis also indicated influences of phytoplankton and metazooplankton successions on the PnecB population dynamics. Furthermore, 65 lakes and ponds were investigated for the presence of PnecB bacteria. They were detected in the majority (78%) of circum-neutral and alkaline freshwater habitats, but not in any investigated acidic or saline habitat.

Introduction

Cultivation-independent methods have allowed a rough characterization of the microbial diversity in different aquatic ecosystems. Usually, bacteria numerically dominate the microbial communities in most aquatic habitats, and their diversity was by far best investigated (e.g. Glöckner et al., 2000; Zwart et al., 2002; Acinas et al., 2004; Venter et al., 2004). It became clear that the predominating bacteria in marine and freshwater systems are comprised by different phylogenetic groups (e.g. Glöckner et al., 2000; Zwart et al., 2002). Therefore, Zwart and colleagues coined the term 'typical freshwater bacteria' for those phylogenetic groups of bacteria, which typically appear in freshwater habitats, but are usually absent in soil or marine habitats (Zwart et al., 2002). On the other hand, spatial and temporal variability of the freshwater and marine bacterioplankton community compositions (BCC) was demonstrated in many investigations (e.g. Lindström, 1998; Pernthaler et al., 1998; Höfle et al., 1999; Lindström, 2000; Pinhassi and Hagström, 2000; Eilers et al., 2001; Eiler and Bertilsson, 2004; Kent et al., 2004; Wu and Hahn, 2006), thus the BCC in habitats of the same ecosystem type (i.e. freshwater, marine), or even in single habitat is not constant. Especially for freshwater bacterioplankton, many biotic and abiotic factors influencing the BCC were revealed (e.g. Höfle et al., 1999; Fisher et al., 2000; Lindström, 2000; Langenheder and Jürgens, 2001; Šimek et al., 2001; Crump et al., 2003; Yannarell et al., 2003; Schauer et al., 2005; Lindström et al., 2006). Currently, it is not known if the large number of potentially structuring forces result in chaotic dynamics in community structures, or if these forces generate recurrent pattern of BCC.

Recurrent seasonal pattern of phytoplankton and zooplankton in temperate stagnant freshwater systems are usual and well-investigated phenomena (Sommer, 1989). In the case of bacterioplankton, only a few studies, however, followed the seasonality of BCC over more than one annual cycle (Lindström, 1998; Van der Gucht *et al.*, 2001; Crump *et al.*, 2003; Yannarell *et al.*, 2003; Kent *et al.*, 2004; Crump and Hobbie, 2005). All these studies char-

Received 24 January, 2006; accepted 28 March, 2006. *For correspondence. E-mail martin.hahn@oeaw.ac.at; Tel. (+43) 6232 3125 29; Fax (+43) 6232 3578.

acterized and followed the BCC by fingerprinting techniques like denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (e.g. Lindström, 1998) or automated rRNA intergenic spacer analysis (ARISA) (e.g. Yannarell *et al.*, 2003). For instance, the bacterioplankton community in a boreal forest lake showed no seasonality over a 2-year period (Lindström, 1998). There was also little similarity in BCC between years in a shallow humic lake (Kent *et al.*, 2004) and three other lakes (Yannarell *et al.*, 2003) in northern Wisconsin, USA. On the other hand, more than half of the winter and summer bacterial communities returned year after year or were present year-round in the Ipswich River and the Parker River (Crump and Hobbie, 2005). Similar results were found over two consecutive winter seasons in two Belgian lakes (Van der Gucht *et al.*, 2001) and an Arctic tundra lake (Crump *et al.*, 2003). Several of these studies, as well as some investigations on marine bacterioplankton (e.g. Brettar *et al.*, 2006), provide hints on the existence of recurrent seasonal dynamics in some populations of freshwater or marine bacterioplankton; however, recurrent seasonalities of such populations have not been demonstrated so far.

In the study presented here, we tested if a population of a freshwater bacterium performs recurrent and predictable seasonal dynamics in the pelagic of a freshwater lake. The dynamics of the phylogenetically defined species-like group of bacteria in temperate Lake Mondsee (Austria) was investigated by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) over a period of 3 years (2001–2003). The investigated group of bacteria, subcluster PnecB of the betaproteobacterial *Polynucleobacter* group (Hahn, 2003; Wu and Hahn, 2006), represents a monophyletic group, which is characterized by a minimum sequence similarity of the 16S rRNA gene of 98.2% (Wu and Hahn, 2006), and is also well separated from the other three subclusters of the *Polynucleobacter* group (Hahn, 2003). PnecB bacteria have been detected by cultivation-independent methods in the pelagic of many freshwater habitats (e.g. Zwart *et al.*, 2002; Donachie *et al.*, 2004; Eiler and Bertilsson, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Wu and Hahn, 2006), and a first cultivated representative of this group was presented recently (Wu and Hahn, 2006). In the investigation presented here, the members of this putative species were quantified in Lake Mondsee and 65 other aquatic habitats by the PnecB-specific probe PnecB-23S-166 (Wu and Hahn, 2006).

Lake Mondsee is a deep oligo-mesotrophic lake with thermal stratification from end of March to early September (Dokulil and Teubner, 2003). The lake has a surface area of 13.8 km², and a theoretical water retention time of 1.8 years. More detailed limnological characterizations of Lake Mondsee can be found elsewhere (Dokulil and Teubner, 2003; Wu and Hahn, 2006).

Repeated seasonal pattern of PnecB population dynamics in Lake Mondsee

In water samples of Lake Mondsee taken at 1 m depths, between 0% (only one of 57 samples) and 6.4% of all DAPI-stained cells could be visualized with the PnecB-specific probe (Fig. 1). These relative abundances correspond to absolute numbers of 0 (i.e. below the detection limit of *c.* 0.1% of total bacterial numbers) to 17.1×10^4 cells ml⁻¹ (average 5.1×10^4 cells ml⁻¹). Two of the three investigated years differed markedly in their local climatic conditions. The year 2002 was unusual rich in precipitation (119% of the mean annual precipitation) and characterized by a lower mean air temperature. By contrast, the year 2003 was poor in precipitation (82% of the mean annual precipitation) and unusually hot. In summer 2002, the lake received an unusually high inflow from the catchment area resulting in rise of the water level and flooding of some shore areas. The mean water temperature of Lake Mondsee measured in 1 m depth during summer (June–August) differed in the 2 years by 2.5°C. Despite these pronounced differences in environmental conditions, the PnecB population showed highly similar annual dynamics in the three investigated years. During each year, PnecB numbers increased almost steadily from end of March to mid-June or July, and decreased thereafter almost steadily. Lowest relative and absolute numbers were always observed during wintertime, and maximum numbers in summer.

Multiple linear regressions ($F = 9.457$, d.f. = 5, $r^2 = 0.24$, $P < 0.001$) indicate that water temperature ($P = 0.035$) and chlorophyll a concentration ($P = 0.031$) out of five parameters (pH, conductivity, water temperature, chlorophyll a and total phosphorus) were the best predictors of PnecB abundance in Lake Mondsee. Partial linear regressions demonstrate that PnecB bacterial abundance was positively correlated with water temperature ($r^2 = 0.34$, $P < 0.001$), but negatively correlated with chlorophyll a ($r^2 = 0.34$, $P < 0.001$). When only considering data of water temperature and PnecB numbers measured before the trends of the two parameters diverged in the respective years (i.e. data of the first halves of the years) even better correlations were observed (regression equation: $y = 0.2345x + 0.2789$, where y and x denotes relative PnecB abundance and water temperature respectively; $r^2 = 0.77$, $P < 0.001$).

The observed recurrent seasonal dynamics and the observed tight correlations indicated that the dynamics of the PnecB population in Lake Mondsee could be well predicted for the first halves of annual cycles based on measured water temperatures and the obtained regression equations. We tested this hypothesis by predicting PnecB abundances for the first half of the year 2004, and comparing the predicted data with the abundance mea-

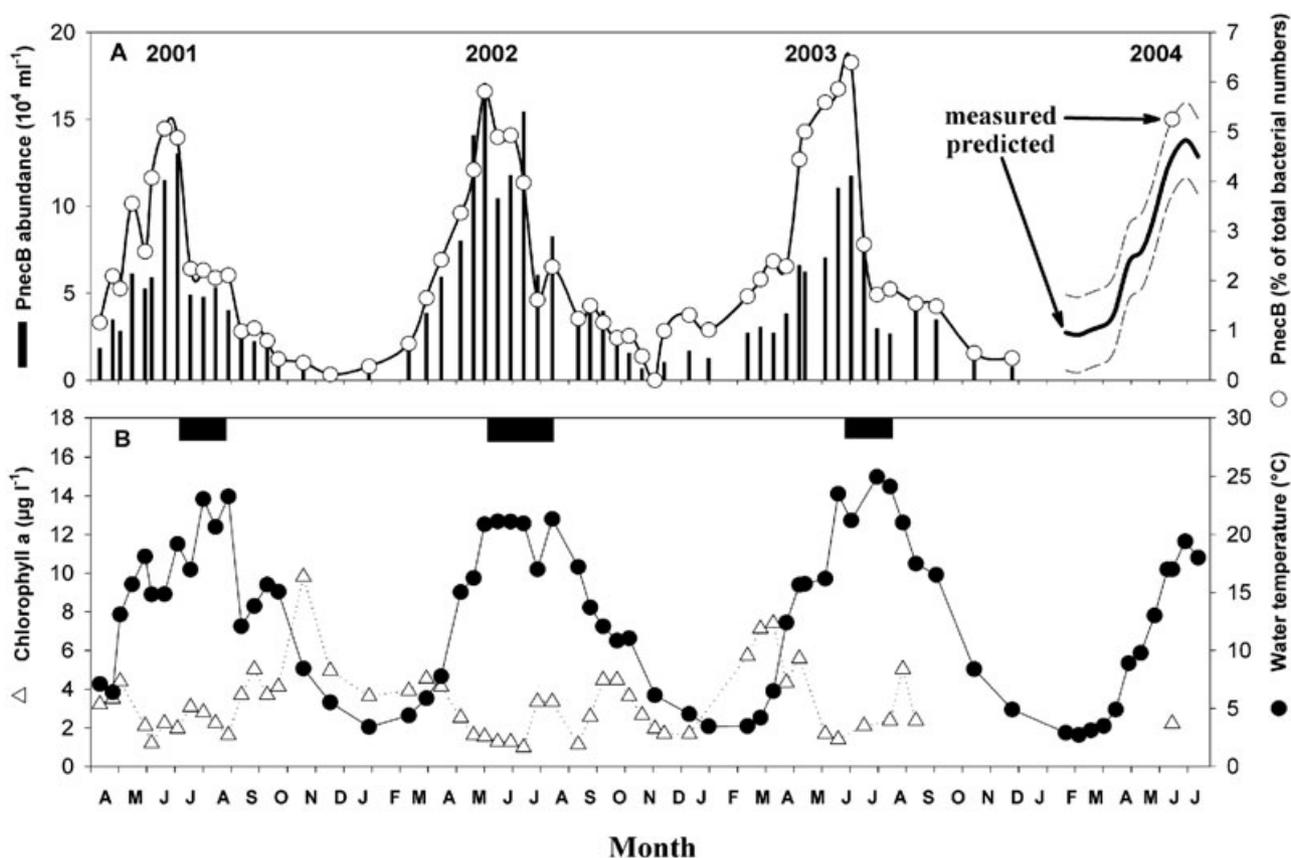


Fig. 1. Seasonal dynamics of PnecB bacteria in Lake Mondsee at 1 m depths. The PnecB bacterial abundance was determined by FISH (Alfreider *et al.*, 1996) using probe PnecB-23S-166 (Wu and Hahn, 2006). Probe NON338 served as a negative control (Wallner *et al.*, 1993). In 2004, the PnecB abundance was only determined for one date (open circle); however, the relative PnecB abundance was predicted (thick line) based on the measured water temperature and the regression equation resulting from the analysis of data from 2001 to 2003. The two dashed lines flanking the line of the predicted values were derived from the 99% confidence lines obtained in the regression of the data from the previous years. The horizontal filled bars in B indicate the period during which the trends of PnecB numbers and temperature diverged, i.e. PnecB numbers declined while water temperature stayed constantly high. Note that the year 2002 was unusual cool and rich in precipitation, while 2003 was unusual hot and poor in precipitation.

sured in June 2004. This comparison resulted in quite similar predicted and measured values of relative (Fig. 1) and absolute PnecB abundance (data not shown).

Statistical analyses of phytoplankton composition in Lake Mondsee (data set with 42 taxa) indicated that PnecB abundance was only significantly related to the biomass of chrysophytes and dinoflagellates in the year 2002 ($r^2 = 0.61$, $P < 0.01$) and 2003 ($r^2 = 0.34$, $P < 0.01$), but not in the year 2001 ($r^2 = 0.04$, $P = 0.17$). The non-significant correlation in the year 2001 might be a result of unusually high biomass of the two phytoplankton groups in autumn and winter of this year. Combined data of water temperature and biomass of the two phytoplankton taxa were better predicting the PnecB numbers for entire annual cycles (multiple linear regression, $r^2 = 0.40$, $P < 0.001$) than water temperature alone ($r^2 = 0.34$, $P < 0.001$). Furthermore, PnecB abundance was positively related to biomass of mesozooplankton (data only

available from the year 2002) in the year 2002 ($r^2 = 0.55$, $P < 0.01$; Schauer *et al.*, 2006).

To date, only a few studies investigated seasonality of BCC over more than one annual cycle, and in none of these cases the community re-appeared completely (Lindström, 1998; Van der Gucht *et al.*, 2001; Crump *et al.*, 2003; Yannarell *et al.*, 2003; Kent *et al.*, 2004; Crump and Hobbie, 2005). In these studies the dynamics of BCC were measured by recording the presence or absence of particular DGGE bands or ARISA signals. We have demonstrated that a freshwater bacteria population performed year-by-year highly similar seasonal dynamics. Similarly, recurrent seasonal dynamics of filamentous bacteria of the species-like LD2 cluster (Bacteroidetes) were also observed in Lake Mondsee in two consecutive years (Schauer *et al.*, 2006); however, it was not possible to predict the annual population dynamics based on environmental parameters. Both studies applied FISH probes

targeting defined species-like phylogenetic groups of bacteria, while studies employing DGGE or ARISA may also distinguish subpopulations of species-like groups of bacteria. For instance, Gich and colleagues observed that DGGE bands with clearly different migration behaviour originated from closely related bacteria (Gich *et al.*, 2005). Furthermore, it is known that bacteria affiliated to the same species-like group differ in length of the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS), which potentially results in separate ARISA signals. For example, the length of the ITS of *Polynucleobacter* bacteria affiliated with the species-like subcluster C (PnecC, 98.8% minimum 16S rRNA gene similarity) is ranging from 511 to 519 bp (Hahn *et al.*, 2005).

Besides potential methodical influences, habitat-specific differences could also influence the recurrence of pattern in population and community dynamics. The habitats investigated in the above-cited studies are mainly small shallow lakes or running waters, and, hence, are more influenced by allochthonous factors than Lake Mondsee. Lindström and colleagues demonstrated that the control of BCC in lakes with water retention times < 200 days is dominated by external factors (Lindström *et al.*, 2005), which may result in a higher inter-annual

variability of the BCC. This may apply to several of the previously investigated lakes. Furthermore, different bacterial populations may respond differently to inter-annual differences in environmental conditions. Populations mainly relying on autochthonous sources may be less sensitive to inter-annual differences of allochthonous influences.

Spatial distribution of PnecB population in Lake Mondsee

The vertical (two sampling sites) and horizontal distribution (five sampling sites) of PnecB bacteria in Lake Mondsee on 14 June 2004 was investigated. PnecB bacteria were detected in all water samples. The vertical distribution of PnecB bacteria at sites 3 km apart was very similar (Fig. 2). Highest PnecB numbers were observed in the epilimnion, with maxima in 2 and 4 m depths, and numbers decreased with depths to values close to the detection limit. Absolute and relative PnecB abundance in the epilimnetic water layers were much higher than in metalimnetic and hypolimnetic layers (Student's two-tailed *t*-test, $P < 0.001$), while the total bacterial abundance (data

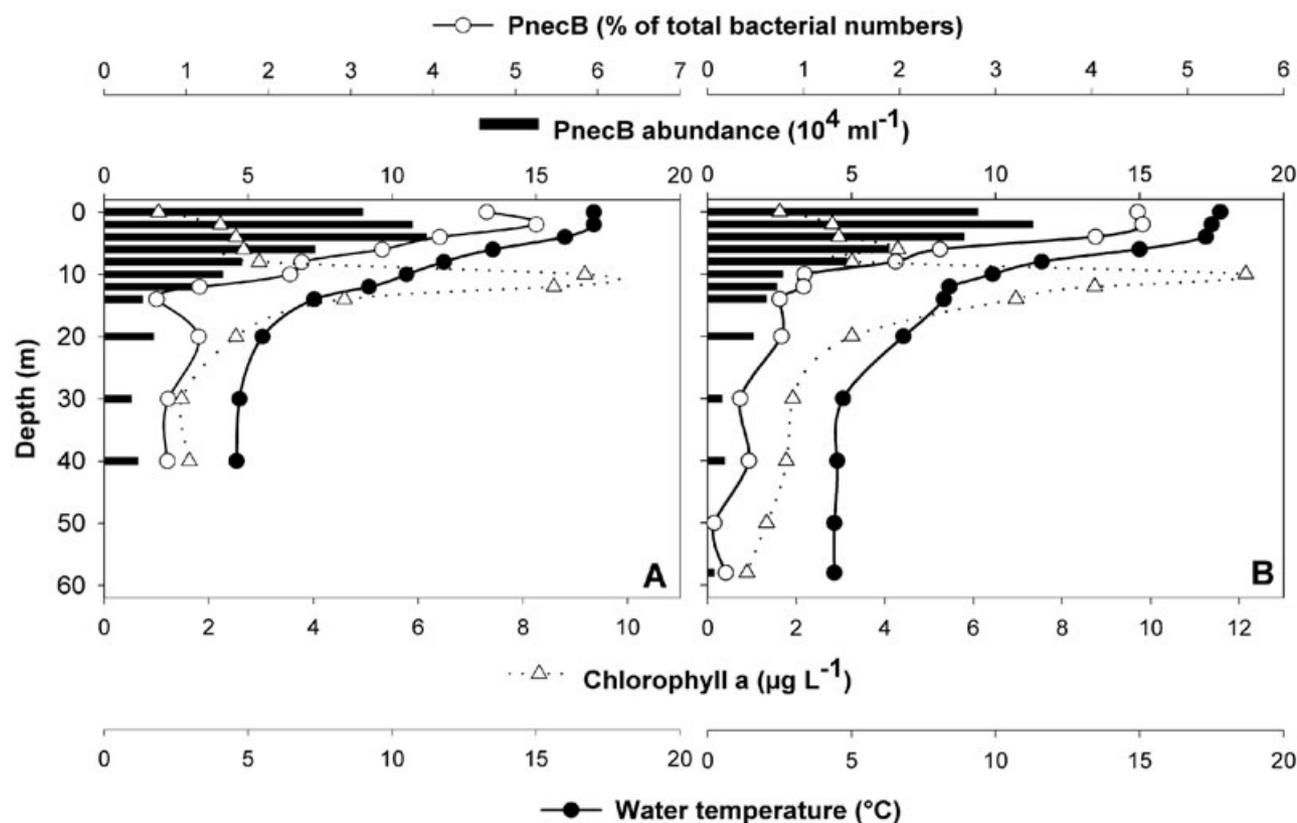


Fig. 2. Vertical distributions of PnecB bacteria at two sites of Lake Mondsee on 14 June 2004. The two sampling sites were located 3 km apart, and have maximum water depths of 48 m (A) and 68 m (B).

not shown) did not differ significantly (Student's two-tailed *t*-test, $P = 0.36$). PnecB bacterial abundances were positively related with water temperature (linear regression: $r^2 = 0.98$, $P < 0.001$), but not with chlorophyll *a* values (linear regression: $r^2 = 0.02$, $P = 0.5$). The vertical distribution of PnecB bacteria in 2 m depths at five sites spread over a distance of 7 km was much less variable than the vertical distributions (data not shown). While the maximum and minimum abundances differed in the depth profiles by a factor of 122, the horizontal samples differed only by a factor of 1.6.

Presence of PnecB bacteria in other habitats

In total, 66 inland water habitats (including Lake Mondsee) were investigated (75 samples, without samples of Lake Mondsee) for distribution of PnecB bacteria. These surface habitats represent an ecologically broad spectrum of habitats located on three continents (Table S1). The habitats include acidic, neutral and alkaline freshwater habitats, as well as saline habitats. The trophic status of the habitats ranged from oligotrophic to hypertrophic. Most of the habitats were lakes but also a few ponds and running waters were included. The altitude of the habitats ranged from about sea level to 5134 m.a.s.l. All 10 investigated high-mountain lakes are located at the Tibetan Plateau (China) (Q.L. Wu *et al.*, submitted). PnecB bacteria were detected in the majority (78%) of circum-neutral and alkaline freshwater habitats, but not in any investigated acidic or saline habitat. The relative PnecB abundance ranged from 0.4% to 13.2% with an average of 2.6%. These values corresponded to 0.6×10^4 – 74.0×10^4 PnecB bacteria per millilitre, and a mean abundance of 8.0×10^4 PnecB bacteria per millilitre. Highest PnecB numbers were observed in a Tibetan oligo-mesotrophic lake located at an altitude of 4987 m.a.s.l. (Q.L. Wu *et al.*, submitted).

Multiple linear regressions ($F = 1.565$, d.f. = 6, $P = 0.19$) indicate that only concentration of total phosphorus out of the six parameters (pH, conductivity, water temperature, concentration of total phosphorus, lake altitude and lake area) was able to predict PnecB abundance ($P = 0.013$). However, none of these parameters was able to predict the relative PnecB abundance. Partial linear regression analyses showed that absolute PnecB numbers were positively related to total phosphorus ($r^2 = 0.11$, $P = 0.036$). Multiple logistic regressions analyses (likelihood ratio test = 70.347, d.f. = 6, $P < 0.001$) indicated that pH (Wald test = 4.806, d.f. = 6, $P = 0.028$) and conductivity (Wald test = 3.993, d.f. = 6, $P = 0.046$) were out of the six investigated parameters the most important factors governing the occurrence of PnecB bacteria in the 66 investigated habitats. All detections of PnecB bacteria were in a pH range of 7–10 and in a conductivity range of 80–1000 $\mu\text{S cm}^{-1}$. All previous

detections of PnecB bacteria by cultivation-independent methods were within these limits (Sekiguchi *et al.*, 2002; Zwart *et al.*, 2002; Horner-Devine *et al.*, 2003; Zwisler *et al.*, 2003; Donachie *et al.*, 2004; Eiler and Bertilsson, 2004; Simpson *et al.*, 2004). Therefore, it has to be assumed that the occurrence of the PnecB bacteria is restricted to neutral and alkaline freshwater habitats. Interestingly, the absence from acidic habitats is not shared with at least two of the other three *Polynucleobacter* subclusters (Hahn *et al.*, 2005; Lindström *et al.*, 2005). It is important to note that the occurrence of the species-like PnecB group seems not to be restricted by factors like trophic status of habitats, climatic conditions, habitat size, altitude, geographic location, etc.

Ecological factors controlling the PnecB populations

It is not known which substrates PnecB bacteria utilize under *in situ* conditions; however, three observations suggest that they rather depend on autochthonous than on allochthonous (imported) substrate sources. This is indicated by: (i) their numerous occurrence in large lakes with long water retention times (e.g. Lake Attersee, Lake Traunsee, Lake Mondsee), in which only small fractions of the organic carbon is of terrestrial origin; (ii) their depth distribution, which resembles strongly typical profiles of primary production in lakes; and (iii) the numerous occurrence of PnecB bacteria in mesocosms in which primary producers have been the dominating substrate source of bacteria (Horner-Devine *et al.*, 2003). These mesocosms have been filled with well water, enriched with different concentrations of inorganic nutrients, inoculated with mesozooplankton-free pond water, and incubated for 4 months under natural illumination. Own evaluation of the 760 ribosomal sequences obtained by Horner-Devine and colleagues at the end of the incubation revealed that the largest fraction (14%) of the bacterial sequences was contributed by PnecB bacteria. On the other hand, we observed no (depth profile) or a negative correlation (temporal data set) of PnecB numbers with chlorophyll *a* concentration in Lake Mondsee. In this lake the total chlorophyll *a* amount in the water column is frequently dominated by a metalimnetic peak (Fig. 2), which was caused by filamentous *Planktothrix* spp. These *Cyanobacteria* contribute strongly to total chlorophyll *a* but contribute only weakly to primary production. Thus, the observed relationships of PnecB numbers to chlorophyll *a* data do not argue against a trophic link between phytoplankton and PnecB bacteria. Furthermore, the performed statistical analysis of phytoplankton data indicated a more specific dependence of PnecB bacteria on some phytoplankton groups. However, detailed experimental investigations are needed to reveal the direct or indirect trophic links between PnecB bacteria and phytoplankton.

Water temperature was found to be a good predictor of the PncB dynamics in the first half of the annual cycle. It is unlikely that temperature is directly controlling the dynamics of the PncB bacteria in Lake Mondsee, because PncB bacteria were observed to peak in subtropical Lake Taihu during wintertime at a temperature of 6–8°C (Wu and Hahn, 2006). It is more likely that water temperature, which is a master factor triggering and controlling many biological processes in the water column, influenced indirectly the development of the PncB population.

To date, only a few investigations have followed the dynamics of bacterial populations over more than one annual cycle, thus it is not known if population dynamics of many free-living bacteria are recurrent and predictable. More detailed investigations applying appropriate methods are needed to reveal if the recurrent dynamics of PncB bacteria is also a characteristic of other bacterial populations.

Acknowledgements

We thank Matthias Pöckl, Peter Stadler and Michael Schauer for help in sampling of Austrian Lakes, Yuwei Chen, Weinan Xia and Xiangdong Yang for their assistance in sampling of a part of the Chinese habitats, Hongxi Pan for some of the water chemistry analysis, Eva Lindström for providing samples and environmental data of Swedish lakes, Katrin Teubner for providing phytoplankton data, Jiang Jing for providing mesozooplankton data, and Liselotte Eisl for providing chlorophyll data. The Austrian Science Foundation (Grant P15655) and the Austrian Academy of Sciences supported this work. Field sampling in China was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant 30370278). Q.L.W. was supported by a scholarship from the North-South Dialogue Program, Ministry of Foreign Affairs, Austria (EZA project 894/01).

References

Acinas, S.G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D.E., Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D.L., and Polz, M.F. (2004) Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* **430**: 551–554.

Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glöckner, F., Wille, A., and Psenner, R. (1996) Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2138–2144.

Brettar, I., Labrenz, M., Flavier, S., Bötzel, J., Kuosa, H., Christen, R., and Höfle, M.G. (2006) Identification of a *Thiomicrospira denitrificans*-like Epsilonproteobacterium as a catalyst for autotrophic denitrification in the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1364–1372.

Crump, B.C., and Hobbie, J.E. (2005) Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Limnol Oceanogr* **50**: 1718–1729.

Crump, B.C., Kling, G.W., Bahr, M., and Hobbie, J.E. (2003) Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2253–2268.

Dokulil, M.T., and Teubner, K. (2003) Steady state phytoplankton assemblages during thermal stratification in deep alpine lakes. Do they occur? *Hydrobiologia* **502**: 65–72.

Donachie, S.P., Hou, S., Lee, K.S., Riley, C.W., Pikina, A., Belisle, C.S., *et al.* (2004) The Hawaiian Archipelago: a microbial diversity hotspot. *Microb Ecol* **48**: 509–520.

Eiler, A., and Bertilsson, S. (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol* **6**: 1228–1243.

Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glockner, F.O., Gerdt, G., and Amann, R. (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5134–5142.

Fisher, M.M., Klug, J.L., Lauster, G.H., Newton, M., and Triplett, E.W. (2000) Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. *Microb Ecol* **40**: 125–138.

Gich, F., Schubert, K., Bruns, A., Hoffelner, H., and Overmann, J. (2005) Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5908–5919.

Glöckner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., and Amann, R. (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5053–5065.

Hahn, M.W. (2003) Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5248–5254.

Hahn, M.W., Pöckl, M., and Wu, Q.L. (2005) Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4539–4547.

Höfle, M.G., Haas, H., and Dominik, K. (1999) Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3164–3174.

Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V., and Bohannan, B.J.M. (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol Lett* **6**: 613–622.

Kent, A.D., Jones, S.E., Yannarell, A.C., Graham, J.M., Lauster, G.H., Kratz, T.K., and Triplett, E.W. (2004) Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake. *Microb Ecol* **48**: 550–560.

Langenheder, S., and Jürgens, K. (2001) Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnol Oceanogr* **46**: 121–134.

Lindström, E.S. (1998) Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol Ecol* **27**: 163–174.

- Lindström, E.S. (2000) Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microb Ecol* **40**: 104–113.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8201–8206.
- Lindström, E.S., Forslund, M., Algesten, G., and Bergström, A.K. (2006) External control of bacterial community structure in lakes. *Limnol Oceanogr* **51**: 339–342.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R., and Amann, R. (1998) Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and Archaea in a high mountain lake. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4299–4306.
- Pinhassi, J., and Hagström, A. (2000) Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat Microbiol Ecol* **21**: 245–256.
- Schauer, M., Kamenik, C., and Hahn, M.W. (2005) Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, *Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*). *Appl Environ Microbiol* **71**: 5900–5907.
- Schauer, M., Jing, J., and Hahn, M.W. (2006) Recurrent seasonal development in abundance and composition of filamentous SOL bacteria (*Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*) in oligo-mesotrophic Lake Mondsee (Austria). *Appl Environ Microbiol* (in press).
- Sekiguchi, H., Watanabe, M., Nakahara, T., Xu, B., and Uchiyama, H. (2002) Dynamic of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5142–5150.
- Šimek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M.G., Hornak, K., Dolan, J.R., Nedoma, J., *et al.* (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2723–2733.
- Simpson, J.M., Santo Domingo, J.W., and Reasoner, D.J. (2004) Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiol Ecol* **47**: 65–75.
- Sommer, U. (1989) *Plankton Ecology: Dynamic in Plankton Communities*. New York, NY, USA: Springer-Verlag.
- Van der Gucht, K., Sabbe, K., De Meester, L., Vloemans, N., Zwart, G., Gillis, M., and Vyverman, W. (2001) Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environ Microbiol* **3**: 680–690.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., *et al.* (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66–74.
- Wallner, G., Amann, R., and Beisker, W. (1993) Optimizing fluorescent *in situ*-hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**: 136–143.
- Wu, Q.L., and Hahn, M.W. (2006) Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microbiol Ecol* (in press). DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00105.x.
- Yannarell, A.C., Kent, A.D., Lauster, G.H., Kratz, T.K., and Triplett, E.W. (2003) Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microb Ecol* **46**: 391–405.
- Zwart, G., Crump, B.C., Kamst-van Agterveld, M.P., Hagen, F., and Han, S.-K. (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* **28**: 141–155.
- Zwisler, W., Selje, N., and Simon, M. (2003) Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquat Microb Ecol* **31**: 211–225.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Table S1. Characteristics of sampled habitats, and relative as well as absolute PnecB abundances determined by FISH.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

Table S1. a a a ab a a a a ab ab a b

ab a	a	()	()	a a	a a	a a	ab a	a	a	ab a
				(m.a.s.l.)	(ha)				(% of cells)	(x10 ⁴ ml ⁻¹)
Attersee	Austria	47.56	13.35	469	4620	Oligotrophic	Deep sub-montane lake	Sep. 03; Jun. 04	6.9; 3.1	5.6; 3.1
Traunsee	Austria	47.51	13.47	423	2435	Oligotrophic	Deep sub-montane lake	Jun. 04	1.8	2.4
Mondsee	Austria	47.49	13.22	481	1378	Oligo-mesotrophic	Deep sub-montane lake	Apr. 01 – Jun. 04	0 – 6.4	0 – 17.1
Irsee	Austria	47.54	13.18	553	355	Oligo-mesotrophic	Sub-montane lake	Sep. 03; Jun. 04	2.0; 3.6	4.1; 7.6
Wolfgangsee	Austria	47.44	13.25	538	1284	Oligotrophic	Deep sub-montane lake	Jun. 04	3.6	5.4
Eibensee	Austria	47.48	13.20	952	2.3	Oligo-mesotrophic	Small montane lake	Sep. 03; Aug. 04	4.7; 2.4	6.9; 3.0
Egelsee (near Schafing)	Austria	47.47	13.23	540	1.5	Mesotrophic	Shallow sub-montane lake	Oct. 03	3.5	5.3
Krottensee (near St. Gilgen)	Austria	47.47	13.23	580	9	Oligo-mesotrophic	Small sub-montane lake	Aug. 03	2.1	3.8
Fuschlsee	Austria	47.48	13.16	664	265	Oligo-mesotrophic	Sub-montane lake	Sep. 03	4.3	3.8
Hallstätter See	Austria	47.34	13.39	508	855	Mesotrophic	Deep sub-montane lake	Jun. 04	0.6	0.9
Grundlsee	Austria	47.38	13.52	708	414	Mesotrophic	Deep sub-montane lake	Jun. 04	0.6	0.6
Wallersee	Austria	47.54	13.10	469	590	Oligo-mesotrophic	Sub-montane lake	Sep. 03; Jun. 04	1.7; 1.6	3.7; 5.9
Bog pond 3 (Wengermoor)	Austria	47.55	13.10	503	4 m2	Oligotrophic	Very small bog pond (a)	Nov. 03	0	0
Upper Großegelsee	Austria	47.57	13.07	592	0.3	Eutrophic	Small shallow humic pond	Aug. 03; Oct. 03	8.2; 4.7	51.5; 29.0
Großegelsee	Austria	47.57	13.07	592	13	Mesotrophic	Small shallow humic lake	Aug. 03; Oct. 03	2.2; 0.5	10.6; 1.4
Mitteregelsee	Austria	47.57	13.07	592	5	Mesotrophic	Small shallow humic lake	Aug. 03; Oct. 03	2.4; 1.4	11.8; 4.0
Unteregelsee	Austria	47.57	13.07	592	1	Mesotrophic	Small shallow humic lake	Aug. 03; Oct. 03	1.6; 1.4	6.4; 3.2
Nameless pond	Austria	47.57	13.07	592	3 m2	Oligo-mesotrophic	Very small humic pond (a)	May 04	0	0
Obertrumer See	Austria	47.57	13.05	503	480	Oligo-mesotrophic	Sub-montane lake	Sep. 03; Jun. 04	1.3; 1.0	3.2; 5.8
Mattsee	Austria	47.59	13.07	503	360	Oligo-mesotrophic	Sub-montane lake	Jun. 04	3.1	6.6
Höllnerer See	Austria	48.01	12.53	440	20	Meso-eutrophic	Small lake	Oct. 03	2.5	3.2
Holzöstersee	Austria	48.03	12.54	460	9	Mesotrophic	Small lake	Oct. 03	1.5	4.5
Seeleitensee	Austria	48.03	12.58	425	10	Mesotrophic	Small lake	Oct. 03	0.6	3.2
Immsee	Austria	48.01	13.07	500	5	Mesotrophic	Small lake	Oct. 03; Jun. 04	1.0; 1.7	2.5; 6.1
Bog pond 1 (near Koppl)	Austria	47.48	13.09	750	0.03	Oligo-mesotrophic	Small bog pond (a)	Nov. 03	0	0
Kleine Lacke	Austria	47.44	13.18	1320	0.02	Mesotrophic	Small humic pond (a)	Oct. 03	0	0
Große Lacke	Austria	47.44	13.18	1320	0.03	Mesotrophic	Small humic pond (a)	Oct. 03	0	0
Lacke 3	Austria	47.44	13.18	1320	0.1	Mesotrophic	Small humic pond (a)	Nov. 03	0	0
Lacke 4	Austria	47.44	13.18	1320	0.04	Mesotrophic	Small humic pond (a)	Nov. 03	0	0
Böndlsee	Austria	47.18	13.02	845	2	Mesotrophic	Small montane lake	Jun. 04	0.9	2.5
Goldeggersee	Austria	47.19	13.06	602	3	Mesotrophic	Small sub-montane lake	Jun. 04	1.6	5.5
Chiemsee	Germany	47.87	12.42	518	7990	Mesotrophic	Large lake	Jun. 04	3.7	10.4
Xuanwu	P.R.China	32.03	118.47	7	370	Hypertrophic	Small shallow lake	Sep. 03	0.4	3.1
Mochou	P.R.China	32.03	118.46	4	180	Hypertrophic	Small shallow lake	Sep. 03	0.5	6.0
Liang xi	P.R.China	31.31	120.22	7		Hypertrophic	River mouth	Sep. 03	0.5	0.9
Taihu	P.R.China	31.30	120.22	7	2338	Hypertrophic	Large shallow lake	Oct. 02 - Sep. 03	0.1 – 2.9	0.4 – 18.3
Wuli	P.R.China	31.31	120.21	7	450	Hypertrophic	Small shallow polluted lake	Sep. 03	0	0
Qinghai ^b	P.R.China (Tibet)	36.39	100.36	3203	434000	Oligotrophic	Large saline deep lake ()	Jul. 04	0	0
Freshwater lake 1	P.R.China (Tibet)	36.48	100.08	3203	50	Oligo-mesotrophic	Shallow high mountain lake	Jul. 04	0	0
High Lake 1	P.R.China (Tibet)	32.55	91.59	5134	670	Mesotrophic	Shallow high mountain lake	Jul. 04	4.2	7.2
High Lake 2	P.R.China (Tibet)	32.40	91.52	4987	10	Oligo-mesotrophic	Shallow high mountain lake	Jul. 04	13.2	74.1
High Lake 3	P.R.China (Tibet)	31.14	91.40	4548	1500	Mesotrophic	Humic high mountain lake	Jul. 04	4.0	9.9
Namocuo ^b	P.R.China (Tibet)	30.46	90.49	4710	186400	Oligotrophic	Large oligosaline lake ()	Jul. 04	0	0
Erhai	P.R.China (Tibet)	36.58	100.74	3203	500	Eutrophic	Shallow oligosaline lake ()	Jul. 04	0	0
Gahai 1	P.R.China (Tibet)	37.01	100.58	3211	4720	Mesotrophic	Shallow saline lake ()	Jul. 04	0	0
Gahai 2	P.R.China (Tibet)	37.15	97.55	2855	3200	Mesotrophic	Shallow saline lake ()	Jul. 04	0	0
Xiaochadan	P.R.China (Tibet)	37.48	95.17	2798	12500	Mesotrophic	Shallow hypersaline lake ()	Jul. 04	0	0
Långsjön	Sweden	60.03	17.35	26	250	Oligo-mesotrophic	Small shallow lake	Jun. 02	3.0	8.0
Tvågölingen	Sweden	60.05	17.24	49	7	Oligo-mesotrophic	Small shallow lake	Jun. 02	0	0
Ekoln	Sweden	59.45	17.36	1	2000	Eutrophic	Small deep lake	Jun. 02	1.8	8.6
Nedre Gädd	Sweden	64.24	18.49	257	110	Oligo-mesotrophic	Small shallow lake	Jun. 02	0	0
Lilla Gädd	Sweden	64.23	18.49	257	20	Oligo-mesotrophic	Small shallow lake	Jun. 02	1.62	3.0
Övre Björn	Sweden	64.71	18.46	335	4	Mesotrophic	Small humic lake (a)	Jun. 02	0	0
Nedre Björn	Sweden	64.71	18.47	335	3	Mesotrophic	Small humic lake (a)	Jun. 02	0	0
Lilla Björn	Sweden	64.71	18.46	335	2	Mesotrophic	Small humic lake (a)	Jun. 02	0	0
Victoria ^{c,f}	Kenya ^d	1.4 S	33.1	1134	6880000	Oligo-mesotrophic	Very large tropical lake	Jun. 03	0	0
Tanganyika ^{c,f}	Zambia ^d	6.0 S	30.1	773	3290000	Oligotrophic	Very large deep tropical lake	Mar. 03	0	0
Cerné Jezero	Czech Republic	49.11	13.11	1008	18.4	Oligotrophic	Small acidified lake (a)	Jun. 03	0	0
Certovo Jezero	Czech Republic	49.10	13.12	1028	10.3	Oligotrophic	Small acidified lake (a)	Jun. 03	0	0
Jezero Laka	Czech Republic	49.07	13.20	1096	2.8	Oligotrophic	Small acidified lake (a)	Jun. 03	0	0
Prášílské Jezero	Czech Republic	49.05	13.24	1079	4.2	Oligotrophic	Small acidified lake (a)	Jun. 03	0	0
Plešné Jezero	Czech Republic	48.47	13.52	1090	7.5	Oligotrophic	Small acidified lake (a)	Jun. 03	0	0
Gran Cenote ^f	Mexico	20.90	87.10	< 20	0.5	ND	Carstic lake	Aug. 04	0	0
Cenote Kaape-Ha ^f	Mexico	20.05	87.50	< 10	40 m ²	ND	Carstic pond	Aug. 04	0	0
Cenote Laguna ^f	Mexico	20.20	87.50	< 20	1	ND	Carstic pond	Aug. 04	0	0
Cenote Zaci ^f	Mexico	20.80	88.20	< 30	0.5	ND	Carstic lake	Aug. 04	0	0

^a Trophic status was estimated from total phosphorus concentration

^b Four samples from Qinghai Lake and six samples from Namocuo Lake were investigated

^c These lakes are located in the southern hemisphere.

^d Location of the sampling site

^e Acidic lakes are indicated (ac), all other lakes possessed pH values ≥ 7 . Saline lakes are also indicated (s)

^f Samples were transported for 3-5 days prior to fixation

Bacterioplankton Community Composition along a Salinity Gradient of Sixteen High-Mountain Lakes Located on the Tibetan Plateau, China†

Qinglong L. Wu,^{1,2} Gabriel Zwart,³ Michael Schauer,² Miranda P. Kamst-van Agterveld,³
and Martin W. Hahn^{2*}

*Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, East Beijing Road 73, Nanjing 210008, People's Republic of China*¹; *Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria*²; and *Centre for Limnology, Netherlands Institute of Ecology, Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Rijksstraatweg 6, 3631 AC Nieuwersluis, The Netherlands*³

Received 3 April 2006/Accepted 14 June 2006

The influence of altitude and salinity on bacterioplankton community composition (BCC) in 16 high-mountain lakes located at altitudes of 2,817 to 5,134 m on the Eastern Qinghai-Xizang (Tibetan) Plateau, China, spanning a salinity gradient from 0.02% (freshwater) to 22.3% (hypersaline), was investigated. Three different methods, fluorescent in situ hybridization, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) with subsequent band sequencing, and reverse line blot hybridization (RLB) with probes targeting 17 freshwater bacterial groups, were used for analysis of BCC. Furthermore, the salt tolerances of 47 strains affiliated with groups detected in or isolated from the Tibetan habitats were investigated. Altitude was not found to influence BCC significantly within the investigated range. Several groups of typical freshwater bacteria, e.g., the ACK-M1 cluster and the *Polynucleobacter* group, were detected in habitats located above 4,400 m. Salinity was found to be the dominating environmental factor controlling BCC in the investigated lakes, resulting in only small overlaps in the BCCs of freshwater and hypersaline lakes. The relative abundances of different classes of *Proteobacteria* showed a sharp succession along the salinity gradient. Both DGGE and RLB demonstrated that a few freshwater bacterial groups, e.g., GKS98 and LD2, appeared over wide salinity ranges. Six freshwater isolates affiliated with the GKS98 cluster grew in ecophysiological experiments at maximum salinities of 0.3% to 0.7% (oligosaline), while this group was detected in habitats with salinities up to 6.7% (hypersaline). This observation indicated ecologically significant differences in ecophysiological adaptations among members of this narrow phylogenetic group and suggested ecological significance of microdiversity.

Saline lakes constitute 45 percent of total inland water (running and stagnant waters) (47). Despite the quantitative importance of saline lakes, only a few studies have investigated the diversity of bacterioplankton in such habitats (13, 15, 23). By contrast, the influence of salinity on bacterioplankton community composition (BCC) in dynamic saline systems, such as estuaries (6, 11, 12, 25, 26, 37) and coastal solar salterns (3, 7, 8), has been well investigated. Therefore, the current knowledge on the influence of salinity on BCC is almost completely based on investigations of systems characterized by rapid changes in salinity. These systems are too dynamic to allow inhabitants to evolutionarily adapt to the changing environment. All studies on such systems indicate that salinity strongly controls BCC, i.e., changes in salinity are assumed to result in replacement of suboptimally adapted taxa by taxa better adapted to the current salinity conditions. By contrast, the slow evolution of large saline lakes from freshwater lakes may have allowed bacterial taxa originally adapted to freshwater conditions to adapt to saline conditions.

In order to reveal the influence of salinity on the BCC of stagnant inland waters, 16 lakes located at the Qinghai-Xizang (Tibetan) Plateau were investigated. The Qinghai-Xizang Plateau, located in the western part of China, is an endorheic area of ca. 2×10^6 km², with an average altitude of 4,500 m above sea level (53). This region comprises several thousand lakes, which cover a total area of 4.5×10^4 km² (44). The lakes are characterized by a geographic salinity gradient, which results from a gradual decrease of annual precipitation from south to north (51). The ages of lakes located at the Tibetan Plateau were estimated to be 2 to 8 million years (53).

The investigated lakes are characterized by a broad salinity gradient from freshwater to hypersaline, as well as by an altitude gradient ranging from 2,817 to 5,134 m. The set of investigated lakes includes Lake Qinghai, which is the seventh largest saline lake in the world, as well as five lakes located at altitudes above 4,400 m, which are among the most elevated lakes in the world.

The goals of this study were (i) to reveal the influence of salinity on BCC in habitats with stable salinity conditions, (ii) to investigate the salt tolerance of strains representing phylogenetic groups of bacteria detected in the investigated habitats or isolated from these habitats, and (iii) to explore whether typical groups of freshwater bacteria, which have frequently been detected in lowland habitats, are also present in high-mountain lakes located at extreme altitudes.

* Corresponding author. Mailing address: Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria. Phone: 43 6232 3125 29. Fax: 43 6232 3578. E-mail: martin.hahn@oeaw.ac.at.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

MATERIALS AND METHODS

Study sites and sampling. Sixteen lakes located in the eastern part of the Qinghai-Xizang (Tibetan) Plateau at altitudes ranging from 2,817 to 5,134 m above sea level were investigated (see Table S1 in the supplemental material). The lakes were chosen in order to cover a salinity gradient from 0.2 to 222.6 g liter⁻¹ (51) as well as an altitude gradient. Water samples were collected from surface waters (top 50 cm) with a 5-liter Schindler sampler. In the case of large, deep lakes, water samples were also taken from different water depths (see Table S1 in the supplemental material). Water samples for determination of numbers of prokaryotes and heterotrophic nanoflagellates (HNF) were fixed with 2% formaldehyde (final concentration) on location and analyzed within 3 months. Water samples for fluorescent *in situ* hybridization (FISH) were fixed with paraformaldehyde solution (2% final concentration) on location for 2 to 4 h, filtered onto 0.2- μ m-pore-size Isopore membrane filters (Millipore), rinsed with phosphate-buffered saline buffer and Milli-Q water, and dried at room temperature. Bacterioplankton samples (250 to 500 ml water) for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and reverse line blot hybridization (RLB) analyses were collected on 0.2- μ m-pore-size Isopore filters. Filters for both FISH and DNA extraction were stored in liquid nitrogen during the field campaign as well as during transport to the laboratory. Untreated water samples (2 to 3 liters) were transported to the laboratory for immediate chemical analysis.

Measurement of physical and chemical parameters. Water temperature, pH, conductivity, and Secchi depth were measured on location. Concentrations of the eight major ions potassium, sodium, calcium, magnesium, chloride, sulfate, carbonate, and bicarbonate, as well as the concentration of total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP), were measured according to standard methods (18) after transportation of samples to the laboratory. The salinity (salt concentration) of the investigated habitats was determined by summing up the concentrations of the eight major ions (47).

Microbial counts and FISH. Total bacterial numbers and numbers of HNF were determined by epifluorescence microscopy after DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) staining as described previously (50). FISH on filters was performed according to the protocol of Alfreider et al. (1) and as previously described (48). The probes used in this study were ARCH915 (39), EUB338 (2), ALF968 (32), BET42a (30), GAM42a (30), CFB319a (29), HGC69a (34), and NON338 (43).

DNA extraction and purification. DNA was extracted from biomass collected on filters by a standard phenol-chloroform extraction, precipitation with ethanol, and purification with the Wizard DNA clean-up kit (Promega) and concentrated to a volume of 50 μ l (36).

PCR and DGGE. Two nanograms of microbial DNA was used as template for PCR amplification of partial 16S rRNA genes by using *Bacteria*-specific primers 358f (5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3', with a 40-bp GC clamp) and 907rM (5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3') (31, 36). DGGE was carried out with a DCode system (Bio-Rad) by using a 6% polyacrylamide gel with a 30% to 70% gradient of a DNA denaturing agent as described previously (36). Eight hundred nanograms of PCR products was loaded, and the gel was run at 100 V for 16 h at 60°C in 1 \times Tris-acetate-EDTA buffer. The gel was stained with the nucleic acid stain SybrGold (Molecular Probes) for 45 min, rinsed with 1 \times Tris-acetate-EDTA buffer, and visualized under UV light.

Analysis of DGGE bands by sequencing. DGGE bands were excised, transferred into 20 μ l MilliQ water, and incubated overnight for elution of DNA. Two microliters of the supernatant was used for reamplification with the original primer pair (without a GC clamp). PCR products were purified with a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) and sequenced with primer 358f without a GC clamp. All long unambiguous sequences (ca. 500 bp) were phylogenetically analyzed using the ARB software package (<http://www.arb-home.de>), and phylogenetic trees were constructed as described previously (19). In the case of DGGE sequences containing ambiguities, the affiliations at the phylum or class level were determined by BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) but were omitted from further phylogenetic analyses.

RLB. RLB with antisense oligonucleotide probes targeting 16S rRNA sequences was performed as described previously (55). Eighteen probes, including 10 previously published (55) and 8 newly designed probes, were applied. These probes target bacterial 16S rRNA genes of 17 phylogenetic clusters of typical freshwater bacteria (54). The specificity and hybridization conditions of the applied probes are presented in Table S2 in the supplemental material. All probes were tested and have shown positive hybridization signals against natural samples or cultivated controls.

Salt tolerance of bacterial strains. The salt tolerances of 47 cultivated strains of aquatic bacteria (see Table S3 in the supplemental material) were determined. Thirty-seven out of the 47 strains have previously been isolated from different

freshwater habitats. These strains are affiliated with five phylogenetic groups of typical freshwater bacteria, i.e., GKS98 (54), *Polynucleobacter* subclusters PnecC and PnecD (19, 49), Luna-1 (acII A to C) (21, 45), and Luna-2 (acII D) (21, 45). Furthermore, 10 additional strains, representing four taxa affiliated with *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*, isolated from the studied lakes were investigated (see Table S3 in the supplemental material). The tested strains were precultured at room temperature in NSY medium (22). Ten microliters of the cultures growing in the exponential phase was dropped on NSY agar plates with salinities of 0.6 to 50 g liter⁻¹, or 1-ml samples of precultures were inoculated into liquid NSY medium for testing salinities above 50 g liter⁻¹. Twenty-one different salinities ranging from 0.06‰ to ~40‰ (0.6 to ~400 g liter⁻¹ [satiated solution]) were used in these ecophysiological experiments. The salinity was adjusted by the addition of sodium chloride to NSY medium, which has a salinity equivalent to 0.6 g liter⁻¹. The agar plates or liquid cultures were incubated at room temperature for 4 weeks and were inspected for bacterial growth weekly.

Statistics. Canonical correspondence analysis (CCA) was used for revealing relationships between BCC, as determined by FISH or DGGE, and environmental variables (40). CCA was performed with the software CANOCO 4.53 (Scientia Software). CCA requires a unimodal species-environment relationship (41), which can be assumed in cases where the length of the first detrended correspondence analysis axis run on species data is >2. This requirement was fulfilled by our data set. The environmental factors best describing the most influential gradients were identified by forward selection. Explanatory variables were added until the addition of further variables did not result in significant ($P < 0.05$) improvements to the model's explanatory power. This was assessed in permutation tests with 499 unrestricted Monte Carlo permutations. The relative abundances of major bacterial groups determined by FISH were transformed as $\log(x + 1)$. For analysis of DGGE fingerprints by CCA, a binary matrix was constructed by scoring the presence (1) and absence (0) of DGGE bands. This matrix was used for CCA without transformation. The environmental variables tested were salinity, TP, TN, altitude, lake area, temperature, pH, and abundance of HNF. Missing data of TP, TN, and water temperature of Lake Yanghu (see Table S1 in the supplemental material) were replaced by data measured in previous investigations during the same season (44). All environmental data, except pH, were transformed for CCA as $\log(x + 1)$. CCA was performed separately for FISH and DGGE data sets. Principle components analysis was applied to illustrate the main gradients in ion concentrations and their relationship with salinity.

Nucleotide sequence accession numbers. The 16S rRNA gene sequences obtained from DGGE bands and isolates have been deposited under the accession numbers AM182266 to AM182325.

RESULTS

Environmental characteristics of the investigated lakes. The major geographical and physicochemical characteristics of the investigated lakes are summarized in Table S1 in the supplemental material. The salinity ranged from 0.2 g liter⁻¹ (0.02‰; freshwater) to 222.6 g liter⁻¹ (22.3‰, hypersaline). All investigated saline habitats were characterized by high concentrations of sodium, chloride, and sulfate, and principal components analysis run on the data set of concentrations of the eight major ions resulted in clustering of all investigated habitats in one group. Furthermore, a positive relationship between salinity and the concentration of total nitrogen ($r^2 = 0.74$, $P < 0.001$, $n = 23$) was found.

Microbial numbers and FISH. The total prokaryotic abundances varied from 0.4×10^6 to 13.9×10^6 cells ml⁻¹ (Table 1). In general, higher cell numbers were observed in lakes with a higher concentration of total phosphorus and higher salinity. Analysis by FISH revealed that no single bacterial group dominated across all investigated lakes (Table 1). The relative abundances of *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Gammaproteobacteria* varied systematically along the salinity gradient (Fig. 1A to C). The relative abundance of *Alphaproteobacteria* exhibited a peaked distribution with higher relative abundances in the range of 20 to 100 g liter⁻¹ (poly- to hyper-

TABLE 1. Results obtained by FISH, DGGE, and RLB

Lake	Lake type	Salinity (g liter ⁻¹) ^c	Sampling depth (m)	Prokaryotic abundance (10 ⁶ cells ml ⁻¹)	% of DAPI-stained cells in ^a :							No. of DGGE bands	No. of RLB signals ^b
					ALF968	BET42a	GAM42a	CF319a	HGC69a	EUB338	ARCH915		
High lake 1	Freshwater	0.2	0.5	1.7	0.5	24.0	0	5.7	5.2	66.4	1.2	16	3
High lake 2	Freshwater	0.3	0.5	5.6	4.5	26.6	0	10.0	11.5	55.3	0.6	19	6
High lake 3	Freshwater	0.5	0.5	2.5	0.3	20.7	0	5.7	35.1	60.0	1.2	17	5
Kelike	Freshwater	0.7	0.5	2.3	1.4	14.3	4.6	1.6	27.2	51.9	1.2	ND ^d	ND
Pond	Freshwater	1.0	0.5	2.6	0.6	23.5	0.5	20.6	9.4	66.5	0	15	5
Yanghu	Oligosaline	1.9	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21	6
Narnocuo	Oligosaline	2.0	0.5	1.2	0.9	5.4	0	1.0	9.1	65.6	0.4	19	5
Narnocuo	Oligosaline	2.0	5	1.4	1.2	6.6	0.1	2.4	9.1	69.3	1.6	19	5
Narnocuo	Oligosaline	2.0	10	1.7	0.8	6.8	0.2	1.1	11.5	69.6	0.4	19	5
Narnocuo	Oligosaline	2.0	20	1.6	2.0	2.7	0.1	0.6	9.7	60.9	1.0	19	5
Narnocuo	Oligosaline	2.0	30	2.0	0	2.8	0.4	1.0	9.6	44.0	0.6	19	5
Narnocuo	Oligosaline	2.0	67	0.9	0.3	3.8	0	0.7	8.9	43.6	1.4	19	5
Erhai	Oligosaline	2.0	0.5	13.9	1.2	6.3	0	1.0	12.2	38.4	0	18	1
Agecuo	Oligosaline	3.6	0.5	4.5	5.0	2.2	3.3	2.0	6.6	39.0	0.2	ND	ND
Kuhai	Polysaline	18.1	0.5	6.3	12.5	3.1	9.5	4.4	19.3	55.5	0	ND	ND
Qinghai	Polysaline	22.6	0.5	0.4	13.9	5.8	4.0	1.8	3.4	35.2	0	18	3
Qinghai	Polysaline	22.4	5	0.5	7.4	3.5	3.4	4.4	5.2	31.3	0	18	3
Qinghai	Polysaline	23.0	10	0.6	6.2	4.1	3.6	4.1	4.3	25.5	0	18	3
Qinghai	Polysaline	22.9	17	0.8	13.9	3.0	0.3	2.6	6.2	29.8	0	18	3
Gahai 1	Hypersaline	66.7	0.5	0.6	18.1	6.5	15.6	5.6	9.8	51.9	1.5	12	1
Gahai 2	Hypersaline	99.8	0.5	3.5	11.0	1.6	13.6	3.5	9.1	71.5	0	15	0
High lake 4	Hypersaline	122.9	0.5	3.7	2.5	0	17.9	10.5	42.0	77.5	0	ND	ND
Xiaochaidan	Hypersaline	187.1	0.5	2.3	1.3	0	50.1	6.3	1.7	83.5	0	21	0
Dachaidan	Hypersaline	222.6	0.5	2.1	4.1	0	41.4	9.6	2.0	72.6	0	ND	ND

^a *Alphaproteobacteria*, probe ALF968; *Betaproteobacteria*, probe BET42a; *Gammaproteobacteria*, probe GAM42a; many *Bacteroidetes*, probe CF319a; *Actinobacteria*, probe HGC69a; *Bacteria*, probe EUB338; *Archaea*, probe ARCH915. Counts have been corrected by subtracting NON338 counts. Almost all NON338 counts had the typical characteristics of picocyanobacterial autofluorescence signals.

^b Number of probes which gave a signal.

^c Salinity equals the sum of the concentrations of the ions potassium, sodium, calcium, magnesium, chloride, sulfate, carbonate, and bicarbonate.

^d ND, not done.

saline) and peaked at a salinity of approximately 70 g liter⁻¹. *Betaproteobacteria* were abundant in all investigated freshwater lakes (14 to 27% of DAPI-stained cells), but in saline lakes, relative abundances never exceeded 7%, even though *Betaproteobacteria* could be detected in habitats with salinities up to 100 g liter⁻¹ (Fig. 1B). The presence of *Betaproteobacteria* in saline lakes was confirmed by DGGE and RLB (Fig. 1E). By contrast, the relative abundance of *Gammaproteobacteria* increased with increasing salinity (Fig. 1C). In the CCA model, salinity was found to be the dominating environmental factor statistically explaining variations in composition of major bacterial groups in the investigated lakes (Fig. 2).

DGGE analyses. Nineteen samples from 11 lakes were analyzed by DGGE (see Table S1 and Fig. S1 in the supplemental material). Between 12 and 21 bands were observed per sample (see Fig. S1 in the supplemental material). Analysis of DGGE fingerprints by CCA resulted in four clusters (Fig. 3) separated by salinity and lake area. The first cluster contained hypersaline lakes (Gahai 1, Gahai 2, and Xiaochaidan), the second contained polysaline (Qinghai), the third contained large oligosaline lakes (Narnocuo and Yanghu), and the fourth cluster contained all freshwater lakes (High lake 1, High lake 2, High lake 3, and Pond) as well as a small oligosaline lake (Erhai).

Sequencing of 92 DGGE bands (see Fig. S1 in the supplemental material) resulted in 55 sequences of acceptable quality over lengths of about 500 bp (see Table S4 in the supplemental material) and 33 sequences with many ambiguous positions (only fragments of 110 to 450 bp could be used for analysis), and sequencing of four bands failed completely. Several DGGE

band sequences obtained from freshwater habitats clustered within well-characterized groups of freshwater bacteria, while only a few of the sequences obtained from saline or hypersaline lakes were affiliated with typical freshwater bacteria (see Table S4 in the supplemental material). For example, band Gahai1-8 retrieved from hypersaline Lake Gahai 1 (salinity, 66 g liter⁻¹) clustered (see Fig. S2 in the supplemental material) within the freshwater bacterial group GKS98 (54) and shared a similarity of 98.6% with strain QLW-P2DMWB-4, which has been isolated from an acidic freshwater pond (Q. L. Wu and M. W. Hahn, unpublished data). Band Qinghai-14 obtained from polysaline Lake Qinghai, clustered within the picocyanobacterial *Synechococcus* group B (10) and was found to be closely related (sequence similarity, 99.6%) to *Synechococcus* sp. strain MW76B2, which has been isolated from freshwater Lake Mondsee (10).

Members of some other bacterial groups appeared only in saline and hypersaline lakes over wide salinity ranges. For instance, sequences of bands Gahai2-1 and Gahai2-2 (both from salinities of 100 g liter⁻¹) as well as Xiaochaidan-1 to Xiaochaidan-7 (salinity, 187 g liter⁻¹) were closely related to *Psychroflexus tropicus* (see Tables S2 and S4 in the supplemental material), which is an obligately halophilic bacterium isolated from a Hawaiian hypersaline lake (14). Sequences of bands Qinghai-11 to -13 and Gahai1-7 were affiliated with *Loktanella vestfoldensis*, a bacterium isolated from Antarctic lakes (42). These sequences were obtained from salinities of 22 g liter⁻¹ and 66 g liter⁻¹, respectively (see Tables S2 and S4 in the supplemental material).

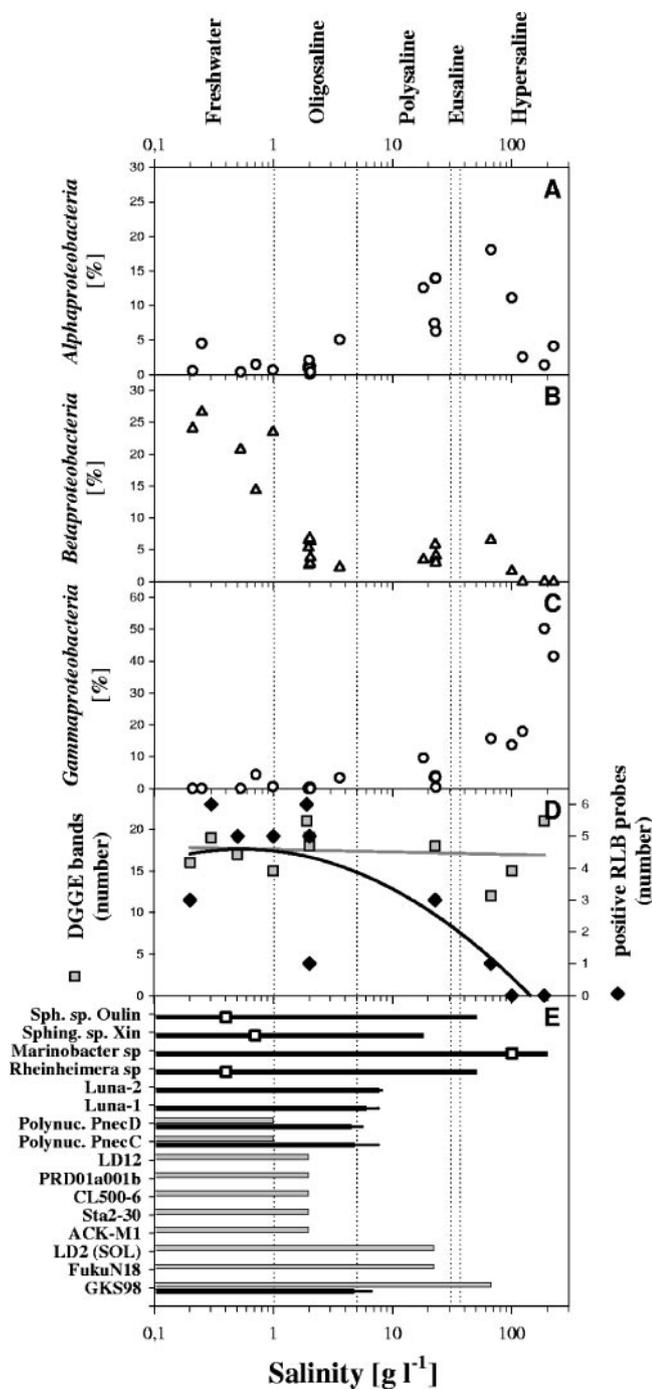


FIG. 1. (A to C) Relative abundances of *Alphaproteobacteria* (A), *Betaproteobacteria* (B), and *Gammaproteobacteria* (C) in Tibetan lakes along a salinity gradient as determined by FISH. (D) Number of DGGE bands (gray squares) and number of RLB probes with positive hybridization signals (black diamonds). Trends in changes of numbers with salinity are indicated by first (gray line) and second (black line) order regression lines. (E) Maximum salinity at which the growth of cultivated representatives of nine bacterial taxa was observed in laboratory experiments (black bars) and maximum salinity at which the respective bacterial groups were detected in the environment by RLB (gray bars). The results shown for the nine different taxa represent results from 2 to 15 investigated strains (see Table S3 in the supplemental material). The black bars indicate the average maximum salinities at which growth of strains was observed, and the narrow extension indicates the highest salinity at which a member of the group grew. The

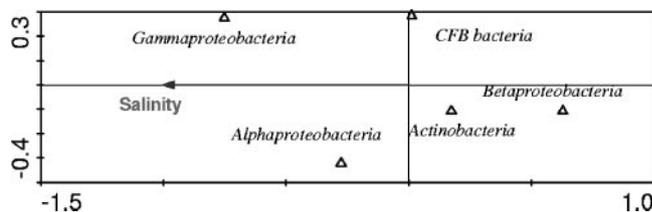


FIG. 2. CCA biplot based on FISH and environmental data of 15 investigated lakes (see Table S1 in the supplemental material). For Lake Qinghai and Namocuo, only data from the epilimnion were used. The analyzed bacterial groups were *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes* (CFB bacteria). Salinity was the dominant factor significantly ($P < 0.05$) explaining the differences in composition of major bacterial groups. The x axis explained 37% of the observed variation.

Analysis of the 88 sequences obtained from DGGE bands revealed that they were affiliated with six major phylogenetic groups (Fig. 4). The majority of analyzed bands represented bacteria affiliated with *Bacteroidetes*, followed by *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria*. In five of these groups, >73% of sequences originated either from freshwater and oligosaline (salinity, ≤ 2 g liter⁻¹) or from polysaline and hypersaline (salinity, > 22 g liter⁻¹) habitats. Only the sequences affiliated with *Bacteroidetes* almost equally originated from these two groups of habitats differing in salinity.

RLB. The BCCs in 11 habitats were investigated by RLB. In total, 10 of the 15 targeted groups were detected in the investigated high-mountain lakes (Fig. 1E). The number of detected groups decreased with increasing salinity (Fig. 1D). While all 10 detected groups were found in at least one of the seven investigated freshwater and oligosaline habitats, only 3 groups were detected in the four investigated habitats with salinities higher than 2 g liter⁻¹ (Fig. 1E). Thus, only a few of the investigated groups of typical freshwater bacteria occurred over broad salinity ranges. These groups were GKS98 (*Betaproteobacteria*), which was detected at salinities of 22 g liter⁻¹ and 66 g liter⁻¹, and LD2 (SOL cluster, *Bacteroidetes*) and FukuN18 (*Verrucomicrobia*), both of which were detected at a salinity of 22 g liter⁻¹. In contrast, the three probes targeting the *Polynucleobacter* group (*Betaproteobacteria*) were positive only in freshwater habitats, with salinities of < 1 g liter⁻¹. Groups ACK-M1, CL500-6, and PRD01a001b were detected across all freshwater and oligosaline lakes, while groups Sta2-30 and LD12 were found just in oligosaline lakes (Lake Yanghu and Lake Namocuo). In hypersaline Lakes Gahai 2 and Xiaochaidan, no bacterial groups were detected by the applied RLB probes.

Groups of typical freshwater bacteria detected in lakes above 4,400 m elevation. Eight phylogenetic groups of bacteria, previously detected frequently in lowland freshwater habitats, were detected by RLB or DGGE/band sequencing in the five

open squares overlaying the respective bars indicate the salinity of the habitats from which the Tibetan strains were obtained. RLB probes were available only for the lower 10 bacterial groups. Sph. sp. Oulin, *Sphingomonas* sp. "Oulin"; Sphing. sp. Xin, *Sphingomonas* sp. "Xin"; Polynuc., *Polynucleobacter*.

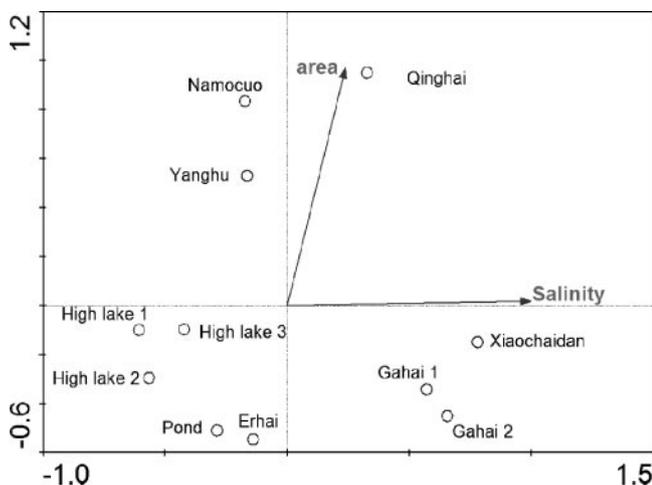


FIG. 3. CCA biplot based on DGGE data and environmental factors of 11 investigated lakes (see Table S1 in the supplemental material). The plot illustrates the differences in BCC in relation to the two environmental factors significantly ($P < 0.05$) influencing BCC. For Lake Qinghai and Namocuo, only data from the epilimnion were used. The eigenvalues of the x and y axes were 0.97 and 0.63, respectively. The two axes explained 45% of the observed variation in BCC. Salinity was strongly correlated with the x axis.

lakes located at altitudes of $>4,400$ m (see Table S1 in the supplemental material). These five lakes included freshwater and oligosaline lakes. The groups ACK-M1 (*Actinobacteria*), CL500-6 (*Bacteroidetes*), and PRD01a001b (*Bacteroidetes*) were detected in all five lakes. Three other groups, i.e., *Polynucleobacter* (*Betaproteobacteria*), LD12 (*Alphaproteobacteria*), and Sta2-30 (*Actinobacteria*), were each detected in two out of these five lakes, and two groups, i.e., *Rhodospirillum rubrum* sp. BAL47 (*Betaproteobacteria*) and *Synechococcus* cluster 6b (*Cyanobacteria*), were each detected in one out of these five lakes.

Salt tolerance of cultivated strains. The maximum salinities at which growth of tested bacterial strains belonging to Luna-1, Luna-2, *Polynucleobacter* subclusters PnecC and PnecD, and GKS98 was observed were 7.6, 8.1, 7.6, 5.6, and 6.6 g liter⁻¹, respectively (Fig. 1E). In contrast, the 10 strains, representing four taxa, isolated from the studied Tibetan lakes demonstrated a much higher salinity tolerance (Fig. 1E). Representatives of three of these four taxa were obtained from freshwater habitats, but despite this origin, the strains were able to grow under polysaline (all taxa) or even hypersaline conditions (two taxa).

DISCUSSION

Currently, the factors controlling the distribution of bacterial groups known to inhabit many freshwater lakes are not well established. In order to learn more about these controlling factors, bacterioplankton in several high-mountain lakes covering two major gradients was investigated by cultivation-independent methods. The first major gradient was altitude, ranging from 2,817 m to 5,134 m, and the second was salinity, ranging from 0.2 g liter⁻¹ (0.02%, freshwater) to 222.6 g liter⁻¹ (22.3%, hypersaline).

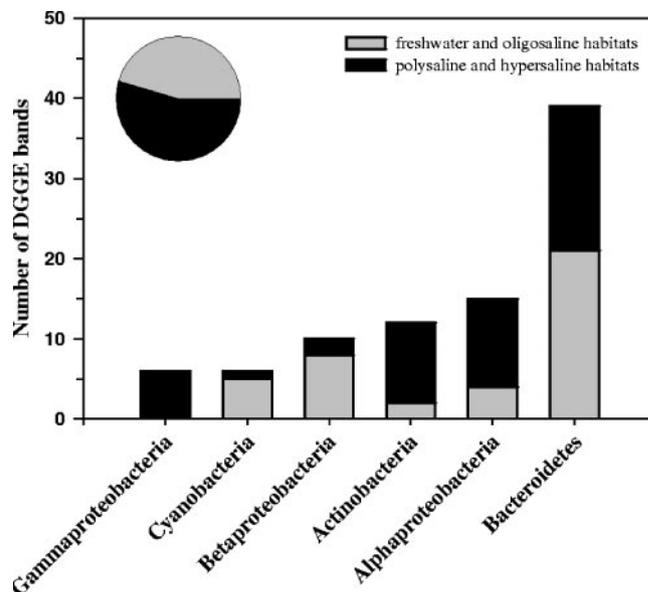


FIG. 4. Phylogenetic affiliation of the 88 sequences obtained from DGGE bands. The origins of sequences from habitats with salinities of ≤ 2 g liter⁻¹ (freshwater and oligosaline) and >22 g liter⁻¹ (polysaline and hypersaline) were distinguished. The pie chart shows the contribution of the two habitat types to the total number of analyzed sequences.

Influence of altitude on bacterioplankton community composition. Solar UV radiation (UVR) is a crucial environmental factor in high-mountain lakes because of the natural increase of the UVR flux with elevation and the usually higher water transparency of high-mountain lakes (38). The increase of UVR with altitude is influenced by several factors, including atmospheric turbidity and the solar zenith angle. Most previous estimations of the UV altitude effect were in the range of 10% to 20% UVR increase per 1,000 m altitude (4, 38). According to these previous estimates, the potential UVR impacts on the investigated Tibetan lakes differed due to altitude by 20% to 40%. The UVR impact differences between the investigated Tibetan lakes and lowland lakes greatly exceeded this range.

Despite the expected strong altitude-dependent differences in UVR intensity, CCA did not indicate an influence of altitude on BCC (Fig. 2 and 3). Warnecke et al. (46) observed a positive correlation between the relative abundance of *Actinobacteria* affiliated with the acI lineage and ambient levels of solar UV radiation in eight lakes located above the timberline at altitudes of 1,650 to 2,799 m and hypothesized a high UV resistance by bacteria affiliated with this lineage. In that study, *Actinobacteria*, which were $>90\%$ affiliated with the acI lineage, contributed up to 70% of the total bacterial abundances (46). By contrast, our investigation did not reveal a prevalence of *Actinobacteria* or of the acI lineage in the studied Tibetan habitats. In fact, the ACK-M1 group was detected in all five of the studied freshwater lakes, and the Sta2-30 group was detected in two out of the five studied freshwater lakes located at $>4,400$ m. These groups are major subgroups of the acI lineage. Previous investigations of lowland freshwater lakes also detected the ACK-M1 group in all of the 81 (55) and 15 (28)

investigated lakes. The other acI subgroup, i.e., Sta2-30, was previously detected in >85% of the habitats investigated by RLB (28, 55). Thus, the presence of acI *Actinobacteria* (i.e., ACK-M1 and/or Sta2-30) in all investigated Tibetan freshwater habitats cannot be interpreted as a result of a high UVR resistance of acI bacteria. Interestingly, the vertical profiles of BCC in the thermally stratified Lake Namocuo (Table 1) revealed by DGGE and FISH did not indicate a pronounced change of BCC with depths (see Fig. S1 in the supplemental material). Variation of BCC with depths could have been a second possible evidence of a structuring influence of UVR. Thus, we did not obtain any hints on a structuring influence of UVR on BCC. However, since these results might be due to other effects overlapping with a potential impact of UVR, ecophysiological experiments with isolates representing several groups of typical freshwater bacteria could be attempted to reveal potential differences in UVR sensitivity.

Two-thirds of the groups of typical freshwater bacteria targeted by RLB probes were detected in the investigated high-mountain habitats, which indicates that the distribution of these groups was not limited by UVR or altitude within the investigated ranges. The absence of the other five groups targeted by RLB probes could be a result of the small number of investigated freshwater habitats as well as of their relatively narrow ecological variation among the investigated freshwater habitats. Due to similar geological settings, the investigated Tibetan freshwater habitats had similar ion compositions and displayed a narrow pH range (see Table S1 in the supplemental material). Restrictions in distribution of freshwater bacteria due to water chemistry have previously been shown (35). The distribution of group CL0-14 (*Verrucomicrobia*), which was not detected in Tibetan habitats, was found to be negatively correlated with pH (28); therefore, the lack of detection of this group could have been a result of the high pH in the Tibetan lakes. In previous studies, group Urk-014 (*Actinobacteria*) was detected only in 9 out of 81 lakes representing a broad ecological diversity (55) and in 2 out of 15 diverse lakes (28). Groups Sta2-35 (*Verrucomicrobia*) and FukuN47 (*Bacteroidetes*) were not previously investigated by RLB. Both phylogenetic groups are represented only by a few 16S rRNA sequences and are known only from a few habitats (54). The probe targeting Sta2-35 and probe FukuN47 match only two and six ribosomal sequences deposited in GenBank, respectively. Therefore, the lack of detection of these five groups of freshwater bacteria in the Tibetan habitats cannot be interpreted as an inability by these bacteria to inhabit high-mountain lakes.

Altogether, our data clearly demonstrated that some groups of bacteria, which are well known from lowland freshwater habitats (54), were also present in the investigated high-mountain freshwater lakes. Thus, altitude and/or intensity of UVR did not appear to limit the distribution of these phylogenetic groups of bacteria. On the other hand, we cannot exclude that the distribution of groups not detected in our investigation was limited by these factors.

Influence of salinity on bacterioplankton community composition. Salinity was clearly the major factor responsible for differences in BCC in the investigated habitats. A clear succession of proteobacterial groups along the salinity gradient was observed (Fig. 1A to C), and 70% of the typical freshwater

bacteria groups were restricted to salinities of <0.2‰ (Fig. 1D). Only a few groups of bacteria, which were detected previously or in the current study in habitats with salinities of <0.2‰, were also detected in Tibetan habitats with salinities of >0.2‰. These groups were GKS98, LD2, FukuN18, acIII, and *Synechococcus* group B (Fig. 1E and 4). The betaproteobacterial GKS98 group (54) was detected by both RLB and DGGE/sequencing in hypersaline Lake Gahai 1, and the detection of LD2 bacteria by RLB in the large, polysaline Lake Qinghai confirmed a previous report on the detection of this group in the same habitat by an LD2-specific FISH probe (35).

The observed succession of proteobacterial groups along the salinity gradient is consistent with previous observations from dynamic saline systems but was previously never observed as clearly as in our investigation on stable freshwater and saline habitats. The high relative abundance of *Betaproteobacteria* in freshwater habitats and their decrease with increasing salinity was observed previously in studies on inland waters (13, 17) or estuaries and other habitats influenced by seawater (3, 6, 9, 25). A positive but weak correlation of the relative abundance of *Alphaproteobacteria* with salinity was observed in the Delaware Estuary (25), and investigations on habitats exceeding the salinity of seawater also demonstrated high relative abundances of this bacterial group (3, 23). High percentages of *Gammaproteobacteria* under hypersaline conditions were also observed in a solar saltern (3) and in Mono Lake (23) but not under the eusaline or polysaline conditions present in estuaries (6, 25). The observed relationship between the relative abundance of these three proteobacterial groups and salinity seems to be independent of the stability of the habitats. This relationship was consistently found in dynamic habitats, such as solar salterns (3) and estuaries (6), as well as in the Tibetan lakes characterized by stable salinity. Thus, relatively rapid increases of salinity to certain salinity levels (as in solar salterns) and stable salinity conditions at the same level of salinity select for taxa within the same proteobacterial classes but not for the same taxa.

According to general ecological principles, more-extreme environments are expected to be inhabited by less diverse communities (16). The performed DGGE analysis of BCC along the investigated salinity gradient seems to be in contradiction with this principle (Fig. 1D), since the number of DGGE bands did not decrease with increasing salinity. The same phenomenon was observed in investigations of BCC along a salinity gradient in a solar saltern (8). In both investigations, the decrease of bacterial diversity with increasing salinity was superimposed by a trend of increasing microdiversity (i.e., the appearance of closely related ribotypes slightly differing in 16S rRNA sequences) within the remaining groups of bacteria. Closely related sequences affiliated with such microdiverse groups appeared in the DGGE analysis as separate bands and compensated the disappearance of other bands. We observed this phenomenon in three independent groups, i.e., *Psychroflexus* spp., acIII lineage, and *Loktanella* spp. (see Fig. S2 in the supplemental material). Part of this microdiversity might result from heteroduplex formation; however, a substantial part of the microdiversity observed under hypersaline conditions might be real (8).

Ecophysiological adaptation to salinity. Most of the groups of typical freshwater bacteria detected in the Tibetan habitats

exclusively appeared at salinities of ≤ 2 g liter⁻¹. The 37 strains representing five groups of typical freshwater bacteria (three of them were detected in Tibetan habitats) demonstrated in ecophysiological tests rather uniform salt tolerances, with the highest tolerated salinities, 5.6 to 8.1 g liter⁻¹. These results may indicate the possible width of the fundamental niches of the strains; however, it is expected that the realized niches are significantly narrower. In agreement with this assumption, the two investigated *Polynucleobacter* subclusters appeared only in the Tibetan habitats at much lower salinities than those tolerated in the experiments (Fig. 1E). In contrast, the maximal salinity at which the six freshwater isolates (obtained from non-Tibetan habitats) affiliated with the GKS98 cluster grew was 10-fold lower than the maximal salinity at which this group was detected in the Tibetan habitats. This indicated significant differences in ecophysiological adaptations among members of the phylogenetically narrow GKS98 cluster (54). Obviously, these differences in ecophysiological adaptations are of importance in the colonization of ecologically diverse habitats. Members of the GKS98 cluster have been detected in soft water (33) in 13 out of 15 diverse freshwater lakes in Scandinavia (28) as well as in an acidic and humic freshwater pond (see Table S3 in the supplemental material).

In contrast to the strains affiliated with typical groups of freshwater bacteria, the seven strains isolated from Tibetan freshwater habitats demonstrated pronounced halotolerances in the ecophysiological experiment. This may indicate a larger niche width in terms of salinity. Interestingly, the three taxa represented by these seven isolates have never been reported to be abundant in freshwater or saline habitats. This may indicate a trade-off between adaptations providing a broad halotolerance and adaptations providing a high competitiveness.

Conclusions. Salinity was the dominating environmental factor controlling BCC in the investigated lakes. Especially, the observed systematic succession of proteobacterial groups along the investigated salinity gradient demonstrated the structuring influence of salinity. No other previously revealed factor influencing BCC in lacustrine inland waters (27, 28, 35, 46, 52) has been found to be as powerful as salinity. In contrast to salinity, altitude and/or UVR impact did not limit the distribution of several groups of typical freshwater bacteria. Only minor compositional overlaps between bacterioplankton communities of freshwater and hypersaline lakes were observed, while in all previous comparisons of BCC between ecologically diverse freshwater habitats (differing in pH, trophic status, dissolved organic carbon, etc.), much larger overlaps have been observed (28, 52, 55). These observed overlaps of BCCs of different freshwater systems, as well as the rare overlaps between freshwater and saline systems, were attributed to the presence of phylogenetic groups with high ecological plasticity. The most pronounced ecological plasticity was observed for the GKS98 group (54), which inhabits freshwater habitats with very low salt concentrations (e.g., Lake Gossenköllesee [33]) as well as hypersaline lakes with a twofold-higher salinity than seawater (Fig. 1E). In the case of this group, the ecological plasticity was not an intrinsic trait of all strains affiliated with the group. In fact, the ecological plasticity seemed to result from a diversity of specific ecophysiological adaptations among members of this group. This conclusion is in accordance with previously demonstrated ecophysiological diversity within microdiverse

groups of freshwater bacteria (5, 20, 24, 50) and highlights the significance of microdiversity in the ecology of at least some freshwater bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Xiangdong Yang, Xingqi Liu, and Weilang Xia for their assistance in sampling of the lakes and Hongxi Pang for water chemistry analysis.

The China National Key Basic Research Project (G2005CB422000) supported the field sampling, and the National Natural Science Foundation of China (grant 30370278) and the Austrian Science Foundation (grant P15655) funded the research.

REFERENCES

- Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F. Glöckner, A. Wille, and R. Psenner. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2138–2144.
- Amann, R., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919–1925.
- Benlloch, S., A. López-López, E. O. Casamayor, L. Øvreås, V. Goddard, F. L. Daae, G. Smerdon, R. Massana, I. Joint, F. Thingstad, C. Pedrós-Alió, and F. Rodríguez-Valera. 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ. Microbiol.* **4**:349–360.
- Blumthaler, M., W. Ambach, and R. Ellinger. 1997. Increase in solar UV radiation with altitude. *J. Photochem. Photobiol. B* **39**:130–134.
- Boenigk, J., P. Stadler, A. Wiedroither, and M. W. Hahn. 2004. Strain-specific differences in the grazing sensitivity of closely related ultramicrobacteria affiliated with the *Polynucleobacter* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5787–5793.
- Bouvier, T. C., and P. A. del Giorgio. 2002. Compositional changes in free living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnol. Oceanogr.* **47**:453–470.
- Casamayor, E. O., J. I. Calderón-Paz, and C. Pedrós-Alió. 2000. 5S rRNA fingerprints of marine bacteria, halophilic archaea and natural prokaryotic assemblages along a salinity gradient. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**:113–119.
- Casamayor, E. O., R. Massana, S. Benlloch, L. Øvreås, B. Diez, V. J. Goddard, J. M. Gasol, I. Joint, F. Rodríguez-Valera, and C. Pedrós-Alió. 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ. Microbiol.* **4**:338–348.
- Cottrell, M. T., and D. L. Kirchman. 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware Estuary. *Limnol. Oceanogr.* **48**:168–178.
- Crosbie, N. D., M. Pöckl, and T. Weisse. 2003. Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-intergenic spacer sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5716–5721.
- Crump, B. C., C. S. Hopkinson, M. L. Sogin, and J. E. Hobbie. 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1494–1505.
- Crump, B. C., E. V. Armbrust, and J. A. Baross. 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3192–3204.
- Demergasso, C., E. O. Casamayor, G. Chong, P. Galleguillos, L. Escudero, and C. Pedrós-Alió. 2004. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, northern Chile. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**:57–69.
- Donachie, S. P., J. P. Bowman, and M. Alam. 2004. *Psychroflexus tropicus* sp. nov., an obligately halophilic *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group bacterium from an Hawaiian hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:935–940.
- Donachie, S. P., S. Hou, K.-S. Lee, C. W. Riley, A. Pikina, C. Belisle, S. Kempe, T. S. Gregory, A. Bossuyt, J. Boerema, J. Liu, T. A. Freitas, A. Malahoff, and M. Alam. 2004. The Hawaiian archipelago: a microbial diversity hotspot. *Microb. Ecol.* **48**:509–520.
- Frontier, S. 1985. Diversity and structure in aquatic ecosystems. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **23**:253–312.
- Glöckner, F. O., B. M. Fuchs, and R. Amann. 1999. Bacterioplankton composition of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3721–3726.
- Greenberg, A. E., L. S. Clesceri, and A. D. Eaton. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, D.C.

19. Hahn, M. W. 2003. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5248–5254.
20. Hahn, M. W., and M. Pöckl. 2005. Ecotypes of planktonic *Actinobacteria* with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:766–773.
21. Hahn, M. W., H. Lünsdorf, Q. L. Wu, M. Schauer, M. G. Höffe, J. Boenigk, and P. Stadler. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1442–1451.
22. Hahn, M. W., P. Stadler, Q. L. Wu, and M. Pöckl. 2004. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J. Microbiol. Methods* **57**:379–390.
23. Humayoun, S. B., N. Bano, and J. T. Hollibaugh. 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1030–1042.
24. Jaspers, E., and J. Overmann. 2004. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4831–4839.
25. Kirchman, D. L., A. I. Dittel, R. R. Malmstrom, and M. T. Cottrell. 2005. Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnol. Oceanogr.* **50**:1697–1706.
26. Langenheder, S., V. Kisand, J. Wikner, and L. J. Tranvik. 2003. Salinity as a structuring factor for the composition and performance of bacterioplankton degrading riverine DOC. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**:189–202.
27. Lindström, E. 2001. Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microb. Ecol.* **42**:598–605.
28. Lindström, E. S., M. P. Kamst-Van Agterveld, and G. Zwart. 2005. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8201–8206.
29. Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K.-H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* **142**:1097–1106.
30. Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593–600.
31. Muyzer, G., S. Hottenträger, A. Teske, and C. Waver. 1995. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA—a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities, p. 3.4.4.1–3.4.4.22. In A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*, 2nd ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
32. Neef, A. 1997. Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Ph.D. thesis. Technische Universität München, Munich, Germany.
33. Pernthaler, J., F.-O. Glöckner, S. Unterholzner, A. Alfreider, R. Psenner, and R. Amann. 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4299–4306.
34. Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1994. In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**:2849–2858.
35. Schauer, M., C. Kamenik, and M. W. Hahn. 2005. Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, *Saprosiraceae*, *Bacteroidetes*). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5900–5907.
36. Schauer, M., V. Balagué, C. Pedrós-Alió, and R. Massana. 2003. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**:163–174.
37. Selje, N., and M. Simon. 2003. Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the Weser Estuary, Germany. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**:221–237.
38. Sommaruga, R. 2001. The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *J. Photochem. Photobiol. B* **62**:35–42.
39. Stahl, D. A., and R. Amann. 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205–248. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom.
40. ter Braak, C. J. F., and P. F. M. Verdonschot. 1995. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquat. Sci.* **57**:255–289.
41. ter Braak, C. J. F. 1987. The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* **69**:69–77.
42. Van Trappen, S., J. Mergaert, and J. Swings. 2004. *Loktanella salsilacus* gen. nov., sp. nov., *Loktanella fryxellensis* sp. nov. and *Loktanella vestfoldensis* sp. nov., new members of the *Rhodobacter* group, isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1263–1269.
43. Wallner, G., R. Amann, and W. Beisker. 1993. Optimizing fluorescent *in situ*-hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**:136–143.
44. Wang, S., and H. Dou. 1998. *Lakes in China*. Science Press, Beijing, China. (In Chinese.)
45. Warnecke, F., R. Amann, and J. Pernthaler. 2004. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microbiol.* **6**:242–253.
46. Warnecke, F., R. Sommaruga, R. Sekar, J. S. Hofer, and J. Pernthaler. 2005. Abundances, identity, and growth state of *Actinobacteria* in mountain lakes of different UV transparency. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5551–5559.
47. Wetzel, R. G. 2001. *Limnology*. Academic Press, San Diego, Calif.
48. Wu, Q. L., and M. W. Hahn. 2006. Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**:67–79.
49. Wu, Q. L., and M. W. Hahn. High predictability of the seasonal dynamics of a species-like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake. *Environ. Microbiol.*, in press.
50. Wu, Q. L., J. Boenigk, and M. W. Hahn. 2004. Successful predation of filamentous bacteria by a nanoflagellate challenges current models of flagellate bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:332–339.
51. Yang, X. D., C. Kamenik, R. Schmidt, and S. M. Wang. 2003. Diatom-based conductivity and water-level inference models from eastern Tibetan (Qinghai-Xizang) Plateau lakes. *J. Paleolimnol.* **30**:1–19.
52. Yannarell, A. C., and E. W. Triplett. 2004. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:214–223.
53. Zheng, D., and T. D. Yao. 2004. Uplifting of Tibetan Plateau with its environmental effects. Science Press, Beijing, China. (In Chinese.)
54. Zwart, G., B. C. Crump, M. P. Kamst-van Agterveld, F. Hagen, and S.-K. Han. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:141–155.
55. Zwart, G., E. J. van Hannen, M. P. Kamst-van Agterveld, K. van der Gucht, E. S. Lindström, J. Van Wichelen, T. Lauridsen, B. C. Crump, S.-K. Han, and S. Declerck. 2003. Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5875–5883.

a a a

ab Geographical, physical, and chemical characteristics of the investigated Tibetan lakes.

Lakes	Sampling depth (m)	Longitude (E)	Latitude (N)	Altitude (m)	Area (km ²)	Sampling date	pH	Salinity* (g L ⁻¹)	Lake type	Temperature	Total nitrogen (mg L ⁻¹)	Total phosphorus (mg L ⁻¹)	Performed Investigations
High Lake 1	0.5	91.966	32.916	5134	6.7	23-Jul-04	8.2	0.2	Freshwater	11.0	0.20	0.025	FISH, DGGE, RL
High Lake 2	0.5	91.522	32.405	4987	0.1	23-Jul-04	9.2	0.3	Freshwater	10.9	0.87	0.045	FISH, DGGE, RL
Oulinco	0.5	97.426	35.033	4279	610.7	10-Jul-05	8.7	0.4	Freshwater	9.5	0.38	n.d.	I [§]
High Lake 3	0.5	91.464	31.144	4548	15.0	24-Jul-04	8.6	0.5	Freshwater	15.1	0.77	0.045	FISH, DGGE, RL
Xinxinhai	0.5	98.075	34.505	4219	29.3	05-Jul-05	8.5	0.7	Freshwater	13.0	0.72	n.d.	I
Kelike	0.5	96.964	37.380	2817	56.7	21-Jul-05	9.0	0.7	Freshwater	19.8	0.63	n.d.	FISH
Pond	0.5	100.740	36.577	3210	0.5	15-Jul-04	8.7	1.0	Freshwater	15.7	1.09	0.035	FISH, DGGE, RL
Yanghu	0.5	90.435	29.117	4462	638.0	02-Aug-04	9.2	1.9	Oligosaline	ND	ND	ND	DGGE, RLB
Namocuo	0.5	90.869	30.707	4710	1864.0	26-Jul-04	9.4	2.0	Oligosaline	10.8	0.31	0.025	FISH, DGGE, RL
	5						9.4	2.0		10.8	0.23	0.045	FISH, DGGE, RL
	10						9.4	2.0		10.0	0.24	0.045	FISH, DGGE, RL
	20						9.4	2.0		6.0	0.26	0.036	FISH, DGGE, RL
	30						9.4	2.0		6.0	0.25	0.036	FISH, DGGE, RL
	67						9.4	2.0		4.6	0.31	0.036	FISH, DGGE, RL
Erhai	0.5	100.739	36.576	3203	5.0	15-Jul-04	8.4	2.0	Oligosaline	16.5	2.3	0.165	FISH, DGGE, RL
Agecuo	0.5	98.102	34.471	4216	22.7	11-Jul-05	9.1	3.6	Oligosaline	9.2	0.86	n.d.	FISH
Kuhai	0.5	99.115	35.192	4130	44.4	14-Jul-05	8.8	18.1	Polysaline	14.0	1.77	0.016	FISH
Qinghai	0.5	100.509	36.607	3203	4340.0	16-Jul-04	9.3	22.6	Polysaline	13.5	0.94	0.015	FISH, DGGE, RL
	5						9.3	22.4		13.0	0.90	0.006	FISH, DGGE, RL
	10						9.3	23.0		13.0	0.95	0.006	FISH, DGGE, RL
	17						9.3	22.9		12.0	0.97	0.015	FISH, DGGE, RL
Gahai 1	0.5	100.580	37.006	3211	47.2	15-Jul-04	9.2	66.7	Hypersaline	15.9	2.05	0.036	FISH, DGGE, RL
Gahai 2	0.5	97.550	37.150	2849	32.0	19-Jul-04	8.3	99.8	Hypersaline	21.0	2.7	0.045	FISH, DGGE, RLI
High Lake 4	0.5	97.224	34.495	4290	2.0	07-Jul-05	9.0	122.9	Hypersaline	15.0	1.29	n.d.	FISH
Xiaochaidan	0.5	95.170	37.480	3172	71.5	20-Jul-04	9.2	187.1	Hypersaline	21.0	3.8	0.086	FISH, DGGE, RL
Dachaidan	0.5	95.080	37.830	3148	200.0	21-Jul-04	9.8	222.6	Hypersaline	16.7	6.36	0.045	FISH

* - Sum of the ions potassium, sodium, calcium, magnesium, chloride, sulfate, carbonate and bicarbonate; § I - isolation; ND - not determined; n.d. - not detectable

ab Sequences, specificity, and characteristics of oligonucleotide probes applied for reverse line blot hybridizations.

Probe	Targeted Group	Affiliation	Probe sequence (5'-3')	<i>E. coli</i> position	Amt. applied (pmol)	No. of nongroup sequences with single mismatch ^a	Reference
Uni518	Most organisms	-	GTATTACCGCGGCTGCTGG	518-536	625	-	55
LD12-143	LD12	<i>Alphaproteobacteria</i>	TTTCCCAATGTTGTCCTGAA	143-162	312.5	0	55
LD28-451	LD28	<i>Betaproteobacteria</i>	TCATGATTTATTCGATCATAAGTTTT	451-476	1250	0	55
Polynuc451	<i>Polynucleobacter</i> (subcluster PnecC)	<i>Betaproteobacteria</i>	TGTGTTAGAGCCGGTGT	451-469	1250	0	This study
Polynuc123 ^b	<i>Polynucleobacter</i> (subcluster PnecB and PnecC)	<i>Betaproteobacteria</i>	CGATAAGGTACGTTCCGATG	123-142	1250	0	This study
PolynucD123-144 ^c	<i>Polynucleobacter</i> (subcluster PnecD)	<i>Betaproteobacteria</i>	CACAATAAGGTACGTTCCGATA	123-144	1250	0	This study
GKS98-442	GKS98	<i>Betaproteobacteria</i>	TGTGCGATTTCTTCTCTGC	442-460	1250	0	55
Sta230-187	Sta2-30	<i>Actinobacteria</i>	AATTCCTTCAAACTCAGTGATGC	187-210	625	0	55
Sta230-208	Sta2-30	<i>Actinobacteria</i>	AAGTCATCCTCCACCGAAAT	208-228	1250	0	55
Urk014-126	Urk-014	<i>Actinobacteria</i>	GACCGGGGTTGGTTTCTC	126-142	2500	0	55
ACK-M1-193	ACK-M1	<i>Actinobacteria</i>	TCTTCAACCGAAAACTTTCC	193-228	125	0	55
CL0-14-464	CL0-14	<i>Verrucomicrobia</i>	GTATGAGCCTGGCCATTAGTC	464-485	2500	0	55
FukuN18-221	FukuN18	<i>Verrucomicrobia</i>	CGCGAGCTCATCAGGAAG	221-238	2500	0	55
Sta235-83	Sta2-35	<i>Verrucomicrobia</i>	CTGCTGACCCAGAATATTGC	83-102	1250	0	This study
CL500-6-64	CL500-6	<i>Bacteroidetes</i>	ACTACTCAACTTGCCGCTC	64-82	1250	0	This study
FukuN47-208	FukuN47	<i>Bacteroidetes</i>	CCATCATCTAGCGCCGAA	208-225	1250	0	This study
PRD01a001b-134	PRD01a001b	<i>Bacteroidetes</i>	GCTATCCCCAATGTAAGGT	134-153	1250	0	This study
LD2-457	LD2 (SOL cluster)	<i>Bacteroidetes</i>	GTACCGTCAAATACTCTTAAAAGAA	457-481	1250	0	This study

^a Based on Gene bank and Ribosomal Database Program-II.

^b Targeting a subgroup of subcluster PnecB and all members of subcluster PnecC except of three endosymbionts.

^c Four strains belonging to subcluster PnecD are not targeted by the probe. The probe shows one mismatch to sequences of all four strains.

ab . Phylogenetic affiliation and origin of bacterial strains used for salt tolerance tests.

Phylogenetic Groups	Strain	Accession number	Origination [§]	Maximum salinity (gL ⁻¹) [§]	Reference
GKS98 cluster (<i>Betaproteobacteria</i>)	MWH-P2sevCIb	AJ938028	Pond, Austria	6.6	Hahn & Wu, unpubl.
	MWH-P2sevCIIIb	AJ938029	Pond, Austria	6.6	Hahn & Wu, unpubl.
	QLW-P2DATB-2	AJ938030	Pond, Austria	5.6	Hahn & Wu, unpubl.
	QLW-P2DMWB-4	AJ938031	Pond, Austria	4.6	Hahn & Wu, unpubl.
	LF4-65	AJ964889-	Lake Loosdrecht, The Netherlands	3.6	Hahn & Zwart, unpubl.
	LII-63	AJ964890	Lake Loosdrecht, The Netherlands	3.6	Hahn & Zwart, unpubl.
Luna2 cluster (acII D) (<i>Actinobacteria</i>)	MWH-Mo1	AJ507460	Lake Mondsee, Austria	7.6	21
	MWH-Wo1	AJ507464	Lake Wolfgangsee, Austria	7.6	21
	MWH-Aus1	AJ630367	Pond, Australia	7.6	20
	MWH-HuqW11	AJ630368	Pond, China	7.6	20
	MWH-Ta1	AJ507466	Lake Taihu, China	8.1	21
	MWH-Uga1	AJ784402	Pond, Uganda	7.6	20
Luna1 cluster (acII A - C) (<i>Actinobacteria</i>)	MWH-Ta3	AJ507468	Lake Taihu, China	7.6	20
	MWH-Ta8	AM182889	Lake Taihu, China	5.6	Hahn, unpubl..
	MWH-Dar1	AJ565415	Pond, Tanzania	5.6	22
	MWH-Dar4	AJ565416	Pond, Tanzania	4.6	22
<i>Polynucleobacter</i> cluster, subcluster PnecC (<i>Betaproteobacteria</i>)	MWH-MoK4	AJ550654	Lake Mondsee, Austria	3.6	19
	MWH-MoK7	AJ550673	Lake Mondsee, Austria	5.6	19
	MWH-NZ4W7a	AM110082	Lake, New Zealand	4.6	Hahn, unpubl.
	MWH-NZ4W4	AM110080	Lake, New Zealand	5.6	Hahn, unpubl.
	MWH-MoIso1	AJ550671	Lake Mondsee, Austria	3.6	19
	MWH-NZ4W10	AM110079	Lake, New Zealand	4.6	Hahn, unpubl.
	MWH-NZ7W17	AM110083	Brook New Zealand	5.6	Hahn, unpubl.
	MWH-HuK1	AJ550665	Pond, China	7.6	19
	MWH-UK1W16	AM110086	Lake Klaffersee, Austria	4.6	Hahn, unpubl.
	QLW-P1FAT50C-4	AJ879778	Pond, Austria	5.6	Hahn et al., 2005
	QLW-P1FNSY20A-6	AJ879779	Pond, Austria	5.6	Hahn et al., 2005
	MWH-Aus1W7	AM110081	Pond, Australia	3.6	Hahn, unpubl.
	MWH-Aus1W21	AM110078	Pond, Australia	3.6	Hahn, unpubl.
	MWH-JaK3	AJ550657	Yangtze River, China	4.6	19
	MWH-S4W17	AM110087	Lake Loch Ness, Scotland	5.6	Hahn, unpubl.
<i>Polynucleobacter</i> cluster, subcluster PnecD (<i>Betaproteobacteria</i>)	MWH-CaK1	AJ550667	Canal, France	5.6	19
	MWH-MoNR1	AJ550649	Lake Mondsee, Austria	3.6	19
	MWH-NZ8W4	AM110085	Lake, New Zealand	3.6	Hahn, unpubl.
	MWH-NZ8W13	AM110084	Lake, New Zealand	3.6	Hahn, unpubl.
	MWH-VicM1	AJ550651	Lake Victoria, Uganda	5.6	19
	MWH-TaW3	AJ550661	Lake Taihu, China	5.6	19
<i>Rheinheimera</i> sp. [#] (<i>Gammaproteobacteria</i>)	QLW-Oulin5D [#]	AM182267	Lake Oulincuo, China	50.6	This study
	QLW-Oulin5E [#]	AM182266	Lake Oulincuo, China	50.6	This study
<i>Marinobacter</i> sp. (<i>Gammaproteobacteria</i>)	QLW-Gahai5E ^{##}	AM182273	Lake Gahai2, China	200.6	This study
	QLW-Gahai5F ^{##}	AM182274	Lake Gahai2, China	200.6	This study
	QLW-Gahai7F ^{##}	AM182275	Lake Gahai2, China	200.6	This study
<i>Sphingomonas</i> sp. (<i>Alphaproteobacteria</i>)	QLW-XinD2 ^{###}	AM182270	Lake Xinxinhai, China	18.1	This study
	QLW-XinIIA3 ^{###}	AM182271	Lake Xinxinhai, China	18.1	This study
	QLW-XinA3 ^{###}	AM182272	Lake Xinxinhai, China	18.1	This study
	QLW-OulinII6B ^{\$\$}	AM182268	Lake Oulincuo, China	50.6	This study
	QLW-Oulin6B ^{\$\$}	AM182269	Lake Oulincuo, China	50.6	This study

[§] All habitats except for Lake Gahai2 are freshwater habitats

[§] Maximum salinity at which the growth of tested strains was observed

[#] 96.5% 16S rRNA sequence similarity with *Rheinheimera baltica*

^{##} 98.2% 16S rRNA sequence similarity with *Marinobacter sedimentis*

^{###} 97.1% 16S rRNA sequence similarity with *Sphingomonas xenophaga*

^{\$\$} 97.0% 16S rRNA sequence similarity with *Sphingomonas faenia*

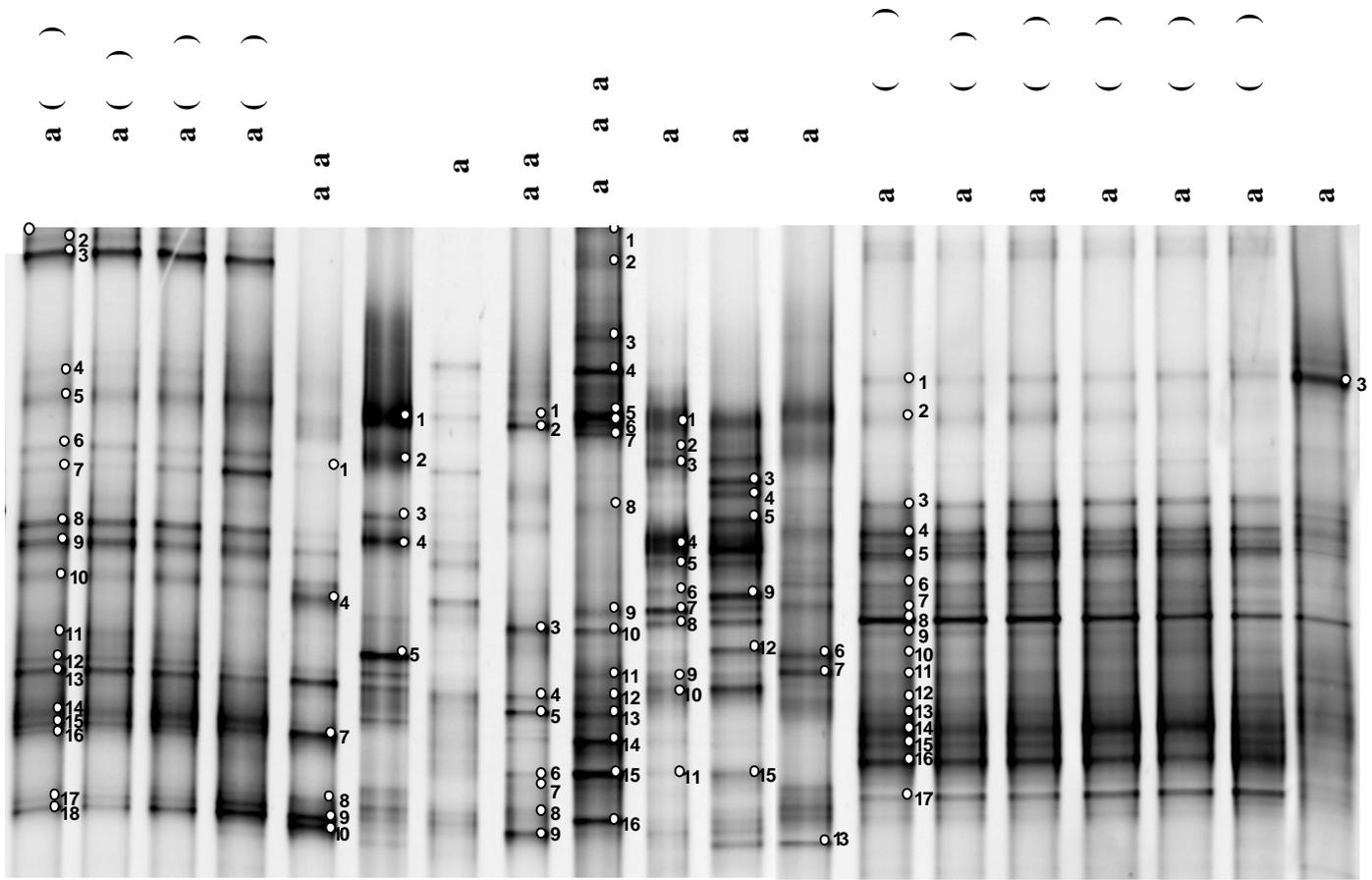
ab Phylogenetic affiliations of sequences obtained from DGGE bands.

a	a (a b)	a ()	a
<i>Bacteroidetes</i> (CFB bacteria)			
Pond-1; High lake1-1, 2, 3	DGGE zo34 (AF531005)	98-99	-
Xiaochaidan-1 to 7; Gahai2-1, 2, 3	<i>Psychroflexus tropicus</i> (AF513434)	97-98	-
Namocuo-6, 7, 8; High lake1-7, 8	Clone SF85 (AJ697706)	96-100	CL500-6 [§]
Qinghai-4*	<i>Cytophaga</i> sp. An11 (AJ551150)	91	n.d.
Qinghai-6*	<i>Flexibacter aurantiacus</i> (AB078044)	91	n.d.
Qinghai-7*	Clone KD-110 (AY218600)	96	n.d.
Qinghai-8*	Clone WLB16-196 (DQ015861)	92	n.d.
Qinghai-9*	Clone ESR4 (AF268288)	85	n.d.
Qinghai-10*	Clone BM15 (AF087096)	85	n.d.
Pond-2	Clone 150ds20 (AY212601)	98	-
Pond-3*	Clone BA11 (AF087047)	84	n.d.
Gahai1-4	<i>Cyclobacterium</i> sp. BSB S2 03 (AY259502)	94	-
Xiaochaidan-10	Clone AT18OctA10 (AY862729)	96	-
High lake1-4	Clone 30 (AF361200)	92	PRD01a001B [§]
High lake2-3, 4	Clone AKYG1150 (AY921957)	96	-
High lake2-5*	<i>Cytophaga</i> sp. I-689 (AB073572)	95	-
Namocuo-2	Clone Sta2-37 (AY562339)	98	-
Namocuo-3*	Clone IRD18C04 (AY947919)	91	n.d.
Namocuo-4*	Clone PLY-P3-86 (AY354763)	90	n.d.
Namocuo-5	Clone LiUU-3-5 (AY509263)	97	-
Namocuo-9	Clone LiUU-9-16 (AY509366)	95	CL500-6 [§]
Namocuo-17*	Clone ESR BR 13 (AF540048)	96	n.d.
<i>Alphaproteobacteria</i>			
Namocuo-1*, Yanghu-3	Clone DC8-48-1 (AY145598)	87-99	LD12 [§]
Qinghai-1, 2, 3	Clone PL_4z10f (AY580535)	99	-
High lake1-5*, 6*	<i>Sphingomonas</i> sp. HTCC503 (AY584572)	82-86	n.d.
Xiaochaidan-9*	Clone SIMO-2848 (DQ189823)	93	n.d.
Xiaochaidan-12*	Clone D-64 (DQ116009)	95	n.d.
Gahai2-5	Clone BMS33 (AY193224)	98	-
Gahai2-4	Clone D013 (AF177553)	97	-
Gahai1-7; Qinghai-11, 12, 13	<i>Loktanela vestfoldensis</i> (AJ582227)	99	-
<i>Betaproteobacteria</i>			
Gahai1-8	QLW-P2DMWB-4 (AJ938031)	98	GKS98 [§]
Pond-5	<i>Polynucleobacter</i> sp. MWB-Mok3 (AJ550653)	100	<i>Polynucleobacter</i> Pnced ^{§, #}
Pond-4*	Clone HP1B35 (AF507223)	97	n.d.
Gahai2-6*	Clone SMG09 (AF445741)	93	n.d.
High lake1-9*	<i>Comamonadaceae</i> BP-1b (AY145570)	94	<i>Rhodoferrax</i> sp. BAL47 [§]
High lake1-10; High lake3-6, 7	Clone Sta2-12 (AY562326)	87-99	-
High lake1-11*	DGGE GW1b1-9 (AY501502)	90	n.d.
High lake2-15	Clone cams48-1 (AY544223)	99	-
<i>Gammaproteobacteria</i>			
Qinghai-16*	<i>Methylobacter</i> sp. T20 (AF131868)	89	n.d.
Xiaochaidan-13*	DGGE-32 (AJ568010)	83	n.d.
Xiaochaidan-14*	Clone AT18OctB3 (AY862731)	90	n.d.
Xiaochaidan-15	Clone At18augB10 (AY862772)	99	-
Xiaochaidan-16	<i>Halomonas</i> sp. D34 (AY582931)	97	-
Xiaochaidan-11*	Clone LH073 (AY605175)	86	n.d.
<i>Actinobacteria</i>			
Qinghai-5*	Clone ML817J-9 (AF448198)	90	n.d.
Qinghai-17, 18	Clone SV2-23 (AJ575527)	99-100	acIII ^{§§}
Gahai2-7, 8, 9	Clone ML320J-32 (AF448177)	98	acIII ^{§§}
Gahai1-1, 9	Clone ML316M-7 (AF447767)	99-100	acIII ^{§§}
Gahai1-10	Clone NCh54AT11 (AY862810)	99	acIII ^{§§}
Qinghai-15*	<i>Microbacteriaceae</i> sp. 8.3MW-3 (AY826655)	94	n.d.
Namocuo-15*	Clone 25/4-10 (AJ007641)	83	n.d.
Namocuo-16*	Clone AKYG965 (DQ128400)	90	n.d.
<i>Cyanobacteria</i>			
Namocuo-12*, 13*	<i>Synechococcus</i> sp. MW97C4 (AY151251)	90-97	<i>Synechococcus</i> Group B [§]
Qinghai-14, Namocuo-10*	<i>Synechococcus</i> sp. MW76B2 (AY151245)	86-99	<i>Synechococcus</i> Group B [§]
Namocuo-14*	Clone SPOTSAPR01_5m31 (DQ009320)	87	n.d.
Namocuo-11*	Clone JL-ESNP-I34 (AY664217)	84	n.d.

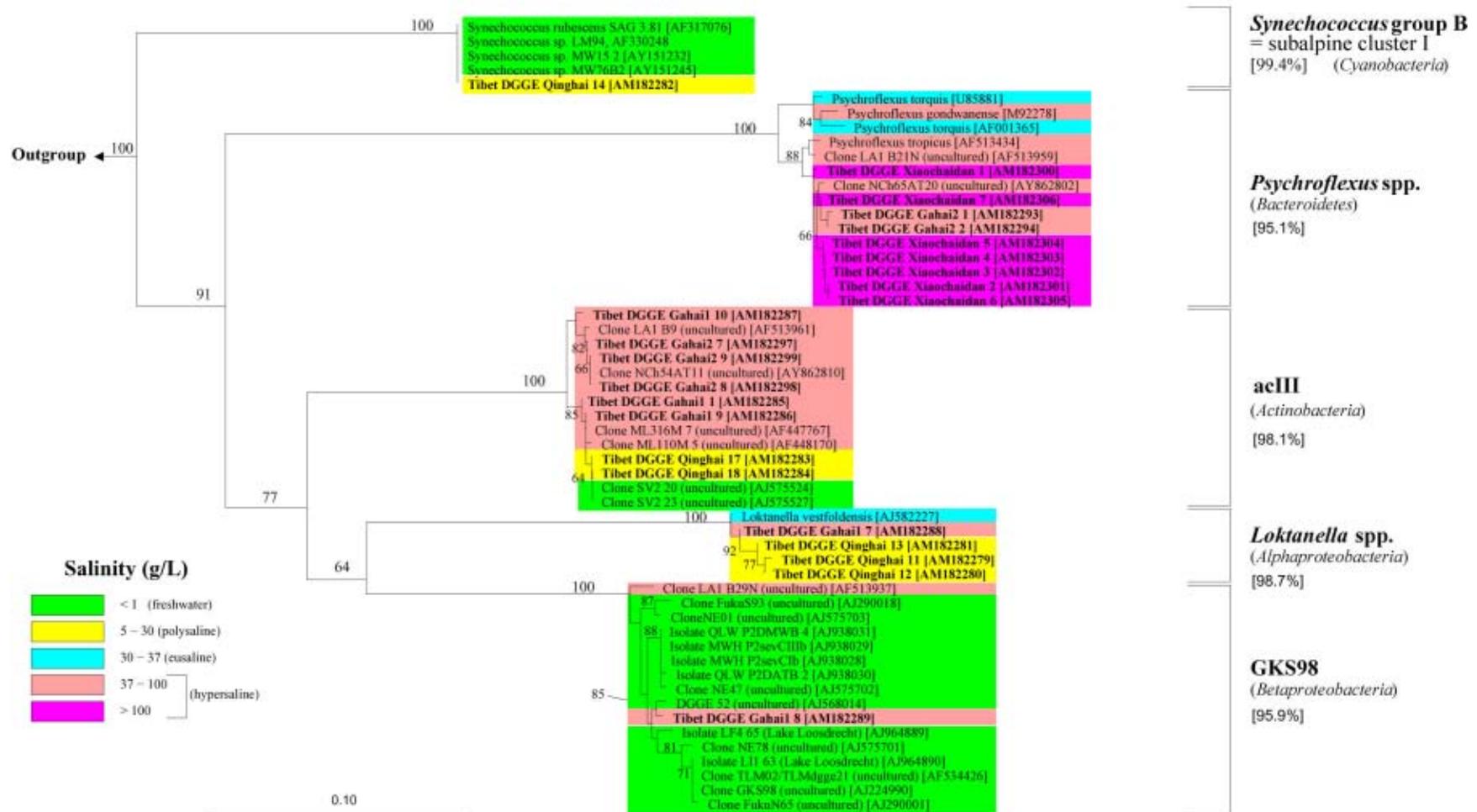
* Ambiguous sequences with reliable sequence lengths of only 110 to 450 bases. Phylogenetic analysis was not performed.

§ Zwart et al., 2002; § Crosbie et al., 2003; §§ Warnecke et al., 2004; # Hahn, 2003

DGGE profiles of partial 16S rRNA genes amplified from DNA extracted from samples of the investigated Tibetan lakes. Sequenced bands were labeled with the same numbers as in Table S4 and Figure S2.



Neighbor-joining tree illustrating the close phylogenetic relationship between bacteria occurring in habitats of different salinity. The tree shows the phylogenetic position of selected partial 16S rRNA sequences obtained from DGGE bands of Tibetan samples (bold face), as well as the closest related reference sequences. The tree was calculated with sequence fragments (495 nucleotide positions) ranging from sequence position 391 to 886 (*E. coli* numbering). The minimum sequence similarity of each group is presented with the group name. Bootstrap (1,000 iterations) values >60% are shown for major nodes. The scale bar indicates 10% estimated sequence divergence.



Submersed macrophytes play a key role in structuring bacterioplankton community composition in the large, shallow, subtropical Taihu Lake, China

Qinglong L. Wu,^{1,2*} Gabriel Zwart,³ Jianfeng Wu,⁴ Miranda P. Kamst-van Agterveld,³ Shuangjiang Liu⁴ and Martin W. Hahn²

¹State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, East Beijing Road 73, Nanjing 210008, China.

²Institute for Limnology, Austrian Academy of Sciences, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria.

³Centre for Limnology, Netherlands Institute of Ecology, Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Rijksstraatweg 6, 3631 AC Nieuwersluis, the Netherlands.

⁴Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Zhong-Guan-Cun, Haidian, Beijing 100080, China.

Summary

Within-lake horizontal heterogeneity of bacterioplankton community composition (BCC) was investigated in the large and shallow subtropical Taihu Lake (2338 km², maximum depth < 3 m). Samples were collected at 17 sites along a trophic gradient ranging from mesotrophic to hypertrophic areas in August and September 2004. These sites cover two alternative stable states of shallow lakes, which are basically characterized by the dominance or the lack of submerged macrophytes. In the case of Taihu Lake, the macrophyte-dominated state is characterized by clear water and immobilized sediment, and the state largely lacking macrophytes is characterized by the dominance of phytoplankton, frequent wind-driven re-suspension of sediments, and a high turbidity. Three different methods, i.e. denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), reverse line blot hybridization (RLB) with probes targeting 17 freshwater bacterial groups, and 16S rRNA gene cloning and sequencing, were used for analysis of BCC. The BCC varied strongly between the two alternative ecological

states, but less pronounced between phytoplankton-dominated sites even spanning chlorophyll *a* gradients from 16.5 (mesotrophic) to 229.8 µg l⁻¹ (hypertrophic). The 16S rRNA gene library representing the turbid water state contained many sequences closely related to sequences previously obtained from soil or freshwater sediment samples. Furthermore, sequences representing two new lineages of freshwater *Actinobacteria* were obtained from the investigated samples. Comparative statistical analyses of BCC along the investigated ecological gradients revealed that the dominance of submersed macrophytes was the most influential factor on BCC, responsible for a major part of the observed within-habitat heterogeneity of BCC in Taihu Lake.

Introduction

Bacterioplankton play an important role in the functioning of lake ecosystems. Despite their ecological significance, our knowledge about freshwater bacterioplankton diversity and the factors controlling the composition of lake bacterioplankton is far from comprehensive (Dolan, 2005; Hahn, 2006). Bacterioplankton community composition (BCC) is often highly variable between lakes (e.g. Hiorns *et al.*, 1997; Methé and Zehr, 1999; Bosshard *et al.*, 2000; Yannarell *et al.*, 2003; Lindström *et al.*, 2005; Schauer *et al.*, 2005) and additionally shows temporal variability within lakes (Pernthaler *et al.*, 1998; Höfle *et al.*, 1999; Yannarell *et al.*, 2003; Newton *et al.*, 2006; Wu and Hahn, 2006a,b). Certain environmental factors have been suggested to be responsible for the observed differences in BCC, which include pH (Méthé and Zehr, 1999; Lindström *et al.*, 2005; Schauer *et al.*, 2005; Yannarell and Triplett, 2005), water temperature (Yannarell and Triplett, 2004; Lindström *et al.*, 2005), water chemistry (Schauer *et al.*, 2005), salinity (Wu *et al.*, 2006), regional differences (Yannarell and Triplett, 2005), *in situ* UV light intensity (Warnecke *et al.*, 2005) and water retention time (Lindström *et al.*, 2006). Another parameter potentially influencing BCC is the trophic status of lakes. Between-lake comparisons indicated that nutrient enrichment (Lindström, 2000; Yannarell and Triplett, 2004), and the occurrence of

Received 13 April, 2007; accepted 31 May, 2007. *For correspondence. E-mail qlwu@niglas.ac.cn; Tel. (+86) 25 86882107; Fax (+86) 25 57714759.

cyanobacterial blooms (Eiler and Bertilsson, 2004), which are frequently associated with eutrophication, are influencing BCC.

Only little is known about the spatial, especially about horizontal variation of BCC within lakes. Several studies demonstrated vertical pattern in BCC in lakes (Höfle and Brettar, 1995; Vila *et al.*, 1998; Bosshard *et al.*, 2000; Urbach *et al.*, 2001; Wever *et al.*, 2005), which reflected vertical gradients, for instance, of oxygen concentration or primary production. Stratified lakes usually possess a pronounced vertical structure, while horizontal structuring is much less pronounced. One investigation suggested very limited horizontal within-lake heterogeneity of BCC at the scale of hundreds of metres (Yannarell and Triplett, 2004), while another one indicated pronounced differences in BCC in Lake Tanganyika over a stretch of hundreds of kilometres (Wever *et al.*, 2005). However, the stability of such horizontal within-lake pattern of BCC is not well investigated.

In the study presented here, we investigated the spatial heterogeneity and temporal stability of BCC in a large and shallow subtropical lake, which represents a so far rarely investigated lake type. Shallow lakes usually lack stratification, and are known to appear with two alternative stable states (Scheffer *et al.*, 1993). The first state is characterized by submersed vegetation, clear water, and diverse communities of invertebrates and fishes. The second state, equally stable, is characterized by the absence of submersed vegetation, lower species richness and lower diversity, high water turbidity and the occurrence of strong algal blooms (Scheffer *et al.*, 1993). Planktonic food web structure was also shown to be different in habitats with the two distinct ecological states (Jeppesen *et al.*, 1997). Two studies focusing on ponds or mesocosms demonstrated differences of BCC between the two different ecological states (Van der Gucht *et al.*, 2001; Haukka *et al.*, 2006). These studies compared the BCC either between habitats (Van der Gucht *et al.*, 2001) or between years (Haukka *et al.*, 2006). In contrast to smaller habitats, the large Taihu Lake harbours both ecological stages within the same habitat. Furthermore, the large size of Taihu Lake results in significant environmental gradients. For instance, the trophic status of different areas of the lake ranges from mesotrophic to hypertrophic. These local differences of important environmental parameters within the same lake provide an ideal model system for investigating the influences of these parameters on the local BCC.

The aim of our study was to reveal (i) if BCC changes within a habitat along a trophic gradient ranging from mesotrophic to hypertrophic and (ii) if the two different alternative stable states of shallow lakes generate different BCC when occurring in the same habitat. The stability of within-lake differences of BCC was examined by sampling the gradients at two different times.

Our results demonstrated that BCC differed strongly between the two alternative states of shallow lakes, but less between phytoplankton-dominated, turbid sites along a trophic gradient ranging from mesotrophic to hypertrophic. A high numerical importance of *Gammaproteobacteria* was observed at sites of the turbid water state, whereas a high importance of *Actinobacteria* and *Betaproteobacteria* was revealed at sites of the clear water state. These differences correlated with the presence and absence of macrophytes.

Results

Environmental characteristics

The sampling area in East Bay (sites E1, E2 and E3) was fully covered by a submersed macrophyte community comprised mainly of *Potamogeton* spp., whereas the sampled littoral zone of Wuli Bay (station F1 and F2) was covered by a mixed community of emerged (mainly *Phragmites* spp. and *Trapa* spp.), and submersed (mainly *Potamogeton* spp.) macrophytes (Fig. 1A). All other investigated areas were characterized by the absence of macrophytes, and by *Microcystis*-dominated algal blooms, as well as by a high water turbidity caused by wind-driven re-suspension of sediment particle. The macrophyte-dominated and the phytoplankton-dominated areas differed strongly in Secchi depth, i.e. in water turbidity, which was mainly caused by the sediment re-suspension but also influenced by differences in phytoplankton concentrations. The chlorophyll *a* (Chl*a*) concentrations measured at the different sampling stations ranged from 1.5 µg l⁻¹ in the macrophyte-dominated East Bay to 229.8 µg l⁻¹ in the hypertrophic Meiliang Bay (Fig. 1B). Decreasing north-south gradients of total phosphorus (TP) and Chl*a* were observed from Meiliang Bay (sites B1-B3) to East Bay (sites E1-E3) in August (data not shown) and September. Relatively low concentration of TP and Chl*a* were determined for stations in Wuli Bay (Fig. 1B), which were the results of an ecological restoration project carried out in 2002 (K. Chen, pers. comm.).

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis

In total, 32 samples (15 from August and 17 from September) were analysed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Between 13 and 27 bands per sample were observed and 57 unique bands were identified. DGGE profile similarity was on average 89% (range: 82-98%) for samples collected from the same area or bay (i.e. at distances of 100 or 1000 m). But the similarity varied significantly for samples collected from different areas or bays (range: 18-88%). Analysis of

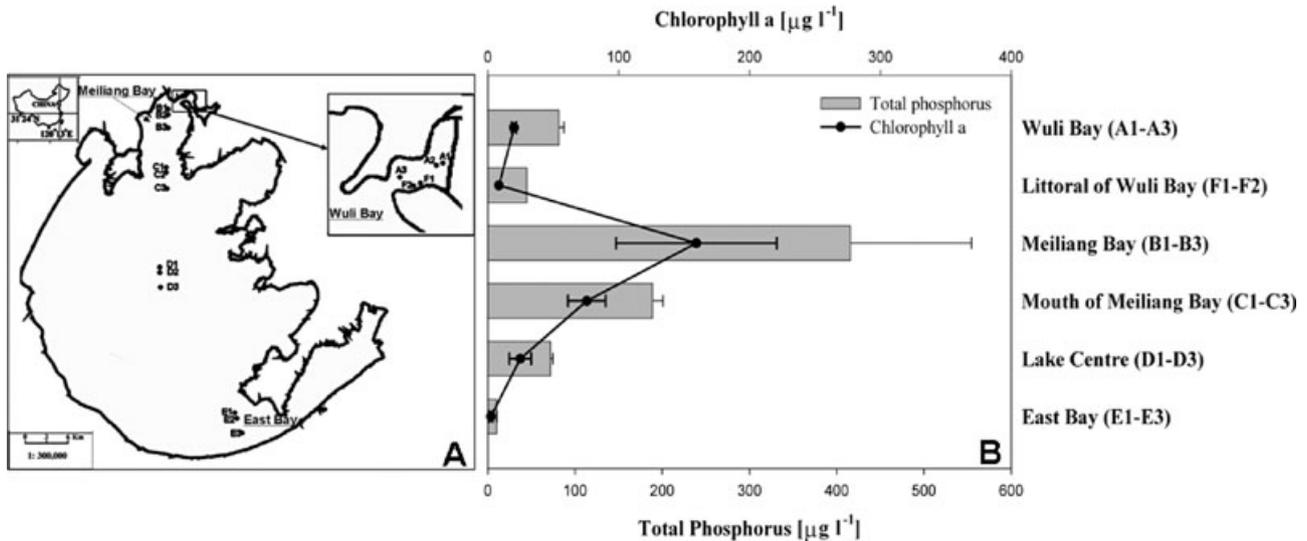


Fig. 1. A. Locations of the six sampled areas of Taihu Lake. Each area, except area F, was sampled at three sites located 100 m and 1000 m apart. The four sampled phytoplankton-dominated areas were the open water of Wuli Bay (A1–A3), Meiliang Bay (B1–B3), Mouth of Meiliang Bay (C1–C3) and Lake Center (D1–D3). The two macrophyte-dominated areas were the open water of East Bay (E1–E3) and the littoral zone of Wuli Bay (F1 and F2). B. Total phosphorus and Chla concentrations measured in the samples taken in September. Average values and standard deviations (except area F) are presented for each of the six sampled areas.

DGGE fingerprints obtained from samples of August (no samples from littoral zone) and September by canonical correspondence analysis (CCA) resulted in two and three clusters of samples respectively (Fig. 2). In both cases, the clusters were separated by coverage of macrophytes, Secchi depth and Chla. In August, samples from East Bay (macrophyte-dominated) formed one cluster, whereas the remaining samples, which all originated from *Microcystis*-dominated turbid areas, formed the second cluster. In September, samples from the macrophyte-dominated littoral zone of Wuli Bay (not sampled in August) formed a separate third cluster, which was closer to the cluster formed by the macrophyte-dominated samples (East Bay) than to the phytoplankton-dominated samples.

The number of DGGE bands obtained for East Bay samples (15.5 ± 2.1) was lower than those obtained for samples from macrophyte-free areas (20.9 ± 3.0) and the littoral zone of Wuli Bay (23.5) ($P < 0.001$, unpaired *t*-test). A positive but weak relationship between the number of DGGE bands and the Chla concentration was observed when using the pooled data ($r = 0.41$, $P = 0.02$, GLM test).

Reverse line blot hybridization (RLB) analysis

Within each sampling area, the three samples taken at distances of 100 and 1000 m showed almost identical reactions to the probe panel. Therefore, patterns regarding the distribution of bacterial groups were compared between the six investigated lake areas. Twelve out of the 17 targeted bacterial groups were detected in Taihu Lake

(Table S1). None of these groups was detected across all sampling areas (Table S1). Only three groups, i.e. CRFL11, Urk014, and FukuN18, were detected in the littoral zone of Wuli Bay, while 5–10 (average 7.4) of the targeted groups were detected in the open water areas respectively. Two groups, i.e. the actinobacterial groups Sta2-30 and ACK-M1, were detected across all five open water areas but not in the investigated littoral zone (Table S1). Thus, the 12 detected bacterial groups were distributed unevenly in Taihu Lake.

The detrended correspondence analysis (DCA) showed that samples from phytoplankton-dominated areas had more similar reactions to the probe panel than did the samples from the two macrophyte-dominated areas, i.e. open waters of East Bay and the littoral zone of Wuli Bay (Fig. 3).

Clone library analysis

In total, 96 and 87 non-chimeric 16S rRNA sequences were obtained from the East Bay and the Meiliang Bay clone library respectively (Table 1, Tables S2 and S3). Although both libraries were dominated by *Actinobacteria*, the libraries differed markedly even at the phylum and subphylum levels. In comparison, higher percentage of clones affiliated with *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Verrucomicrobia* were present in the East Bay library, whereas higher percentages of clones affiliated with *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Cyanobacteria* and *Planctomycetes* were found in the library con-

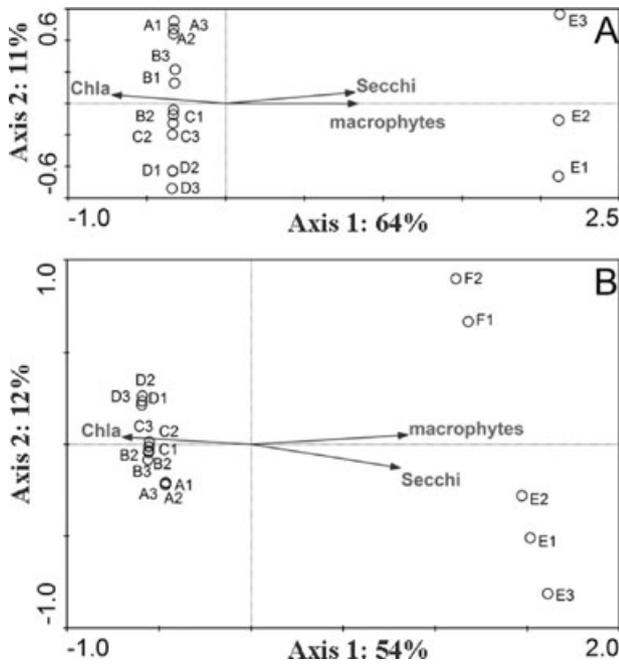


Fig. 2. Correspondence canonical analysis (CCA) biplot based on DGGE data and environmental factors of investigated sites in August (A) and September (B) in Taihu Lake. The plot illustrates the differences in BCC in relation to the three most important environmental factors significantly ($P < 0.05$) influencing BCC. In the August investigation, the eigenvalues of the first and second axis were 0.70 and 0.14, respectively, and the two axes explained 75% of the observed variation in BCC. Note that the littoral zone of Wuli Bay (stations F1 and F2) were not sampled in August. In the September investigation (B), the eigenvalues of the first and second axis were 0.74 and 0.15, respectively, and the two axes explained 66% of the observed variation in BCC. For both sampling times, the first axis should be considered the most important axis, and in both cases, the first axis was positively related with the coverage by macrophyte ($r = 0.98$ and 1 respectively), followed by Secchi depth ($r = 0.94$ and 0.98 respectively), but negatively to Chla ($r = -0.81$ and -0.86 respectively).

structured with the sample from the phytoplankton-dominated Meiliang Bay (Table 1).

Statistical comparison of homologous and heterologous coverage curves for the two clone libraries suggested that the two clone libraries are significantly different as the lower P -value was less than 0.001 (Singleton *et al.*, 2001). This is also visible in the graphical comparison of the two libraries (Fig. 4) in which the homologous coverage curve for the East Bay library was different from the heterologous coverage curve for the comparison of East Bay ($n = 65$) to Meiliang Bay library ($n = 55$). In addition, the distribution of the Delta-C along the evolutionary distance showed that the actual values of Delta-C were much higher than the values predicted for coverage curves that are significantly different at $P = 0.05$ at evolutionary distance less than $c. 0.14$. This also indicates a low overlap of the two libraries.

In total, 39 and 57 clones affiliated with *Actinobacteria* were obtained from the Meiliang Bay and the East Bay

library respectively (Table 1). These actinobacterial clones were highly diverse (Tables S1 and S2; Fig. S1) and many of the obtained sequences were affiliated with the previously proposed clusters Luna1 (Hahn *et al.*, 2003), acI and acIV (Warnecke *et al.*, 2004), or with recently proposed clusters (Allgaier and Grossart, 2006). Furthermore, several actinobacterial sequences, which do not cluster within previously proposed actinobacterial groups, were obtained from Taihu Lake. Therefore, we propose the new freshwater actinobacterial clusters acTH-1 and acTH-2 (Fig. S1). These new clusters also harbour environmental sequences previously obtained from Taihu Lake (GenBank Accession No.: DQ520196), French Pavin Lake (Boucher *et al.*, 2006) and American freshwater reservoir (Stein *et al.*, 2002). Different actinobacterial subgroups were the numerically most abundant groups in the two clone libraries. The acIV-B group appeared in the Meiliang Bay library (15% of clones), and the acTH-1 group appeared in the East Bay library (14% of clones) with the highest frequency.

The majority of sequences obtained from the two libraries were closest related to uncultured or cultured bacteria, which were also obtained from freshwater samples. However, 35% of the clones obtained from samples of Meiliang Bay were closest related to bacteria inhabiting soil, freshwater sediments, rice paddies or activated sludge, whereas only 10% of the clones obtained from East Bay demonstrated such relationships (Tables S2 and S3). All 11 and 2 clones affiliated with *Gammaproteobacteria* obtained from Meiliang and East Bay, respectively, were closest related to bacteria previously detected in soil or sediment samples. Among the 6 and 14 betaproteobacterial clones obtained from Meiliang and East Bay, respec-

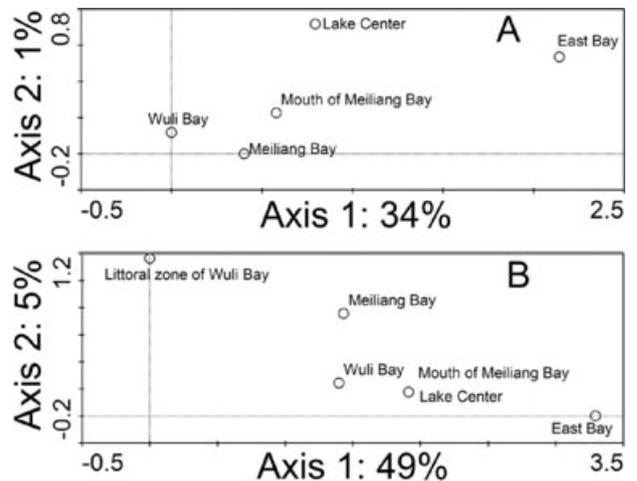


Fig. 3. Detrended correspondence analysis (DCA) of the RLB results obtained from the investigated lake areas in August (A) and September (B). Note that the littoral zone of Wuli Bay (sites F1 and F2) was not sampled in August (A) and that the Mouth of Meiliang Bay and Lake Centre are overlapped in September (B).

Table 1. Phylogenetic affiliation of clones contained in the two environmental 16S rRNA libraries constructed with mixed samples from the phytoplankton-dominated Meiliang Bay (sites B1–B3) and the macrophyte-dominated East Bay (sites E1–E3) respectively.

Phylum	No. of clones		Frequencies (%)	
	Meiliang Bay	East Bay	Meiliang Bay	East Bay
<i>Alphaproteobacteria</i>	6	3	6.9	3.1
<i>Betaproteobacteria</i>	6	14	6.9	14.6
<i>Gammaproteobacteria</i>	11	2	12.6	2.1
<i>Deltaproteobacteria</i>	2		2.3	
<i>Bacteroidetes</i>	2	3	2.3	3.1
<i>Actinobacteria</i>	39	57	44.8	59.4
<i>Planctomycetes</i>	5	2	5.7	2.1
<i>Verrucomicrobia</i>	3	9	3.5	9.4
<i>Cyanobacteria</i>	9	5	10.3	5.2
<i>Fibrobacteres</i>	1	1	1.2	1.0
Candidate division OP11	1		1.2	
Unidentified	1		1.2	
Plastid	1		1.2	
Total	87	96		

tively, were only two clones representing a bacterial group repeatedly detected in cultivation-independent investigations of the diversity of freshwater bacterioplankton. These two clones are 99% identical with cultivated and uncultured strains affiliated with subcluster B (PnecB) of the *Polynucleobacter* cluster (Zwart *et al.*, 2002; Hahn, 2003; Wu and Hahn, 2006b). The presence of PnecB bacteria in Taihu Lake was previously demonstrated by fluorescent *in situ* hybridization with subcluster-specific probes (Wu and Hahn, 2006a). In contrast, 50% of the betaproteobacterial clones obtained from the two libraries were closest related to bacteria previously found in soil or sediment samples (Tables S2 and S3).

Discussion

Our results clearly demonstrated a significant horizontal heterogeneity in BCC in Taihu Lake. The statistical analysis of BCC as determined by DGGE and reverse line blot hybridization (RLB) revealed the presence of three distinct kinds of bacterioplankton communities at the 17 investigated sites located in six different lake areas. The three taxonomically different kinds of bacterioplankton were associated with environmental conditions shaped by communities of submersed macrophytes (East Bay), littoral communities of submerged and emerged macrophytes (littoral zone of Wuli Bay), and phytoplankton communities (all other investigated areas) respectively (Fig. 2B). Comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed with bacterioplankton samples from phytoplankton and macrophyte-dominated areas clearly confirmed the contrasting taxonomical composition of bacterioplankton in ecologically different lake areas (Fig. 4).

Shallow lakes are known to exhibit two alternative stable limnological states, i.e. clear and turbid water states associated with the presence and absence of dense macrophyte communities (Scheffer *et al.*, 1993). Previous investigations described differences in BCC between two lakes appearing with the two alternative states (Van der Gucht *et al.*, 2001), as well as in lake mesocosms developing in two different years the two alternative states of shallow lakes (Haukka *et al.*, 2006). Our investigation covering the two alternative states in the same lake ecosystem omitted several uncertainties involved in between-lake and long-term mesocosm studies. Our statistical analysis revealed coverage by submersed macrophytes followed by Secchi depth and Chl_a concentration as the most influential parameters responsible for the observed differences in BCC (Fig. 2). All three parameters are influenced by the presence/absence of dense macrophyte communi-

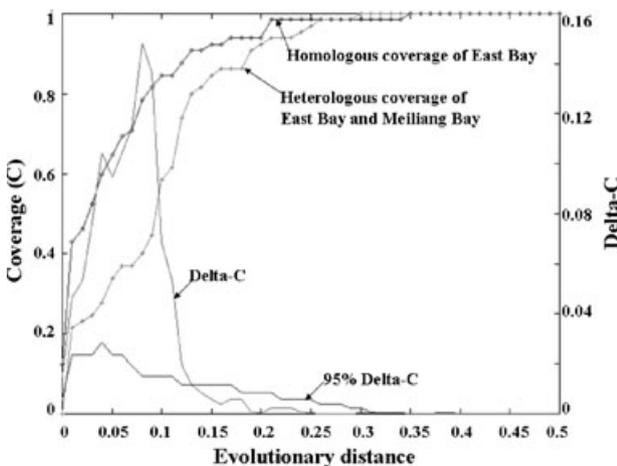


Fig. 4. LIBSHUFF comparisons of the homologous coverage of East Bay library and the heterologous coverage of East Bay and Meiliang Bay for bacterial sequences in clone libraries. Sixty-five and 55 sequences from East Bay and Meiliang Bay library, respectively, were used for the comparison. Libraries were considered significantly different when $P < 0.025$, whereas the P -value in this comparison was smaller than 0.001. See Singleton and colleagues (2001) for details.

ties. Secchi depth is a measure of water transparency, which is in large shallow lakes mainly influenced by phytoplankton concentration and concentration of re-suspended sediment particles. The wind-driven process of sediment re-suspension is in macrophyte-absent areas of Taihu Lake much stronger than in macrophyte-dominated areas (Qin *et al.*, 2004). The submersed macrophyte communities have a calming influence on turbulence in the water column, and the macrophyte roots have a stabilizing influence on the sediments. Second, submersed macrophytes influence the phytoplankton concentration by shading and competition for nutrients (e.g. Sand-Jensen and Borum, 1991), and probably also by allelopathic influences (e.g. Mulderij *et al.*, 2006).

Our results clearly indicated that macrophytes play a key role in the observed intrahabitat heterogeneity of bacterioplankton diversity. Submersed macrophytes may exert direct and indirect influences on abundance and composition of planktonic bacterial communities. First, the wind-driven re-suspension of sediment particles into the water column in macrophyte-absent areas is generally resulting in a pronounced spatial and chemical heterogeneity in the water column (Simon *et al.*, 2002), which is expected to form many additional ecological niches for bacterioplankton. The higher number of DGGE bands observed for samples from turbid lake areas may reflect a higher bacterial diversity in the particle-rich water column of macrophyte-absent areas in comparison with the macrophyte-dominated sites. Negative association between richness of bacteria in small size fraction and vegetation cover has also been observed in 32 Spanish shallow lakes along gradients of phosphorus and water plant cover (Declerck *et al.*, 2005). Furthermore, it is well known that the assemblages of freely suspended and particle-attached bacteria present in the same water column strongly differ in taxonomic composition (Crump *et al.*, 1999). Therefore, the detection of several phylotypes closely related to taxa known from sediments and suspended particles in a turbid water area (Table S3) and the almost complete lack of detection of such taxa in a clear water area (Table S2) seems to support the suggested influence of macrophytes via prevention of sediment re-suspension on bacterioplankton diversity. Second, the presence of phylotypes in the Meiliang Bay library closely related to phylotypes described from soils (Table S3) may indicate the import of allochthonous bacteria from terrestrial environments. The differences in bacterioplankton diversity between the northern lake areas (i.e. all phytoplankton-dominated sites) and the southern area (i.e. macrophyte-dominated East Bay) could partially be explained by the import of terrestrial bacteria into the northern part of the lake. This scenario fits to the hydrological conditions of the lake, i.e. the northern part of the lake receives most of the inflow (Qin *et al.*, 2004), as well as to

the import of large amounts of soil particles from the watershed due to intensive agriculture and soil erosion (Dokulil *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2004). Several studies demonstrated pronounced influences by the import of allochthonous bacteria on bacterioplankton diversity in lakes (Bergstrom and Jasson, 2000; Lindström *et al.*, 2006) and reservoirs (Mašín *et al.*, 2003). Third, the influence of macrophyte communities on the phytoplankton composition is well known, and several studies also indicated that phytoplankton regimes strongly influence bacterioplankton diversity (Höfle *et al.*, 1999; Lindström, 2001; Eiler and Bertilsson, 2004). The expected differences in phytoplankton composition between macrophyte-dominated and macrophyte-absent areas of Taihu Lake were documented previously (Qin *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2003) and also observed during the sampling period of our study (Y. Chen, pers. comm.). The phytoplankton community in the macrophyte-dominated East Bay was largely contributed by small diatoms, while the composition in all other investigated areas (except the littoral zone of Wuli Bay) was dominated by *Microcystis* spp. (Y. Chen, pers. comm.; Chen *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007). These macrophyte-mediated differences in phytoplankton composition likely contributed to the differences in bacterioplankton diversity between macrophyte-dominated and macrophyte-absent lake areas. Finally, macrophytes potentially exert a direct influence on bacterioplankton diversity via exudation of dissolved organic carbon and/or by direct allelopathic impacts on bacterioplankton.

Several comparative between-lake investigations demonstrated an influence of the intensity of algal primary production or of the trophic status of lakes on BCC (Lindström, 2000; 2001; Horner-Devine *et al.*, 2003; Yannarell and Triplett, 2004; Jardillier *et al.*, 2005; Wever *et al.*, 2005; Haukka *et al.*, 2006). In the present investigation only some differences in BCC between the four investigated phytoplankton-dominated areas of the lake were observed despite of the 14-fold variation in phytoplankton concentration (chl_a) and differences in nutrient concentrations (Figs 2 and 3). Thus, pronounced within-lake variations in phytoplankton biomass and productivity had smaller influences on BCC than a change from phytoplankton-dominated to macrophyte-dominated conditions.

In contrast to extensive studies on freshwater bacterial diversity in temperate deep lakes, very little is currently known about bacterial diversity in large subtropical shallow lakes. The analysis of our two 16S rRNA clone library revealed that 19% (East Bay) and 51% (Meiliang Bay) of the established taxa (Tables S2 and S3) were closer related to taxa described from non-freshwater or at least from non-pelagic freshwater environments. Furthermore, several new actinobacterial clusters previously not detected in freshwater habitats were revealed (Fig. S1).

These high proportions of novel freshwater taxon may result from an understudy of bacterial diversity in subtropical and tropical freshwater habitats and/or from the understudy of the diversity in large shallow lakes. In any case, our results clearly indicate that the bacterioplankton diversity in freshwater habitats is still far away from complete coverage (Hahn, 2006) and even for those taxa detected in Lake Taihu, which were repeatedly detected in other freshwater habitats, it is not known if all members of such a taxon are characterized by uniform ecological traits, or if they differ significantly in ecological adaptations. Recent results from ecophysiological investigations on a group of freshwater *Actinobacteria* (Hahn and Pöckl, 2005) and on the betaproteobacterial GKS98 group (Wu *et al.*, 2006) demonstrated pronounced and ecologically relevant within-group differences in thermal adaptation and salt tolerance respectively.

In conclusion, our study demonstrated the importance of direct and indirect influences of submersed macrophyte vegetation on BCC in a large shallow lake. Our results also hint on potential fluxes of microbes from terrestrial and sediment sites into the water column of shallow freshwater habitats. At least under some circumstances, such fluxes may have a strong influence on BCC in shallow lakes.

Experimental procedures

Study site and sampling design

Taihu Lake is a large and shallow subtropical lake. The lake is characterized by a surface area of 2338 km² (maximum length, 60 km; maximum width, 40 km), a maximum depth of less than 3 m, and an average water retention time of 270 days (Qin *et al.*, 2004). Taihu Lake, the third largest freshwater lake in China, is located (30°05′–32°08′-N and 119°08′–121°55′-E) in the delta of the Yangtze River in Eastern China. The lake is mainly charged with water from the northern and western watershed and is discharged via the eastern basin and East Bay (Fig. 1A). The entering water contains high loads of phosphorus and nitrogen. The hydrology of the lake results in a trophic gradient characterized by hypertrophic conditions in the northern part and mesotrophic conditions in the southern part of the lake (Chen *et al.*, 2003). The southern part of the lake is fully covered by submersed macrophyte communities (dominated by *Potamogeton* spp.) and is characterized by clear water with relatively low phytoplankton concentrations (Qin *et al.*, 2004). The water in the northern and central part of the lake is characterized by a high turbidity due to *Microcystis*-dominated algal blooms and high wind-driven sediment re-suspension (Chen *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2004). Apart from the littoral zone, the northern and central part of the lake is lacking submersed macrophyte communities. The lake was sampled at 17 stations located in six different areas (Fig. 1A). These areas were Wuli Bay (stations A1–A3), Meiliang Bay (stations B1–B3), mouth of Meiliang Bay (stations C1–C3), Lake Center (stations D1–D3), East Bay (stations E1–E3) and the littoral zone of Wuli Bay (stations F1 and F2). In each area (except littoral

zone of Wuli Bay), samples were collected at three sites located 100 and 1000 m apart. All stations were sampled once in August and September 2004, respectively, except the littoral zone of Wuli Bay (stations F1 and F2), which was exclusively sampled in September.

Sampling and field measurements

Water temperature, pH, water depth, coverage by macrophytes and Secchi depth were measured on location. Water samples were collected from surface waters (top 50 cm) with a 5 l Schindler sampler. All stations were sampled within 1 day. Bacterioplankton samples (50–250 ml of water) for DGGE, RLB hybridization analyses and 16S rRNA gene cloning and sequencing were collected on 0.2 µm-pore-size Isopore filters after pre-filtration through 5.0 µm-pore-size Isopore filters. Filters were stored at –20°C. For chemical analysis, untreated water samples of about 1 l were transported as quick as possible to the laboratory and processed immediately. Total nitrogen (TN), TP and Chl_a were measured according to standard methods (Jin and Tu, 1990).

DNA extraction

DNA was extracted from biomass collected on filters by standard phenol-chloroform extraction, precipitation with ethanol, purification with a Wizard DNA Clean-up kit (Promega), and concentrated to a volume of 50 µl (Schauer *et al.*, 2003).

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

About 2 ng of purified DNA was used as template for polymerase chain reaction (PCR) amplification of partial 16S rRNA genes by using the *Bacteria*-specific primers 358f (5′-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3′, with a 40 bp GC-clamp) and 907rM (5′-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3′) (Muyzer *et al.*, 1993). DGGE was performed with a DCode system (Bio-Rad) by using a 6% polyacrylamide gel with a 30–70% gradient of a DNA-denaturant agent as described previously (Muyzer *et al.*, 1993; Schauer *et al.*, 2003). Eight hundred nanograms of PCR products were loaded, and the gel was run at 100 V for 16 h at 60°C in 1× TAE buffer. The gel was stained with SybrGold (Molecular Probes) for 45 min, rinsed with 1× TAE buffer and visualized under UV.

Reverse line blot hybridization (RLB)

Reverse line blot hybridization with (antisense) oligonucleotide probes targeting 16S rRNA gene sequences was performed as described previously (Zwart *et al.*, 2003). Eighteen probes (Table S1) targeting bacterial 16S rRNA genes of 17 phylogenetic clusters of typical freshwater bacteria (Zwart *et al.*, 2002) were applied. The specificity and hybridization conditions of the applied probes were presented elsewhere (Wu *et al.*, 2006).

Construction of 16S rRNA clone libraries

Two 16S rRNA gene clone libraries were constructed with sequences amplified from water samples from phytoplankton-

dominated (Meiliang Bay) and macrophyte-dominated (East Bay) sites in September. For amplification equal amounts of DNA samples extracted from sites B1, B2 and B3 (Meiliang Bay) and E1, E2 and E3 (East Bay) were mixed respectively. Previous analysis of these samples by DGGE and RLB revealed minor differences in BCC among samples from the same area respectively. Bacterial 16S rRNA genes were amplified in a Biometra T1 Thermocycler using primer 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', corresponding to *Escherichia coli* positions 8–27) and 1496r (5'-GGT(C)TACCTTGTACGACTT-3', corresponding to *E. coli* positions 1514–1496). The PCR reaction mixtures of 50 µl contained the following: 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs/each, and 30 pmol of each primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega) and c. 10 ng of extracted DNA. The PCR protocol began with a 4 min denaturing step at 94°C followed by 30 cycles of denaturing at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 45 s and extension at 72°C for 1 min, with an additional 10 min of extension at 72°C. Polymerase chain reaction products were examined by gel electrophoresis on 1.0% agarose gel.

Polymerase chain reaction products were purified with QIASPIN kit (Qiagen) and ligated into pGEMT-easy vector (Promega, TA cloning kit) following the instructions of the manufacturer. The ligated DNA was transformed into *E. coli* TOP10 supercompetent cells. The recombinant clones were detected by blue/white screening on LB plates containing 100 µg ml⁻¹ ampicillin. In total, 100 clones from phytoplankton-dominated Meiliang Bay and 110 clones from macrophyte-dominated East Bay were randomly selected for further process and sequencing respectively. Sequencing of partial 16S rRNA genes were carried out at the Sainuo Gene Company (Beijing, China).

Clone library analyses and phylogenetic analysis of sequences

The obtained 16S rRNA gene sequences were checked for potential chimeric sequences by using the CHECK_CHIMERA program (http://rdp8.cme.msu.edu/docs/chimera_doc.html). The sequences were automatically aligned with the software ARB (<http://www.arb-home.de>) and manually realigned if necessary. Phylogenetic trees were constructed by a distance method (neighbour joining) with sequences longer than 1400 bp. In a later step, shorter sequences obtained in this study were inserted in the tree by using a parsimony procedure without changing the overall tree topology. The two constructed clone libraries were compared statistically with the LIBSHUFF program (Singleton *et al.*, 2001). Because the obtained sequences started either from the 27f primer site or from the 1496r primer site and had length of c. 800 bp, only those sequences with overlap of at least 700 bp, i.e. sequences only starting from 27f or sequences only starting from 1496r, were used for two independent comparisons respectively.

Statistics

Sorenson's index (Magurran, 1988) was applied for assessing BCC similarity derived from DGGE. Canonical correspondence analysis was used for revealing relationships between

BCC and environmental variables (ter Braak and Verdonschot, 1995) as the length of the first DCA axis run on species data was > 2 (ter Braak, 1987). Canonical correspondence analysis was performed with the software CANOCO 4.53 (SCI-ENTIA Software). The environmental factors best describing the most influential gradients were identified by forward selection (ter Braak and Verdonschot, 1995). In the case of the DGGE results, a binary matrix was constructed by scoring presence (1) and absence (0) of particular DGGE bands, and the matrix was used for CCA without transformation. The tested environmental variables were TP, TN, Chla, Secchi depth, pH, temperature, water depth and coverage by macrophyte. All environmental data, except pH, were log-transformed for CCA analysis. Canonical correspondence analysis was run separately for data sets of August and September.

For the RLB data, DCA was applied to reveal patterns among investigated lake areas regarding the distribution of bacterial groups. This method was used because samples from the same lake area showed very similar reactions to the RLB probe panel. A binary matrix constructed by scoring positive (1) and negative (0) probe reactions was used for DCA without transformation.

Nucleotide sequences

The 16S rRNA gene sequences have been deposited under the Accession No. AM690807 to AM690989.

Acknowledgements

We would like to thank Jiang Ji, Yuangao Chen, Kaining Chen and Yaohui Hu for their assistance in sampling of the lake, Hongxi Pang for water chemistry analysis and Hans P. Grossart for fruitful discussions on this manuscript. The Chinese Academy of Sciences (project Kzcx2-yw-419), the National Natural Science Foundation of China (Grant 30370278) and the Austrian Science Foundation (FWF Grant P15655) funded the research.

References

- Allgaier, M., and Grossart, H.P. (2006) Diversity and seasonal dynamics of *Actinobacteria* populations in four lakes in northeastern Germany. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3489–3497.
- Bergstrom, A.K., and Jasson, M. (2000) Bacterioplankton production in humic lake Ortrasket in relation to input of bacterial cells and input of allochthonous organic carbon. *Microb Ecol* **39**: 101–115.
- Bosshard, P.P., Stettler, R., and Bachofen, R. (2000) Seasonal and spatial community dynamics in the meromictic Lake Cadagno. *Arch Microbiol* **174**: 168–174.
- Boucher, D., Jardillier, L., and Debroas, D. (2006) Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. *FEMS Microbiol Ecol* **55**: 79–97.
- ter Braak, C.J.F. (1987) The analysis of vegetation–environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* **69**: 69–77.
- ter Braak, C.J.F., and Verdonschot, P.F.M. (1995) Canonical

- correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquat Sci* **57**: 255–289.
- Chen, Y., Qin, B., Teubner, K., and Dokulil, M.T. (2003) Long-term dynamics of phytoplankton assemblages: *Microcystis*-domination in Lake Taihu, a large shallow lake in China. *J Plankton Res* **25**: 445–453.
- Crump, B.C., Armbrust, E.V., and Baross, J.A. (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3192–3204.
- Declerck, S., Vandekerckhove, J., Johansson, L., Muylaert, K., Conde-Porcuna, J.M., Van Der Gucht, K., *et al.* (2005) Multi-group biodiversity in shallow lakes along gradients of phosphorus and water plant cover. *Ecology* **86**: 1905–1915.
- Dokulil, M.T., Chen, W., and Cai, Q. (2000) Anthropogenic impacts to large lakes in China: the Taihu example. *Aquat Ecosys Health Manage* **3**: 81–94.
- Dolan, J.R. (2005) An introduction to the biogeography of aquatic microbes. *Aquat Microb Ecol* **41**: 39–48.
- Eiler, A., and Bertilsson, S. (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol* **6**: 1228–1243.
- Hahn, M.W. (2003) Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5248–5254.
- Hahn, M.W. (2006) The microbial diversity of inland waters. *Curr Opin Biotechnol* **17**: 256–261.
- Hahn, M.W., and Pöckl, M. (2005) Ecotypes of planktonic *Actinobacteria* with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats. *Appl Environ Microbiol* **71**: 766–773.
- Hahn, M.W., Lünsdorf, H., Wu, Q.L., Schauer, M., Höfle, M.G., Boenigk, J., and Stadler, P. (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1442–1451.
- Haukka, K., Kolmonen, E., Hyder, R., Hietala, J., Vakkilainen, K., Kairesalo, T., *et al.* (2006) Effect of nutrient loading on bacterioplankton community composition in lake mesocosms. *Microb Ecol* **51**: 137–146.
- Hiorns, W.D., Methé, B.A., Nierzwicki-Bauer, S.A., and Zehr, J.P. (1997) Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2957–2960.
- Höfle, M.G., and Brettar, I. (1995) Taxonomic diversity and metabolic activity of microbial communities in the water column of the central Baltic Sea. *Limnol Oceanogr* **40**: 868–874.
- Höfle, M.G., Haas, H., and Dominik, K. (1999) Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3164–3174.
- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V., and Bohannan, B.J.M. (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Lett* **6**: 613–622.
- Jardillier, L., Boucher, D., Personnic, S., Jacquet, S., Thénot, A., Sargos, D., *et al.* (2005) Relative importance of nutrients and mortality factors on prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status: microcosm experiments. *FEMS Microbiol Ecol* **53**: 429–443.
- Jeppesen, E., Sondergaard, M., Sondergaard, M., and Christoffersen, K. (1997) *The Structuring Role of Submersed Macrophytes in Lakes*. New York, USA: Springer.
- Jin, X., and Tu, Q. (1990) *The Standard Methods for Observation and Analysis of Lake Eutrophication*, 2nd edn. Beijing, China: China Environmental Science Press. (In Chinese).
- Lindström, E.S. (2000) Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microb Ecol* **40**: 104–113.
- Lindström, S. (2001) Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microb Ecol* **42**: 598–605.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8201–8206.
- Lindström, E.S., Forslund, M., Algesten, G., and Bergström, A.K. (2006) External control of bacterial community structure in lakes. *Limnol Oceanogr* **51**: 339–342.
- Magurran, A.E. (1988) *Ecological Diversity and Its Measurement*. Princeton, NJ, USA: Princeton University Press.
- Mašín, M., Jezbera, J., Nedoma, J., Straškrabová, V., Hejzlar, J., and Šimek, K. (2003) Changes in bacterial community composition and microbial activities along the longitudinal axis of two canyon-shaped reservoirs with different inflow loading. *Hydrobiologia* **504**: 99–113.
- Méthé, B.A., and Zehr, J.P. (1999) Diversity of bacterial communities in Adirondack Lakes: do species assemblages reflect lake water chemistry? *Hydrobiologia* **401**: 77–96.
- Mulderij, G., Smolders, A.J.P., and Van Donk, E. (2006) Allelopathic effects of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton. *Freshwater Biol* **51**: 554–561.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695–700.
- Newton, R.J., Kent, A.D., Triplett, E.W., and McMahon, K.D. (2006) Microbial community dynamics in a humic lake: bacterial assemblages respond differentially to seasonal biological drivers. *Environ Microbiol* **8**: 956–970.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R., and Amann, R. (1998) Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and Archaea in a high mountain lake. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4299–4306.
- Qin, B., Chen, W., and Hu, W. (2004) *Succession of Ecological Environment and Its Mechanism in Lake Taihu*. Beijing, China: China Science Press. (In Chinese).
- Sand-Jensen, K., and Borum, J. (1991) Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwaters and estuaries. *Aquat Bot* **41**: 137–175.
- Schauer, M., Balagué, V., Pedrós-Alió, C., and Massana, R. (2003) Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat Microb Ecol* **31**: 163–174.
- Schauer, M., Kamenik, C., and Hahn, M.W. (2005) Ecological

- differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, *Saprospiraceae*, *Bacteroidetes*). *Appl Environ Microbiol* **71**: 5900–5907.
- Scheffer, M., Hosper, S.H., Meijer, M.L., Moss, B., and Jeppesen, E. (1993) Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends Ecol Evol* **8**: 257–279.
- Simon, M., Grossart, H.P., Schweitzer, B., and Ploug, H. (2002) Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat Microb Ecol* **28**: 175–211.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Rathbun, S.L., and Whitman, W.B. (2001) Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequences libraries from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4374–4376.
- Stein, L.Y., Jones, G., Alexander, B., Elmund, K., Wright-Jones, C., and Neelson, K.H. (2002) Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 431–440.
- Urbach, E., Vergin, K.L., Young, L., Morse, A., Larson, G.L., and Giovannoni, S.J. (2001) Unusual bacterioplankton community structure in ultraoligotrophic Crater Lake. *Limnol Oceanogr* **46**: 557–572.
- Van der Gucht, K., Sabbe, K., De Meester, L., Vloemans, N., Zwart, G., Gillis, M., and Vyverman, W. (2001) Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environ Microbiol* **3**: 680–690.
- Vila, X., Abella, C.A., Figueras, J.B., and Hurley, J.P. (1998) Vertical models of phototrophic bacterial distribution in the metalimnetic microbial communities of several freshwater North-American kettle lakes. *FEMS Microbiol Ecol* **25**: 287–299.
- Warnecke, F., Amann, R., and Pernthaler, J. (2004) Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ Microbiol* **6**: 242–253.
- Warnecke, F., Sommaruga, R., Sekar, R., Hofer, J.S., and Pernthaler, J. (2005) Abundances, identity, and growth state of *Actinobacteria* in mountain lakes of different UV transparency. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5551–5559.
- Wever, A.D., Muylaert, K., Gucht, K.V., Pirlot, S., Cocquyt, C., Descy, J.P., et al. (2005) Bacterial community composition in Lake Tanganyika: vertical and horizontal heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5029–5037.
- Wu, Q.L., and Hahn, M.W. (2006a) Structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microb Ecol* **57**: 67–79.
- Wu, Q.L., and Hahn, M.W. (2006b) High predictability of the seasonal dynamics of a species-like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake. *Environ Microbiol* **8**: 1660–1668.
- Wu, Q.L., Schauer, M., Kamst-Van Agterveld, M.P., Zwart, G., and Hahn, M.W. (2006) Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5478–5485.
- Wu, Q.L., Chen, Y.W., Xu, K.D., Liu, Z.W., and Hahn, M.W. (2007) Intra-habitat heterogeneity of the microbial food web structure under the regime of eutrophication and sediment resuspension in the large subtropical shallow Lake Taihu. *Hydrobiologia* **581**: 241–254.
- Yannarell, A.C., and Triplett, E.W. (2004) Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl Environ Microbiol* **70**: 214–223.
- Yannarell, A.C., and Triplett, E.W. (2005) Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl Environ Microbiol* **71**: 227–239.
- Yannarell, A.C., Kent, A.D., Lauster, G.L., Kratz, T.K., and Triplett, E.W. (2003) Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microb Ecol* **46**: 391–405.
- Zwart, G., Crump, B.C., Kamst-van Agterveld, M.P., Hagen, F., and Han, S.K. (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* **28**: 141–155.
- Zwart, G., van Hannen, E.J., Kamst-van Agterveld, M.P., van der Gucht, K., Lindström, E.S., Van Wichelen, J., et al. (2003) Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5875–5883.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

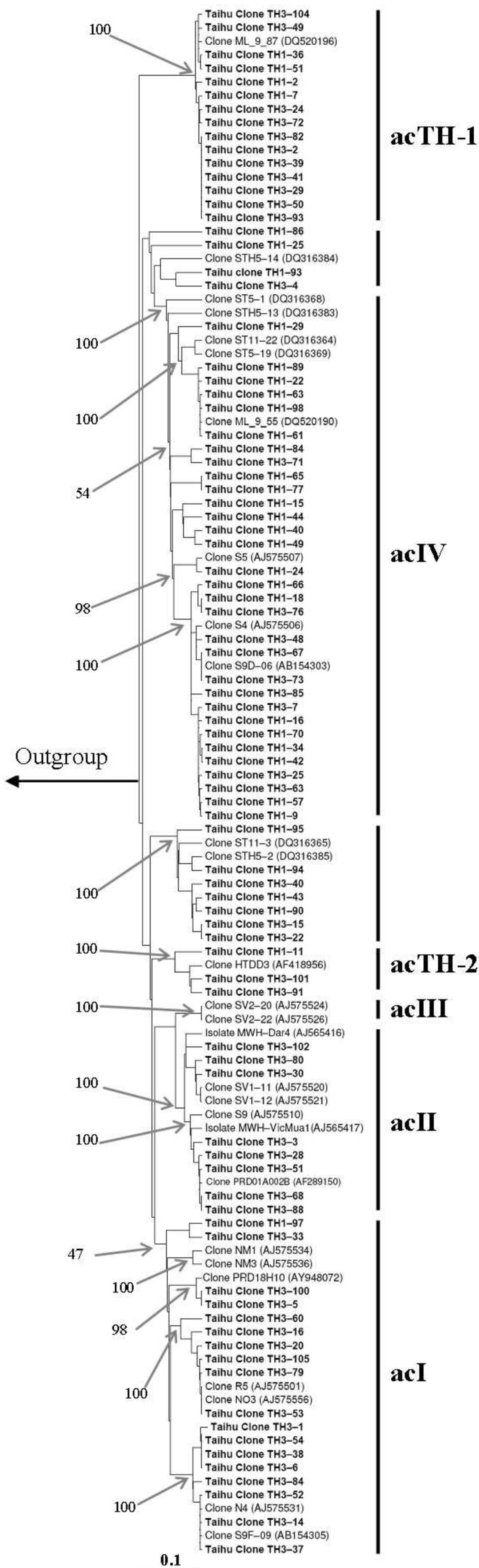
Fig. S1. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships between selected partial 16S rRNA sequences of actinobacterial clones obtained in this study and closest representatives of freshwater actinobacterial sequences. Sequences obtained from this investigation in Taihu Lake were presented in bold face. The core tree was constructed using actinobacterial sequences of closest representatives longer than 1400 bp. Then shorter sequences obtained from this study were inserted into the tree by applying the parsimony without changing the overall tree topology. Bootstrap values were shown at the major branches. The two new groups were named as acTH-1, acTH-2. The scale bar indicates 10% estimated sequence divergence.

Table S1. Results from reverse line blot hybridization with 18 probes specific for freshwater bacteria.

Table S2. Phylogenetic affiliations of cloned 16S rRNA gene sequences obtained from the East Bay library representing the bacterioplankton community composition in the macrophyte-dominated environment.

Table S3. Phylogenetic affiliations of cloned 16S rRNA gene sequences obtained from the Meiliang Bay library representing the bacterioplankton community composition in a phytoplankton-dominated environment.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>



1 Supplementary Material

2

3 **Table S1.** Results from reverse line blot hybridization with 18 probes specific for freshwater bacteria.

Probe ^a	Targeted Group	Affiliation	Wuli Bay ^b		Littoral zone of Wuli Bay ^b	Meiliang Bay ^b		Mouth of Meiliang Bay ^b		Lake Center ^b		East Bay ^{b,§}	
			Aug.	Sep.	Sep.	Aug.	Sep.	Aug.	Sep.	Aug.	Sep.	Aug.	Sep.
LD12-143	LD12	<i>Alphaproteobacteria</i>	X	X	O	X	X	X	X	X	X	O	O
CRFL11-135 ^c	CRFL11	<i>Alphaproteobacteria</i>	X	X [#]	X	O	X	O	O	O	O	O	O
LD28-451	LD28	<i>Betaproteobacteria</i>	X	X [#]	O	X	O	X	O	X	O	O	O
Polynuc451	<i>Polynucleobacter</i> sp. (subcluster PnecC)	<i>Betaproteobacteria</i>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Polynuc123 ^d	<i>Polynucleobacter</i> spp. (subcluster PnecB and PnecC)	<i>Betaproteobacteria</i>	X	X	O	X	X	X	O	X	O	O	X
PolynucD123-144 ^e	<i>Polynucleobacter</i> sp. (subcluster PnecD)	<i>Betaproteobacteria</i>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	X
GKS98-442	GKS98	<i>Betaproteobacteria</i>	O	O	O	X	O	X	O	O	O	O	O
Sta230-187	Sta2-30 (acI-B)	<i>Actinobacteria</i>	X	X	O	X	X [#]	X	X	X	X	X	X
Sta230-208	Sta2-30 (acI-B)	<i>Actinobacteria</i>	O	X	O	X	X [#]	X	X	X	X	X	X
Urk014-126	Urk-014	<i>Actinobacteria</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X [#]	O	O
ACK-M1-193	ACK-M1 (acI-A)	<i>Actinobacteria</i>	X	X	O	X	X	X	X	X	X	X	X
CL0-14-464	CL0-14	<i>Verrucomicrobia</i>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Sta235-83	Sta2-35	<i>Verrucomicrobia</i>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
FukuN18-209	FukuN18	<i>Verrucomicrobia</i>	X	X	X	X	X	X [#]	O	X	O	O	O
CL500-6-64	CL500-6	<i>Bacteroidetes</i>	O	O	O	O	O	X	O	X	O	X	X
FukuN47-208	FukuN47	<i>Bacteroidetes</i>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
LD2-457	LD2 (SOL cluster)	<i>Bacteroidetes</i>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
PRD01a001b-134	PRD01a001b	<i>Bacteroidetes</i>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X

4 ^a All probe sequences and working conditions except for CRFL11-135 have been shown in reference 53 (Wu et al., 2006).

5 ^b X donates positive detection by the respective probes in all samples of an area (if not stated differently), whereas O refers to no detection.

6 ^c The probe sequence is 5'-GTTGTTCCGTACCCCTAGG-3'. This probe was not included in TableS2 of the reference 53 (Wu et al., 2006) due to negligence.

7 ^d Targeting a subgroup of subcluster PnecB and all members of subcluster PnecC except of three endosymbiotic strains.

8 ^e Four strains belonging to subcluster PnecD are not targeted by the probe. The probe has one mismatch to sequences of all four strains.

9 [§]Two samples tested for East Bay.

10 [#]Probe was only positive for two or one sample taken in the area.

1 **Table S2.** Phylogenetic affiliations of cloned 16S rRNA gene sequences obtained from the East Bay library
 2 representing the bacterioplankton community composition in the macrophyte-dominated environment.

Groups	Clones	closest relatives	ACC number	Similarity (%)	Freshwater clusters	Sources
<i>Actinobacteria</i>						
	TH3-91, 101	Clone HTDD3	AF418956	98	acTH-2**	Particles
	TH3-102	Isolate MWH-Dar	AJ565416	99	Luna1 [†]	FW*
	TH3-4	Clone ML-3-48.2	DQ520161	95	-	FW
	TH3-103	Isolate <i>Tsukamurella</i> sp.	AY741505	93	-	FW
	TH3-14, 37	Clone ST11-16	DQ316361	99	Sta2-30 (acI-B) [§]	FW
	TH3-15, 22	Isolate <i>Actinomycetales</i> GP5	AY145533	97	-	FW
	TH3-28	Clone S9	AJ575510	98	acII	FW
	TH3-30	Clone SV1-11	AJ575520	97	acII	FW
	TH3-33, 94	Clone ML-9-97.2	DQ520197	97-99	Sta2-30 (acI-B)	FW
	TH3-40	Clone sponge 8	AY948357	97	-	FW
	TH3-60	Clone STH11-14	DQ316359	99	Soil II+III ^{##}	FW
	TH3-61, 93	Clone P38.31	AY752098	97-100	acTH-1**	FW
	TH3-51, 68, 88	Clone PRD01a002B	AF289150	98-99	Luna1 [†]	FW
	TH3-70	Clone NM3	AJ575536	93	acI-C	FW
	TH3-71	Clone AKYG965	AY922081	93	acIV	FW
	TH3-73, 85	Clone S9D-06	AB154303	96-99	acIV-B	FW
	TH3-80	Clone SV1-12	AJ575521	99	acII	FW
	TH3-84	Clone S9F-09	AB154305	97	Sta2-30 (acI-B)	FW
	TH3-2, 24, 29, 39,41, 49, 50, 72, 82, 99, 104	Clone ML-9-87.2	DQ520196	98	acTH-1**	FW
	TH3-1, 6, 38, 52, 54	Clone N4	AJ575531	99	Sta2-30 (acI-B)	FW
	TH3-7, 25, 48, 63, 67, 76	Clone S4	AJ575506	97	acIV-B ^{##}	FW
	TH3-5, 100	Clone PRD18H10	AY948072	98	ACK-M1 (acI-A) [§]	FW
	TH3-8, 53, 79	Clone NO3	AJ575556	99	ACK-M1 (acI-A)	FW
	TH3-3	Isolate MWH-VicMual	AJ565417	96	acII-A	FW
	TH3-16, 20, 105	Clone R5	AJ575501	97-99	ACK-M1 (acI-A)	FW
<i>Gammaproteobacteria</i>						
	TH3-56, 92	Clone MRT-87	EF371492	99-100	-	Estuary
<i>Betaproteobacteria</i>						
	TH3-59, 78	Isolate MWH-IPGL7W22	AJ876403	99	PnecB [#]	FW
	TH3-97	Isolate <i>Ralstonia</i> strain TA	DQ908951	100	-	Soil
	TH3-45	Isolate <i>Ralstonia</i> CH34	CP000353	99	-	Soil
	TH3-87	Isolate <i>Acidovorox</i> GPTSA100-27	DQ854967	99	-	FW
	TH3-62	Clone C1-A6	DQ676998	99	-	Soil
	TH3-34	Clone DR-29	AY945920	96	-	FW
	TH3-64, 66	Clone 220ds20	AY212668	99	-	FW
	TH3-17	Clone 17 up	AY212631	99	-	FW
	TH3-18	Clone EV818EB5CPSAJJ33	DQ337037	99	-	FW
	TH3-9	Clone P38.4	AY752086	99	-	FW
	TH3-27, 55	Clone 173ds20	AY2126324	99	-	FW
<i>Verrucomicrobia</i>						
	TH3-106	Clone aab56b01	DQ814962	98	-	Fish gut
	TH3-89	Clone SLB624	DQ787718	93	-	Sediment
	TH3-32, 75, 107	Clone P38.38	AY752101	99	-	FW
	TH3-44	Clone aab52e08	DQ815271	99	-	Fish gut
	TH3-36	Clone LD29	AF009975	91	-	FW
	TH3-11	Clone W4-B59	AY345492	93	-	FW
	TH3-13	Clone ST11-29	DQ501335	96	-	FW
<i>Alphaproteobacteria</i>						
	TH3-65	Clone ML-7-85	DQ520197	98	-	FW
	TH3-74	Isolate <i>Sphingomonas</i> MTR-71	DQ898300	98	-	Sediment
	TH3-12	Isolate <i>Sphingomonas</i> P1S1	AJ620198	99	-	FW
<i>Planctomycetes</i>						
	TH3-86	Clone Liuu-5-192	AY509489	97	-	FW
	TH3-90	Clone Dpcom243	AY453254	96	-	Sediment
<i>Bacteroidetes</i>						
	TH3-47	Clone CR99-2-72	AF429258	96	-	FW
	TH3-69	Clone 207ds20	AY212653	99	PRD01a001b [§]	FW
	TH3-81	Clone SF33	AJ697700	98	PRD01a001b [§]	FW
<i>Fibrobacteres</i>						
	TH3-98	Clone Green sulfur OPB56	AJ630296	95	-	FW
<i>Cyanobacteria</i>						
	TH3-10, 42, 46, 96	Isolate <i>Cyanobium</i> LBG2	AF330249	98	-	FW
	TH3-43	Isolate <i>Synechococcus</i> OBB26S03	AJ639899	99	-	FW

3 * FW refers to freshwater. [#]Subcluster B of *Polynucleobacter* cluster (Hahn, 2003; Wu & Hahn, 2006). [§]Zwart et al., 2002; Warnecke et al., 2004. [†]Hahn et
 4 al., 2003. ^{##}Allgaier and Grossart, 2006. ^{**}Newly proposed cluster in this study.

1 **Table S3.** Phylogenetic affiliations of cloned 16S rRNA gene sequences obtained from the Meiliang Bay library
 2 representing the bacterioplankton community composition in a phytoplankton-dominated environment.

Groups	Clone name	closest relative	Accession number	Similarity %	Freshwater Clusters [#]	Sources
<i>Actinobacteria</i>						
	TH1-11	Isolate <i>Mycobacterium</i> sp.	AJ002094	98	acTH-2 ^{**}	Sediment
	TH1-24	Clone S5	AJ575507	99	acIV-A	FW [§]
	TH1-25	Clone P38.54	AY752108	92	-	FW
	TH1-29	Clone ARFS-33	AJ277699	93	-	Rice paddy
	TH1-41	Clone Elev_16S_1332	EF019953	94	-	Soil
	TH1-43	Isolate <i>Bacterium</i> rJ7	AB021325	97	-	Activated sludge
	TH1-44, 49	Clone LT11OP1A8	DQ444430	97	acIV-B ^{##}	FW
	TH1-65, 77	Clone STH5-13	DQ316383	94	acIV-D ^{##}	FW
	TH1-84	Clone ST5-1	DQ316368	94	acIV-D ^{##}	FW
	TH1-93	Clone Elev_16S_634	EF019399	92	-	Soil
	TH1-90, 95	Clone Sponge 8	AY948357	96-97	-	FW
	TH1-86, 94	Clone ST5-26	DQ316371	93-98	-	FW
	TH1-96	Clone lhad10	DQ648909	97	-	Soil
	TH1-97	Clone ML-9-97.2	DQ520197	99	Sta2-30 (acI-B)	FW
	TH1-9, 13, 15, 16, 18, 34, 40, 42, 57, 66, 70	Clone S4	AJ575506	93-98	acIV-B ^{##}	FW
	TH1-22, 61, 63, 89, 91, 98	Clone ML-9-55.2	DQ520190	98-99	acIV	FW
	TH1-2, 7, 36, 51	Clone ML-9-87.2	DQ520196	98-99	acTH-1 ^{**}	FW
<i>Gammaproteobacteria</i>						
	TH1-32	Isolate <i>Acinetobacter</i> sp.	DQ842493	96-99	-	Soil
	TH1-3, 64	Clone 88_17	AF467302	99	-	Soil
	TH1-17	Clone 91_11	AF467306	99	-	Soil
	TH1-21	Clone WD2124	AJ292676	99	-	Soil
	TH1-35	Isolate <i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM402950	99	-	Sediment
	TH1-39	Clone 91_18	AF467295	99	-	Soil
	TH1-87	Clone 86	DQ165130	96	-	Sediment
	TH1-73	Clone AH72	AY963365	95	-	Soil
	TH1-88	Isolate <i>Acinetobacter</i> WW21	EF433555	99	-	Soil
	TH1-46	Clone F5S6	DQ068810	98	-	Soil
<i>Betaproteobacteria</i>						
	TH1-69	MWH-UniP4	AJ565422.1	97	-	FW
	TH1-83	Isolate <i>Ralstonia</i> sp.	AF280433	99	-	Soil
	TH1-5, 59	Isolate <i>Leptothrix mobilis</i>	X97071	96-98	-	Soil
	TH1-38, 74	Clone C1-A6	DQ676998	99	-	Sediment
<i>Verrucomicrobia</i>						
	TH1-67, 100	Clone P38.38	AY752101	96	FukuN18	FW
	TH1-55	Clone P38.12	AY752089	97	FukuN18	FW
<i>Alphaproteobacteria</i>						
	TH1-53	Clone GKS2-215	AJ290032	95	-	FW
	TH1-60	Clone 53	DQ413112	99	-	SBR reactor
	TH1-62	Isolate <i>Rhodobacter</i> sp.	AB251408	98	-	Ditch
	TH1-30, 76	Clone ML-3-64.2	DQ520162	92-96	-	FW
	TH1-19	Clone HTH6	AF418965	99	LD12	FW
<i>Deltaproteobacteria</i>						
	TH1-8, 14	Clone FAC87	DQ451526	91	-	Soil
<i>Planctomycetes</i>						
	TH1-12, 20, 56	Isolate <i>Pirellula</i> sp.	X81940	98	-	Particles
	TH1-10	Clone LT110P1D4	DQ444439	96	-	FW
	TH1-27	Clone ST11-26	DQ501334	98	-	FW
<i>Bacteroidetes</i>						
	TH1-82	Clone S1-4-CL9	AY728066	93	-	Soil
	TH1-50	Clone S9A-31	AB154301	95	-	FW
<i>Fibrobacteres</i>						
	TH1-4	Clone ML-7-70.2	DQ520175	99	-	FW
<i>Cyanobacteria</i>						
	TH1-45, 54, 80	Isolate <i>Cyanobium</i> LB03	AY183115	99	-	FW
	TH1-1, 52, 71, 92	Isolate <i>Synechococcus</i> PCC9005	AF216950	99	-	FW
	TH1-58, 85	Isolate <i>Merismopedia</i> sp.	AJ639891	98-99	-	FW
Others						
	TH1-31	Plastid	AY221720	99	-	FW
	TH1-99	Clone 655952	DQ404824	86	-	Sediment
	TH1-23	Clone LGD10	AF047567	98	-	Sediment

3 [#]The name of freshwater bacterial clusters were the same as in Table S1. [§] FW refers to freshwater.

Intra-habitat heterogeneity of microbial food web structure under the regime of eutrophication and sediment resuspension in the large subtropical shallow Lake Taihu, China

Qinglong L. Wu · Yuwei Chen · Kuidong Xu ·
Zhengwen Liu · Martin W. Hahn

© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Planktonic microbial community structure and classical food web were investigated in the large shallow eutrophic Lake Taihu (2338 km², mean depth 1.9 m) located in

subtropical Southeast China. The water column of the lake was sampled biweekly at two sites located 22 km apart over a period of twelve month. Site 1 is under the regime of heavy eutrophication while Site 2 is governed by wind-driven sediment resuspension. Within-lake comparison indicates that phosphorus enrichment resulted in increased abundance of microbial components. However, the coupling between total phosphorus and abundance of microbial components was different between the two sites. Much stronger coupling was observed at Site 1 than at Site 2. The weak coupling at Site 2 was mainly caused by strong sediment resuspension, which limited growth of phytoplankton and, consequently, growth of bacterioplankton and other microbial components. High percentages of attached bacteria, which were strongly correlated with the biomass of phytoplankton, especially *Microcystis* spp., were found at Site 1 during summer and early autumn, but no such correlation was observed at Site 2. This potentially leads to differences in carbon flow through microbial food web at different locations. Overall, significant heterogeneity of microbial food web structure between the two sites was observed. Site-specific differences in nutrient enrichment (i.e. nitrogen and phosphorus) and sediment resuspension were identified as driving forces of the observed intra-habitat differences in food web structure.

Guest editors: B. Qin, Z. Liu & K. Havens
Eutrophication of shallow lakes with special reference to
Lake Taihu, China

Q. L. Wu · Y. Chen · Z. Liu
Nanjing Institute of Geography & Limnology,
Chinese Academy of Sciences,
Nanjing 210008, P.R. China

Q. L. Wu · M. W. Hahn
Institute for Limnology,
Austrian Academy of Sciences,
A-5310 Mondsee, Austria

K. Xu
Institute of Oceanography,
Chinese Academy of Sciences, Qingdao
266071, P.R. China

Z. Liu
Institute of Hydrobiology, Jinan University,
Guangzhou 510632, P.R. China

Present Address:

Q. L. Wu (✉)
Division of Environmental Science, Engineering,
Faculty of Engineering, National University
of Singapore, 1 Engineering Drive 2,
Singapore 117576, Singapore
e-mail: wuqinglong@hotmail.com

Keywords Microbial food web · Eutrophication · Resuspension · Shallow lake · Heterogeneity

Introduction

Eutrophication in lakes associated with cyanobacterial blooms, notably the cyanobacteria *Microcystis* spp., is becoming common in many parts of the world as a consequence of excessive input of nutrients and water pollution (Dokulil & Teubner, 2000). Although many studies on pelagic classical food webs have been performed, the microbial food webs of eutrophic lakes in tropical or subtropical zone have received only little attention (Robarts & Wicks, 1990; Sommaruga, 1995). The currently available information on microbial food webs in the pelagic of freshwater systems is mainly about temperate lakes. In these lakes nutrient has significant impacts on microbial food webs (e.g. Weisse, 1991; Berninger et al., 1993). The nutrients enrichment in lakes resulted in increased abundance and biomass of different microbial components (e.g. Beaver & Crisman, 1989; Christoffersen et al., 1990; Berninger et al., 1991). Also under eutrophic and hypertrophic conditions, the microbial food webs may play an important role in the carbon flow and nutrient cycling as they do under oligotrophic conditions (Weisse & Stockner, 1993). On the other hand, the energy transfer efficiency is assumed to decrease with increasing trophic status of lakes (Weisse & Stockner, 1993; Sommaruga, 1995). Along a gradient towards eutrophy, ‘bottom-up’ control (i.e. supply of nutrients) of the microbial components is increasingly shifted to ‘top-down’ interactions (Weisse, 1991; Weisse & Stockner, 1993). In eutrophic lakes with high abundance of colonial *Microcystis* spp., the dominance of *Microcystis*-attached or *Microcystis*-associated bacteria may occur (Worm & Søndergaard, 1998). Due to the decreased sensitivity of attached bacteria to grazing by most bacterivorous protists (Jürgens & Güde, 1994), the increased proportion of attached bacteria may have consequences for the structure and energy transfer efficiency of microbial food web in *Microcystis* spp. dominated habitats.

Physical forces may influence the microbial food webs of shallow water habitats. One of the most important processes is wind-driven sediment resuspension and water column mixing. It has been indicated that sediment resuspension may increase the total abundances and may also change the community composition of protists due to passive dispersal of protists from sediment (Rogerson & Laybourn-Parry, 1992; Shimeta & Sisson, 1999; Garstecki et al., 2000) and due to species-specific differences in susceptibility to resuspension (Shimeta & Sisson, 1999; Garstecki et al., 2002). Previous experiments demonstrated that at least some protists are generally well adapted to environmental situations of high sediment load (Boenigk & Novarino, 2004). Field and experimental studies indicate that sediment resuspension may cause release of nutrients and organic matter into the water column (Arfi & Bouvy, 1995). This can result in increased bacterial abundance and biomass (Wainright, 1987, 1990; Ritzrau & Graf, 1992), as well as in increased numbers of bacterivorous protists benefiting from the increased prey availability (Garstecki et al., 2002). The currently available information on the ecological impacts of sediment resuspension was mainly obtained in studies on estuarine and coastal systems.

In this study, the structure and dynamics of the planktonic microbial food web in the large subtropical shallow eutrophic Lake Taihu (Qin et al., 2007) were investigated. This lake has been the subject of many limnological studies during the last 50 years (Qin et al., 2004), however, detailed studies on the microbial food web were lacking thus far. For comparison of intra-habitat differences of microbial food web structure two sites located 22 km apart were selected for investigation over a period of twelve month. The two sites differ strongly in their degree of sediment resuspension and eutrophication. In order to reveal possible site-specific differences in the interactions between classical and microbial food web, the dynamics and composition of phytoplankton and zooplankton were also investigated. Attempts to analyse the potential effects of eutrophication and sediment resuspension on microbial food web in this large and shallow lake were made.

Methods

Study sites and sampling scheme

General information of Lake Taihu can be found in the introductory paper (Qin et al., 2007) or elsewhere (Chen et al., 1997; Qin et al., 2004). The lake can be divided into several different regions according to the spatial differences of physical and chemical conditions and phytoplankton community structure (Chen et al., 1997, 2003). One sampling station (Site 1) is located in Meiliang Bay, which was highly enriched with nitrogen and phosphorus (Fig. 1). The bay is located in the northern part of Lake Taihu, has a surface area of ca. 100 km², and an average depth of ca. 1.8 m. The eutrophication of the bay was mainly caused by pollution with domestic wastewater discharged from Lujiang and Liangxi River (Fig. 1). The second sampling station (Site 2) is located in the open lake close to its centre (Fig. 1). The open lake is less enriched with nitrogen and phosphorus than most of the bays. The open lake is on average only a few centimetres deeper than Meiliang Bay, but much more exposed to wind.

Twenty-four samplings were performed at both sampling sites from September 30, 2002 to September 30, 2003, at intervals of ca. 15 days. All samples were collected from surface waters (top 50 cm) with a 5-litre Schindler sampler. Sampling

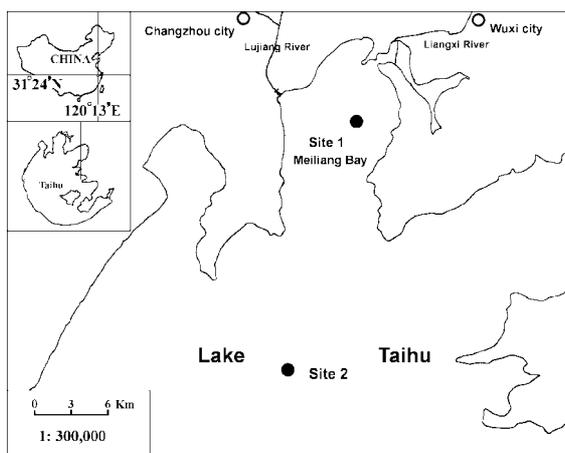


Fig. 1 Map of the northern part of Lake Taihu showing the locations of the sampling sites in Meiliang Bay (Site 1) and the open lake (Site 2)

was undertaken between 9 and 11 a.m. Fifty ml water samples for determination of numbers of freely suspended bacteria, attached and aggregated bacteria, and heterotrophic nanoflagellates (HNF) were fixed with 2% formalin (final concentration). 250 ml water samples for determination of phytoplankton, ciliates, and nauplii were preserved with 1.5% Lugol's Iodine. Macrozooplankton was collected by filtering 5 litre lake water through a nylon mesh of 30 μ m. Samples were fixed with formalin (final concentration 4%). All samples were stored at 4°C in dark until further analysis within 5 months.

At each second sampling, secchi-depth (SD), water temperature (WT), pH, conductivity (Cond), dissolved oxygen (DO), total suspended solid (TSS), total nitrogen (TN), total dissolved nitrogen (TDN), ammonium (NH₄⁺), nitrite (NO₂⁻), nitrate (NO₃⁻), total phosphorus (TP), total dissolved phosphorus (TDP), ortho-phosphorus (PO₄³⁻-P), and chlorophyll *a* (Chl *a*) were measured according to standard methods (Jin & Tu, 1990).

Abundance and biomass determination

Phytoplankton samples were counted using a sedimentation chamber of 1–5 ml at 200× or 400× magnification on an inverted microscope. Phytoplankton species were identified according to Hu et al. (1980). Algal biovolumes were calculated from cell numbers and cell size measurements using appropriate geometric morphs (Hillebrand et al., 1999). Conversion to biomass assumed that 1 mm³ of biovolume is equivalent to 1 mg of fresh-weight biomass.

Ciliates and nauplii were counted in sedimentation chambers of 5–50 ml at 200× magnification on an inverted microscope. Ciliates were identified mainly according to the keys of Foissner and Berger (1996), and Foissner et al. (1999). Linear dimensions of about 30 individuals of abundant taxa were measured by using the LUCIA G image analysis system (Lucia 4.51, Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic), which was connected to the inverted microscope via a video camera. The biovolumes were calculated using appropriate geometric shapes and converted into biomass using a conversion factor of 110 fg C μ m⁻³ (Turley et al., 1986). Macrozooplankton were counted in a Bogorov

chamber at 45× magnifications, and identified according to Zhang & Huang (1991). For counting of rotifers fixed samples of 0.1 to 0.5 litre were filtered through a 30 µm mesh and poured into a chamber, and counted at 100× magnification following the same approach as for ciliates and nauplii.

For determination of numbers of freely suspended bacteria and numbers of attached bacteria untreated and sonicated subsamples were counted (Velji & Albright, 1993). Subsamples (0.2–1 ml) were diluted to 1 or 2 ml with autoclaved inorganic medium, stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.1% wt/vol, final concentration) for 10 min (Porter & Feig, 1980), filtered onto black 0.2 µm pore-size membrane filters (Millipore), and counted at 1250× magnifications by using an epifluorescence microscope (Zeiss, Germany) equipped with a BP 365, FT 395, and LP 397 filter set. Attached bacterial abundances were determined as the differences between total cell numbers (sonicated samples) and total numbers of freely suspended cells (non-sonicated samples). Autotrophic picoplankton cells were identified by checking for the presence of autofluorescence under green excitation and excluded from bacterial counts. Length and width of bacteria were determined with LUCIA G image analysis system as described in Psenner (1993). Cell volumes were calculated with the formula: $V = (w^2 \times \pi/4) \times (l-w) + (\pi \times w^3/6)$, where $V = \text{Volume } (\mu\text{m}^3)$, $w = \text{width } (\mu\text{m})$ and $l = \text{length } (\mu\text{m})$. The biovolumes were converted into biomass using allometric relationship as suggested by Norland (1993).

Heterotrophic nanoflagellates (HNF) were counted and measured in the same way as for bacteria except sonication of samples. Individual autofluorescence was measured under green excitation using a BP 510–560, FT 580, and LP 590 filter set. Biovolumes were calculated using the formula: $V = (\pi \times w^2/6) \times L$, where $V = \text{Volume } (\mu\text{m}^3)$, $w = \text{width } (\mu\text{m})$ and $L = \text{length } (\mu\text{m})$. The biomass of HNF was estimated from mean cell volume using a conversion factor of 220 fg C μm^3 (Borsheim & Bratbak, 1987).

Statistics

Redundancy analysis (RDA) was applied for revealing relationship between the members of

planktonic microbial and classical food web and the major environmental variables controlling the dynamics of different members. The biotic variables include the abundances of total bacteria, attached bacteria, HNF, ciliates, rotifers, Cladocerans, *Daphnia* sp., total phytoplankton, and *Microcystis* spp. The tested abiotic environmental variables were water temperature, TP, TN, TSS and COD. All data were $\log(x + 1)$ transformed. The RDA was performed with the software CANOCO 4.5 (SCIENTIA Software) by assuming linear species-environment relationships because Detrended Correspondence Analysis (DCA) run on biotic variables indicated that the length of first axis was <2. The significance of first ordination and canonical axes together was assessed in permutation tests with 499 unrestricted Monte Carlo permutations. The statistical analyses were performed separately for data of Site 1 and Site 2. *T*-test was used to test the differences of parameters between the two sites. Log-transformation was used to normalize the data if necessary.

Results

Major ecological differences at the two study sites

Main ecological parameters measured at the two sites of Lake Taihu during the one-year sampling period were summarized in Table 1. Major between-sites differences in chemo-physical parameters were observed for conductivity, secchi depth, concentration of total suspended solid, and concentrations of major algal nutrients (Table 1). No anoxic condition were observed at both sites over the water column and near the bottom, but much lower dissolved oxygen was found at the sediment water interface at Site 1 (unpublished data from Fan et al.). Minimum water temperature (3.8°C) was measured in January and maximum water temperature occurred in July (30°C) (Fig. 2a and b). The concentrations of TSS, TN, NH_4^+ , NO_3^- , TP, TDP, and Chl *a* were higher at Site 1 than those at Site 2. Abundance and biomass of components of planktonic community were higher at Site 1 than at Site 2. Little fluctuation of chl *a* value was observed at Site 2

(Fig. 2b). But high seasonal variation of TSS was found at Site 2 relative to Site 1 (Fig. 2e, f). Results of RDA indicated that the most important factors structuring the food web at Site 1 were TP and water temperature (Fig. 3a), while at Site 2 it was only the water temperature (Fig. 3b).

Seasonal changes of microbial components

At Site 1, total bacterial abundance ranged from 2.9×10^6 cells ml^{-1} to 14.5×10^6 cells ml^{-1} with a mean of 7.4×10^6 cells ml^{-1} (Fig. 4a). Bacterial numbers peaked in the middle of summer and showed the lowest values in late winter. The mean of bacterial cell volume ranged from 0.03 to $0.13 \mu\text{m}^3$, while the median ranged from $0.02 \mu\text{m}^3$ to $0.09 \mu\text{m}^3$ (Fig. 4e). Total bacterial biomass ranged from $34.8 \mu\text{g C l}^{-1}$ to $299.5 \mu\text{g C l}^{-1}$ with a mean of $98.3 \mu\text{g C l}^{-1}$ (Fig. 4a). Fluctuation of

bacterial biomass was generally in accordance with bacterial abundance. Attached bacterial abundance oscillated between 0 (not measurable) and 6.1×10^6 cells ml^{-1} with a mean of 1.4×10^6 cells ml^{-1} accounting for 0–51.8 % and 14.4% of the total bacterial abundance (Fig. 4c). High numbers of attached bacteria were observed from May to October.

At Site 2, the mean bacterial abundance was 5.7×10^6 cells ml^{-1} with a highest value of 9.2×10^6 cells ml^{-1} in middle of summer and a lowest value of 2.0×10^6 cells ml^{-1} in early winter (Fig. 4b). The bacterial biomass ranged from $28.9 \mu\text{g C l}^{-1}$ to $128.4 \mu\text{g C l}^{-1}$ with an average of $64.9 \mu\text{g C l}^{-1}$. Little fluctuation of bacterial abundance and biomass was observed at Site 2. Attached bacteria ranged from 0 (not measurable) to 4.3×10^6 cells ml^{-1} with a mean value of 1.4×10^6 cells ml^{-1} , which account for 0–51.2% and 19.0% of the total bacterial abundance

Table 1 Physical, chemical, and biological parameters determined for the two sampling sites of Lake Taihu in the period from September 2002 to September 2003. The data of the two sampling sites were compared by *t*-test

Parameters	Site 1 Mean (range)	Site 2 Mean (range)	<i>p</i> value (<i>t</i> -test)
Water depth (m)	2.0–2.7	2.4–3.2	<0.01
Water temperature (°C)	17.6 (4.3–30.0)	17.2 (3.8–30.0)	0.91
Dissolved oxygen (g m^{-3})	9.28 (6.38–12.31)	9.01 (6.82–12.51)	0.91
Conductivity ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	457 (380–570)	388 (320–440)	<0.01
PH	8.43 (8.01–8.98)	8.38 (8.19–8.66)	0.59
Secchi-depth (cm)	50 (10–100)	36 (15–50)	0.08
Total suspended substances (g m^{-3})	32.31 (9.56–51.09)	68.18 (20.24–170.12)	0.02
Chemically oxygen demanded (mg l^{-1})	7.6 (4.6–34.2)	5.9 (3.6–5.9)	0.04
Total nitrogen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	282.9 (108.6–780.0)	154.8 (61.4–252.9)	0.03
Total dissolved nitrogen ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	182.9 (32.1–311.4)	117.9 (21.4–234.9)	0.09
$\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	40.0 (2.14–110.0)	6.4 (1.4–17.9)	<0.01
$\text{NO}_2^-\text{-N}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	5.0 (0.7–19.3)	0.7 (0.1–1.4)	0.03
$\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	70 (3.6–132.1)	59.3 (4.3–124.3)	0.58
TP ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	3.39 (1.26–6.87)	2.36 (1.45–3.81)	0.06
Total dissolved phosphorus ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	1.07 (0.52–2.32)	0.65 (0.32–1.84)	0.04
PO_4^{3-}P ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0.19 (0–1.0)	0.13 (0–0.39)	0.19
Chlorophyll a ($\mu\text{g l}^{-1}$)	20.75 (1.70–52.01)	8.88 (3.83–16.12)	0.04
Total nitrogen: total phosphorus	44.95 (8.82–103.08)	32.35 (12.2–75.8)	0.40
Total bacterial abundance (10^6 cells ml^{-1})	7.4 (2.9–14.5)	5.7 (2.0–9.2)	<0.01
Total bacterial biomass ($\mu\text{g C l}^{-1}$)	98.3 (34.8–299.5)	64.9 (28.9–128.4)	<0.01
HNF abundance (10^7 cells l^{-1})	0.8 (0.1–3.5)	0.5 (0.1–1.6)	0.03
HNF biomass ($\mu\text{g C l}^{-1}$)	127.1 (4.9–699.7)	84.7 (1.6–454.3)	0.02
Ciliate abundance (10^3 cells l^{-1})	9.1 (0.5–29)	8.7 (1.8–62.6)	0.89
Ciliate biomass ($\mu\text{g C l}^{-1}$)	16.2 (0.7–68.6)	10.4 (1.4–37.4)	0.21
Phytoplankton biomass (mg l^{-1})	2.38 (0.06–9.02)	0.28 (0.01–0.86)	0.02
Rotifer abundance (ind. l^{-1})	640 (1–4650)	156 (1–696)	0.02
Cladocerans abundance (ind. l^{-1})	183 (0.2–740)	87.5 (1.4–496)	0.03

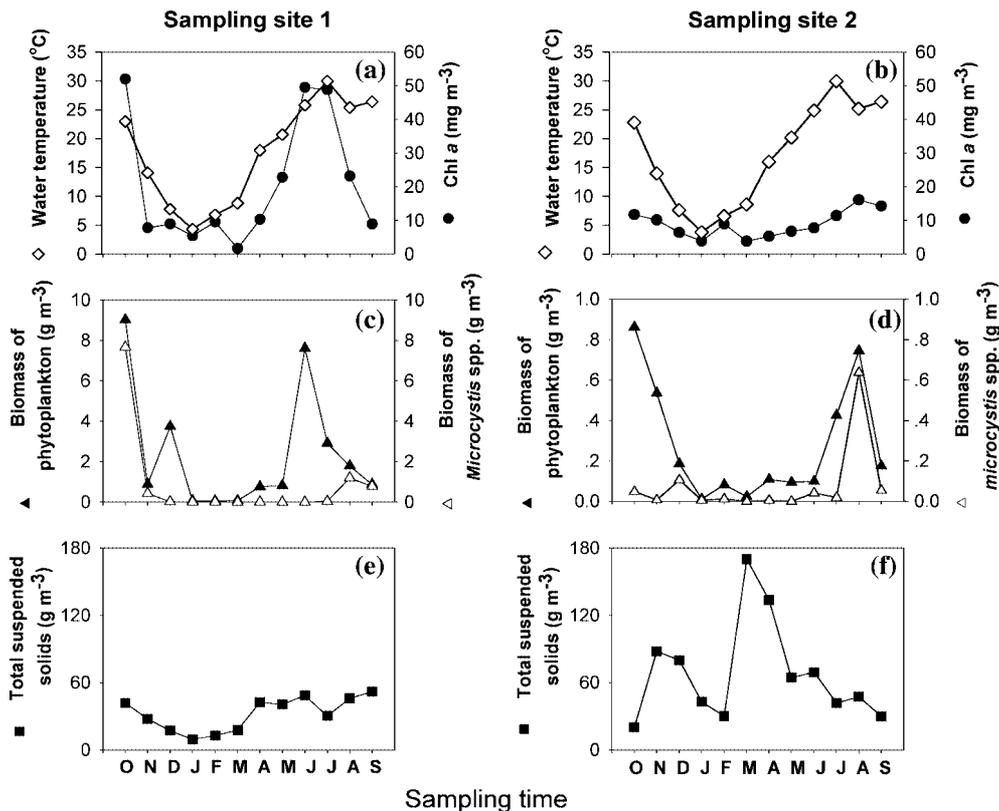


Fig. 2 Seasonal development of Chlorophyll a and water temperature (**a** and **b**), biomass of phytoplankton and biomass of colonial *Microcystis* spp. (**c** and **d**, and total

suspended solids (TSS) (**e** and **f**) in the water column at the two sampling stations in Lake Taihu

respectively (Fig. 4d). High abundance and percentage of attached bacteria were found from early spring to late autumn. The mean and median of cell volume fluctuated from 0.03 to 0.07 μm^3 and 0.02 μm^3 to 0.03 μm^3 respectively (Fig. 4f). No correlations between the cell volumes of freely suspended bacteria or attached bacteria, and temperature were found at both sampling stations (linear regression, $P > 0.05$).

The abundance of HNF at Site 1 ranged from 0.1×10^7 cells Γ^{-1} to 3.5×10^7 cells Γ^{-1} with a median and mean density of 0.6×10^7 cells Γ^{-1} and 0.8×10^7 cells Γ^{-1} respectively (Fig. 5a). HNF in the size class from 5 to 10 μm were the most abundant. HNF biomass ranged from 4.9 $\mu\text{g C } \Gamma^{-1}$ to 699.7 $\mu\text{g C } \Gamma^{-1}$ with a median and mean biomass of 56.6 $\mu\text{g C } \Gamma^{-1}$ and 127.1 $\mu\text{g C } \Gamma^{-1}$, respectively (Fig. 5a). Single peak of HNF abundance and biomass was observed in late autumn, while no

strong oscillation was observed during other months (Fig. 5a). At Site 2, the median and average density of HNF was 0.4×10^7 cells Γ^{-1} and 0.5×10^7 cells Γ^{-1} with a range from 0.1×10^7 cells Γ^{-1} to 1.6×10^7 cells Γ^{-1} , respectively (Fig. 5h). HNF biomass ranged from 1.6 $\mu\text{g C } \Gamma^{-1}$ to 454.3 $\mu\text{g C } \Gamma^{-1}$ with a median and mean biomass of 57.3 $\mu\text{g C } \Gamma^{-1}$ and 84.7 $\mu\text{g C } \Gamma^{-1}$ (Fig. 5h). HNF biomass formed one peak in late fall (Fig. 5h). Both HNF abundance and HNF biomass were not correlated with the mean size of total bacteria and freely suspended bacteria at both sites (linear regression, $P > 0.05$).

At Site 1, the abundance of ciliates ranged from 470 cells Γ^{-1} to 29,000 cells Γ^{-1} with a mean and median density of 9100 cells Γ^{-1} and 4000 cells Γ^{-1} (Fig. 5b). Ciliates in the size class of 20–40 μm were the most abundant in most time of the year (Fig. 5b). Dominant taxa in this size

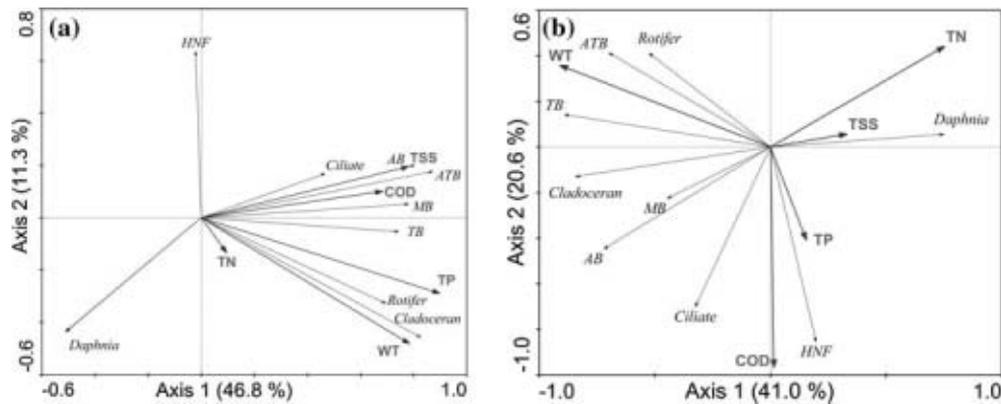


Fig. 3 RDA biplots show different planktonic groups in relation to main environmental factors at Site 1 (a) and Site 2 (b) in Lake Taihu. TN, TP, TSS, WT and COD refer to total nitrogen, total phosphorus, total suspended

substances, water temperature, and chemically oxygen demanded respectively. AB, MB, TB, and ATB refer to abundance of phytoplankton, *Microcystis* spp., total bacteria and attached bacteria, respectively

class were *Strobilidium*-like and unidentified oligotrich small ciliates. The lowest abundance occurred in winter and early spring with excep-

tion of 15th of January, while the highest density was observed in summer. Ciliates <20 μm were abundant only from July to September (Fig. 5b)

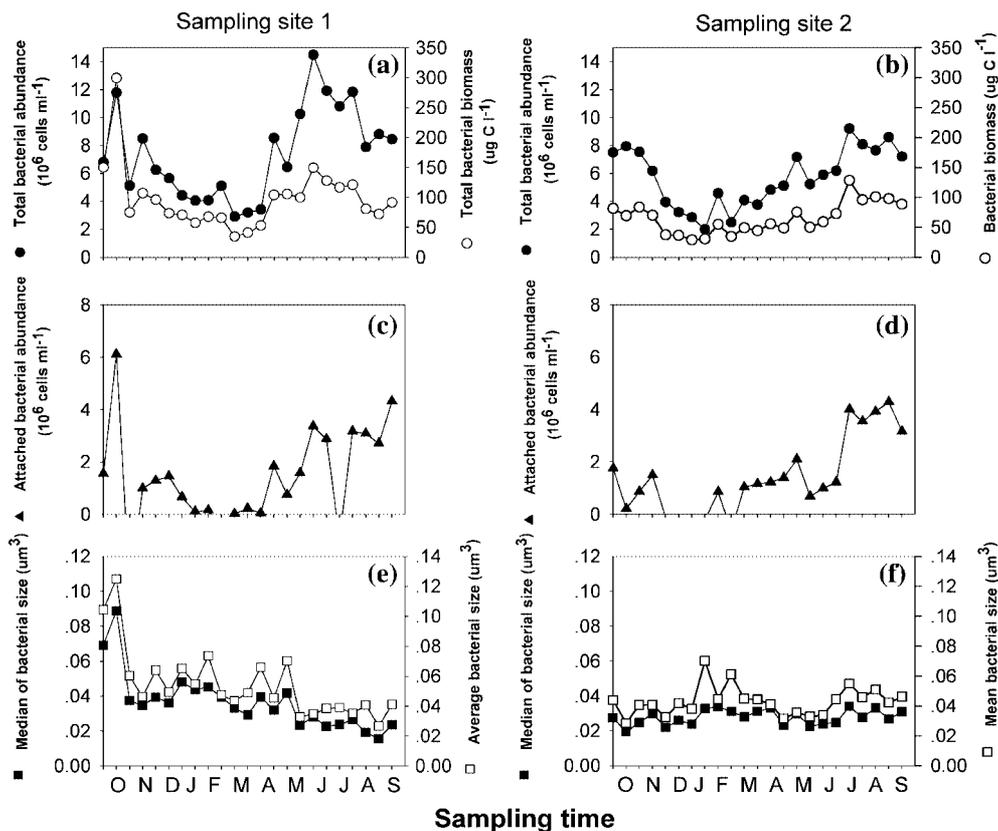


Fig. 4 Seasonal development of total bacterial abundance and total bacterial biomass (a and b), attached bacterial abundance (c and d), mean and median of bacterial size (e and f) at the two sampling sites in Lake Taihu

and dominated by *Urotricha*-like species. In January and June, ciliates $>40\ \mu\text{m}$ contributed 50% of total ciliate abundance (Fig. 5b). They were represented by *Vorticella* spp., *Epistylis* spp., *Codenella* sp., and *Tintinnidium* spp. Total ciliate biomass ranged from $0.7\ \mu\text{g C l}^{-1}$ to $68.6\ \mu\text{g C l}^{-1}$ with a mean and median of $16.2\ \mu\text{g C l}^{-1}$ and $10.3\ \mu\text{g C l}^{-1}$ (Fig. 5b). High biomass was observed in January and June, which was mainly contributed by *Vorticella* spp., and *Epistylis* spp. At Site 2, total ciliate abundance averaged 8700 cells l^{-1} , showing two higher values at the end of January with density of 26,100 cells l^{-1} and in midsummer with density of 62,600 cells l^{-1} , while showing lower values during most time of the year (Fig. 5i). During the winter peak, ciliates in the size class of $<40\ \mu\text{m}$ were the dominant groups (Fig. 5i). They were represented by an unidentified small ciliate and *Pelagovorticella*-like species, respectively. During the summer peak, *Urotricha*-like ciliates were dominating. During other periods, ciliates were mainly composed of *Codenella* sp., *Tintinnidium* spp., *Stenosemella* sp., and *Vorticella* spp. Total biomass of ciliates ranged from $1.4\ \mu\text{g C l}^{-1}$ to $37.4\ \mu\text{g C l}^{-1}$ with a mean and median of $10.4\ \mu\text{g C l}^{-1}$ and $7.5\ \mu\text{g C l}^{-1}$ (Fig. 5i). Higher biomass was observed from May to August, which was mainly contributed by *Vorticella* spp. and *Codenella* sp.

Community dynamics of phytoplankton and zooplankton

At Site 1, the phytoplankton biomass ranged from $0.06\ \text{g m}^{-3}$ in January to $9.02\ \text{g m}^{-3}$ in October. The cyanobacteria *Microcystis* spp. dominated in terms of biomass among the cyanobacteria, as well as among the whole phytoplankton assemblages from July to November (Fig. 2a). At Site 2, low phytoplankton biomass was observed with a range from $0.01\ \text{g m}^{-3}$ in December to $0.86\ \text{g m}^{-3}$ in October. *Microcystis* spp. dominated phytoplankton communities in August and September (Fig. 2b).

At Site 1, rotifer abundance averaged 640 ind. l^{-1} showing the highest value of 4650 ind. l^{-1} in the middle of July and the lowest value of

1 ind. l^{-1} at the end of December (Fig. 5c). The abundant rotifers include *Branchionus* sp., *Keratella valga*, and *Polyarthra* sp., while *Asplanchna priodonta* only contributed to more than 50% of rotifer biomass in middle of July. Nauplii abundance ranged from 6 to 1200 ind. l^{-1} with an average and median of 144 and 27 ind. l^{-1} (Fig. 5d). The highest abundance occurred at the end of August, while much lower abundance was observed during most of other period (Fig. 5d). Abundance of calanoid copepods ranged from 0 to 22 ind. l^{-1} with maximum abundances occurring in middle of fall and spring, and minimum in summer (Fig. 5e). Abundance of cyclopoid copepods averaged 49 ind. l^{-1} , showing highest value of 408 ind. l^{-1} in middle of July and much lower values during most of the other periods (Fig. 5f). The succession of cladocerans can be divided into two main phases (Fig. 5g). In the first phase, *Daphnia* sp. dominated the plankton community from end of February to end of May, with maximum abundance of 96 ind. l^{-1} at the end of March (Fig. 5g). In the second phase, from June to November, *Bosmina* sp. was the most abundant species, showing the highest abundance of 722 ind. l^{-1} at the end of June (Fig. 5g). *Moina* sp. only appeared in considerable numbers in middle of September (Fig. 5g). At Site 2, low rotifer abundances were observed all over the year, ranging from 1 to 696 ind. l^{-1} with an average of 156 ind. l^{-1} (Fig. 5j). Little fluctuation of rotifer abundance was found (Fig. 5j). The abundant rotifers include *Branchionus* sp., *Keratella cochlearis*, and *Polyarthra* sp. Nauplii abundance ranged from 0.6 to 2830 ind. l^{-1} with an average and median of 226 and 17 ind. l^{-1} (Fig. 5k). One nauplii peak appeared at the end of June, while much lower abundance was observed during most of the other periods (Fig. 5k). Higher abundance of calanoid copepods and cyclopoid copepods was observed in later summer while lower abundance appeared during most of other period (Fig. 5l, m). The succession of cladocerans could again be divided into two main phases (Fig. 5n). In the first phase, *Daphnia* sp. also dominated the plankton community at this site from middle of January to

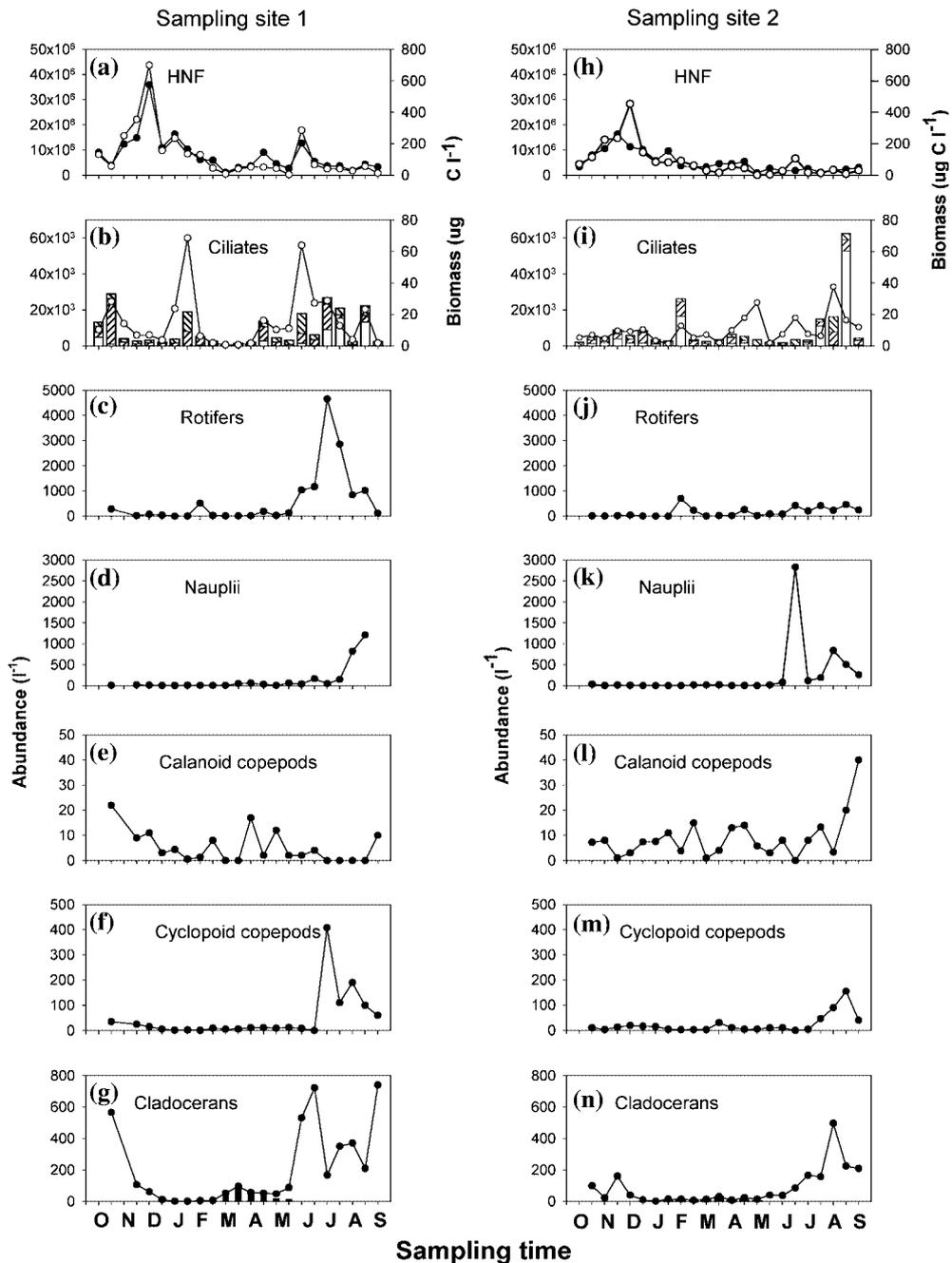


Fig. 5 Seasonal changes in abundance (●) and biomass (○) of HNF (a and h), ciliates (b and i), rotifers (c and j), nauplii (d and k), calanoid copepods (e and l), cyclopoid copepods (f and m), and cladocerans (g and n). In Fig. b and i, the vertical bars show abundances of ciliates in three

size classes: <20 μm (open part of the bars); 20–40 μm (upward diagonally hatched part of the bars); and > 40 μm (downward diagonally hatched part of the bars). In figure g and n, the vertical black bars show the abundance of *Daphnia*

middle of May, with maximum abundance of 29 ind. l⁻¹ at the end of March (Fig. 5n). In the second phase from May to middle of November,

Bosmina sp. and *Moina* sp. were the most abundant species, showing the highest abundance of 496 ind. l⁻¹ in the middle of August (Fig. 5n).

Statistics

RDA model calculated with the data of Site 1 and Site 2 significantly (for first canonical axis, $P < 0.05$) explained the variability of the abundance of members of planktonic food webs at both sites (Figs. 3a and b). At Site 1 (Fig. 3a), the first axis showed high canonical correlation with TP, WT, COD, and TSS, which were positively related to planktonic components except for HNF and *Daphnia*. HNF was negatively related to such micrograzers like rotifer and *Bosmina*-dominated zooplankton. *Daphnia* abundance was negatively related with all microbial components. There was a significant correlation between attached bacteria and TSS and abundance of *Microcystis* spp. At site 2 (Fig. 3b), the first axis showed only high canonical correlation with water temperature. In contrast to Site 1, TN, TSS and TP were even negatively related to abundance of phytoplankton and microbial communities. *Daphnia* abundance was negatively related with all microbial components as the same at Site 1.

Discussion

Influence of sediment resuspension on microbial components

Based on the concentrations of TP and TN (Table 1), Site 1 was more enriched with phosphorus and nitrogen than Site 2. On the other hand, Site 2 showed a higher intensity of sediment resuspension than Site 1, as indicated by higher amount of TSS (Table 1). Furthermore, most planktonic organisms showed on average lower biomass at Site 2.

Sediment resuspension, as a common feature of large shallow lakes, may have positive and negative impacts on microbial food webs. Positive effects on abundance of microbial components could include (i) direct transportation of benthic bacteria and protozoan into the water column (Rogerson & Laybourn-Parry, 1992; Shimeta & Sisson, 1999; Garstecki et al., 2000, 2002); (ii) release of dissolved nutrient and organic matter into water column (Arfi & Bouvy, 1995), and thereby increasing the abundance of bacteria

(Wainright, 1987, 1990; Ritzrau & Graf, 1992) and some bacterivorous protists (Garstecki et al., 2002). However, no correlations between the abundance of microbial components (i.e., bacteria, HNF and ciliates) and TSS, the indicator of sediment resuspension, were found at Site 2. The same result was found for Site 1 except the bacterial abundance. Possible explanation for these findings is the different intensity of sediment resuspension, which is dependent on wind speed, water depth, and the size of a lake. Site 1 is located in the Meiliang bay, where only very strong wind can cause a significant resuspension of sediment (Qin et al., 2004). Therefore, concentration of suspended solids in the water column at Site 1 was lower during periods of weak wind intensity or at calm situations. This is confirmed by little variations of TSS and high contribution of phytoplankton biomass to the TSS fraction. This contribution was indicated by the strong positive correlations between phytoplankton biomass and TSS. The microbial organisms in the upper sediment may only contribute to the microbial components in the water column of the bay during periods with high wind intensity. Site 2 is located in the centre of the lake, where moderate wind ($3.3\text{--}5.0\text{ m s}^{-1}$) caused strong mixing of the water column and sediment resuspension during almost two thirds of a year (Qin et al., 2004; Luo et al., 2004). Long-lasting sediment accumulation at the lake bottom was not observed at Site 2 (Qin et al., 2004). The bottom (hard clay) water interface at Site 2 can only allow biofilm-forming microorganisms to inhabit this surface, and these biofilm organisms cannot contribute much to the planktonic microbial community in the water column. For the same reason, not much organic carbon can be deposited and later introduced into the water column by resuspension events. Therefore, the bacterial community at Site 2 could, in contrast to Site 1, not benefit from release of organic material from the sediment during resuspension events. This fits to the observation, that higher amount of resuspended sediment did not lead to higher abundances of total bacteria and freely suspended bacteria at Site 2. To reveal the exact contribution of benthic microbial organism to planktonic microbial food web and its controlling factors,

more detailed temporal in situ studies are needed at different locations of the lake.

At Site 2 a negative correlation between TSS and phytoplankton biomass and a relatively low phytoplankton biomass despite relatively high concentration of total phosphorous were observed. Obviously, the phytoplankton was negatively impacted by decrease in light intensities as a result of the frequent resuspension of sediment and the high concentration of TSS (Chen et al., 2003). A negative indirect impact of sediment resuspension on bacterial growth conditions could be caused by the limited growth and production of phytoplankton. Decrease in primary production may lead to a lower supply of dissolved organic carbon for bacterial growth (Chen & Wangersky, 1996). At Site 1, the positive correlations between TSS and the bacterial abundances or phytoplankton biomass suggest no apparent negative impacts.

Impacts of eutrophication on microbial components

Higher abundances of microbial components (i.e. bacteria, HNF) were observed at site 1 than those at Site 2. This within-lake comparison supports the hypothesis that abundances of microbial components are positively related to phosphorus enrichment of a lake (e.g. Weisse, 2003). However, the coupling between TP and abundance of microbial components was much different at the two sites (Fig. 3). Indeed no obvious correlation between TP and abundance of microbial components was observed at Site 2 (Fig. 3b). This weak coupling could be due to the strong sediment resuspension at Site 2, which limited growth of phytoplankton and, consequently, growth of bacterioplankton and other microbial components (i.e. HNF, ciliate). This was supported by the fact that no correlation between TP and phytoplankton abundance were observed at Site 2 (Fig. 3b), while good correlation between abundance of phytoplankton and bacterioplankton was found at both sites (Figs. 3a and b). On the other hand, on average higher biomass ratios of phytoplankton to bacteria were observed at Site 1 than at Site 2 (Fig. 6). This may indicate different rates of bacterial production at two different locations.

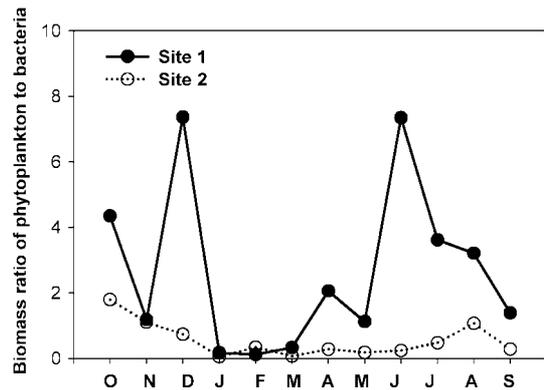


Fig. 6 Biomass ratios of phytoplankton to bacteria at the two sampling sites in Lake Taihu

Along a gradient towards eutrophy, microbial food webs are progressively controlled by ‘top-down’ forces (Weisse & Stockner, 1993), and zooplankton predation on components of microbial food webs is gaining an increasing importance in linking of planktonic microbial food webs and the classical food chains. Among the zooplankton, *Daphnia*, can strongly suppress the microbial food web by their size-selective feeding abilities (Weisse & Stockner, 1993; Jürgens, 1994, Jürgens & Stolpe, 1995). The data on the seasonal succession of cladocerans, flagellates, bacteria and ciliates at both sites allow insights into the trophic interactions between metazoans and the microbial loop (Figs. 3, 5), and indicate the similar ‘top-down’ forces of *Daphnia* during spring and early summer in such a subtropical lake. Following the collapse of *Daphnia* population in mid-summer, possibly due to fish predation and blooming of toxic colonial *Microcystis* spp., *Bosmina* sp. and *Moina* sp., dominated the crustacean community.

Significance of attached bacteria

Particles from sediment resuspension, terrestrial input, and large phytoplankton are important for colonization of attached bacteria (Simon et al., 2002). Lake Taihu received a large amount of particles (organic and inorganic) from its watershed due to intensive agriculture and soil erosion (Dokulil et al., 2000). Sediment resuspension especially in the open lake is very significant due to the lake’s shallowness (Qin et al., 2004).

Under the process of eutrophication, phytoplankton blooms, notably the colonial *Microcystis* spp. fuel Lake Taihu with high amount of particulate organic matter (Chen et al., 2003). Our investigations indicated that high abundances of attached bacteria occurred from summer to autumn at both sites in this lake. At Site 1, the strong correlations between attached bacterial abundance and biomass of *Microcystis* spp. suggests that much of the attached bacteria were associated with *Microcystis* spp. colonies (Fig. 3a). This fits to the findings in a eutrophic Danish lake (Worm & Søndergaard, 1988). Worm et al. (2001) demonstrated that bacteria attached to phytoplankton blooms hold up to nearly 80% of total bacterial numbers in an enclosure experiment. At Site 2, however, no strong correlations between attached bacterial abundance and phytoplankton biomass, *Microcystis* spp. biomass, and TSS were observed. This might suggest that the communities of attached bacteria differed in their composition at the two investigated sites.

In comparison to freely suspended bacteria, attached bacteria contributed higher proportion to bacterial production (Simon et al., 2002). The dominance of attached bacteria in Lake Taihu from summer to autumn may have consequences for the structure of the microbial food web, as well as for the carbon flow through the entire food web. Since attached bacteria could be less susceptible to predation by protozoan (Jürgens & Güde, 1994), the production by attached bacteria might not be channeled efficiently through the microbial food web to higher trophic levels. On the other hand, planktivorous fish (e.g. *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis* commonly found in Lake Taihu), which are able to directly graze upon phytoplankton dominated by *Microcystis* spp. (Xie & Liu, 2001), may directly crop a part of the production of attached bacteria. This may lead to a direct channeling of a part of the bacterial production to higher trophic levels.

Conclusion

Significant intra-habitat heterogeneity of microbial food web structure and dynamics was

observed in Lake Taihu. Site-specific differences in wind-driven sediment resuspension, as well as differences in intensity of eutrophication were identified as major causes of the observed within habitat heterogeneity. In contrast to previous observations in coastal regions, our investigations indicate that frequent sediment resuspension in large lakes does not contribute to growth of planktonic microbial organisms.

Acknowledgements This work was supported by Chinese Academy of Sciences (No. KZCX1-SW-12), NSFC (No. 30370278, 30200037), and Austrian Academy of Sciences. Jiang Ji and some other staff members at the Taihu Laboratory for Lake Ecosystem Research contributed field assistance. Q. L. Wu was supported by a scholarship from North-South dialogue Program, Ministry of Foreign Affairs, Austria (EZA project 894/01). We thank Thomas Weisse for providing comments on an early version of the manuscript.

References

- Alfri, R. & M. Bouvy, 1995. Size, composition and distribution of particles related to wind-induced resuspension in a shallow tropical lagoon. *Journal of Plankton Research* 17: 557–574.
- Beaver, J. R. & T. L. Crisman, 1989. The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems. *Microbial Ecology* 17: 111–136.
- Berninger, U. G., B. J. Finlay & P. Kuoppo-Leinikki, 1991. Protozoan control of bacterial abundances in freshwater. *Limnology and Oceanography* 36: 139–146.
- Berninger, U. G., S. A. Wickham & B. J. Finlay, 1993. Trophic coupling within the microbial food web: a study with fine temporal resolution in a eutrophic freshwater ecosystem. *Freshwater Biology* 30: 419–432.
- Boenigk, J. & G. Novarino, 2004. Effect of suspended clay on the feeding and growth of bacterivorous flagellates and ciliates. *Aquatic Microbial Ecology* 34: 181–192.
- Borsheim, K. Y. & G. Bratbak, 1987. Cell volume to carbon conversion factors for a bacterivorous *Monas* sp. enriched from sea water. *Marine Ecology Progress Series* 36: 171–175.
- Chen, W., Y. Chen, X. Gao & I. Yoshida, 1997. Eutrophication of Taihu and its control. *Agriculture Engineering Journal* 6: 109–120.
- Chen, Y., B. Qin, K. Teubner & M. T. Dokulil, 2003. Long-term dynamics of phytoplankton assemblages: *Microcystis*-domination in Lake Taihu, a large shallow lake in China. *Journal of Plankton Research* 25: 445–453.
- Chen, W. & P. Wangersky, 1996. Rates of microbial degradation of dissolved organic carbon from phytoplankton cultures. *Journal of Plankton Research* 18: 1521–1533.

- Christoffersen, K., B. Riemann, L. R. Hansen, A. Klynsner & H. B. Sorensen, 1990. Qualitative importance of the microbial food loop and plankton community structure in a eutrophic lake during a bloom of cyanobacteria. *Microbial Ecology* 20: 253–272.
- Dokulil, M. T. & K. Teubner, 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438: 1–12.
- Dokulil, M. T., W. Chen & Q. Cai, 2000. Anthropogenic impacts to large lakes in China: the Taihu example. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 3: 81–94.
- Foissner, W. & H. Berger, 1996. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology* 35: 375–482.
- Foissner, W., H. Berger & J. Schaumberg, 1999. Identification and Ecology of Limnetic Plankton Ciliates. Bayer. Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
- Garstecki, T., R. Verhoeven, S. A. Wickham & H. Arndt, 2000. Benthic-pelagic coupling: a comparison of the community structure of benthic and pelagic heterotrophic protists in shallow inlets of the southern Baltic. *Freshwater Biology* 45: 147–168.
- Garstecki, T., S. A. Wickham & H. Arndt, 2002. Effects of experimental sediment resuspension on a coastal planktonic microbial food web. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55: 751–762.
- Hillebrand, H., C. D. Dürselen, D. Kirschtel, T. Zohary & U. Pollinger, 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403–424.
- Hu, H., Y. Li, Y. Wei, H. Zhu, J. Chen & Z. Shi, 1980. *Freshwater Algae in China*. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai (in Chinese).
- Jin, X. & Q. Tu, 1990. *The Standard Methods for Observation and Analysis of Lake Eutrophication*, 2nd edn. China Environmental Science Press, Beijing (in Chinese).
- Jürgens, K. & G. Stolpe, 1995. Seasonal dynamics of crustacean zooplankton, heterotrophic nanoflagellates and bacteria in a shallow eutrophic lake. *Freshwater Biology* 33: 27–38.
- Jürgens, K. & H. Güde, 1994. The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Marine Ecology Progress Series* 112: 169–188.
- Jürgens, K., 1994. The impact of *Daphnia* on microbial food webs—A review. *Marine Microbial Food Webs* 8: 295–324.
- Luo, L., B. Qin, W. Hu & F. Zhang, 2004. Sediment re-suspension under different hydrodynamic distribution in Lake Taihu. *Journal of Lake Science* 16: 273–276.
- Norland, S., 1993. The relationship between biomass and volume of bacteria. In Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr & J. J. Cole (eds), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis, 303–308.
- Porter, K. G. & Y. S. Feig, 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943–948.
- Psenner, R., 1993. Determination of size and morphology of aquatic bacteria by automated image analysis. In Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr & J. J. Cole (eds), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis, pp. 339–346.
- Qin, B., W. Chen & W. Hu, 2004. *Succession of Ecological Environment and Its Mechanism in Lake Taihu*. China Science Press, Beijing (in Chinese).
- Qin, B., P. Z. Xu, Q. L. Wu, L. C. Luo & Y. L. Zhang, 2007. Environmental issues of Lake Taihu, China. *Hydrobiologia* 581: 3–14.
- Ritzrau, W. & G. Graf, 1992. Increase of microbial biomass in the benthic turbidity zone of Kiel Bight after resuspension by a storm event. *Limnology and Oceanography* 37: 1081–1086.
- Robarts, R. D. & R. J. Wickham, 1990. Heterotrophic bacterial production and its dependence on autotrophic production in a hypertrophic African reservoir. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 47: 1027–1037.
- Rogerson, A. & J. Laybourn-Parry, 1992. The abundance of marine naked amoebae in the water column of the Clyde Estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 33: 187–196.
- Shimeta, J. & J. D. Sisson, 1999. Taxon-specific tidal resuspension of protists into the subtidal benthic boundary layer of a coastal embayment. *Marine Ecology Progress Series* 177: 51–62.
- Simon, M., H. P. Grossart, B. Schweitzer & H. Ploug, 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology* 28: 175–211.
- Sommaruga, R., 1995. Microbial and classical food webs: A visit to hypertrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology* 17: 257–270.
- Turley, C. M., R. C. Newell & D. B. Robins, 1986. Survival strategies of two small marine ciliates and their role on regulating bacterial community structure under experimental conditions. *Marine Ecology Progress Series* 33: 59–70.
- Velji, M. I. & L. J. Albright, 1993. Improved sample preparation for enumeration of aggregated aquatic substrate bacteria. In Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr & J. J. Cole (eds), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis, 139–142.
- Wainright, S. C., 1987. Stimulation of heterotrophic microplankton production by resuspended marine sediments. *Science* 238: 1710–1711.
- Wainright, S. C., 1990. Sediment-to-water fluxes of particulate material and microbes by resuspension and their contribution to the planktonic food web. *Marine Ecology Progress Series* 52: 271–281.
- Weisse, T. & J. G. Stockner, 1993. Eutrophication: the role of microbial food webs. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia* 52: 133–150.
- Weisse, T., 1991. The microbial food web and its sensitivity to eutrophication and contaminant enrichment: a cross-system overview. *International Review of Hydrobiology* 76: 327–337.
- Weisse, T., 2003. Pelagic microbes—Protozoa and the microbial food web. In O'Sullivan, P. E. & C. S. Reynolds (eds), *The Lakes Handbook*. Blackwell Science Ltd, 417–460.

- Worm, J. & M. Søndergaard, 1998. Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquatic Microbial Ecology* 14: 19–28.
- Worm, J., K. Gustavson, K. Garde, N. H. Borch & M. Søndergaard, 2001. Functional similarity of attached and free-living bacteria during freshwater phytoplankton blooms. *Aquatic Microbial Ecology* 25: 103–111.
- Xie, P. & J. Liu, 2001. Practical success of biomanipulation using filter-feeding fish to control cyanobacteria blooms: a synthesis of decades of research and application in a subtropical hypereutrophic lake. *The Scientific World* 1: 337–356.
- Zhang, Z. S. & Q. F. Huang, 1991. *Methods in Freshwater Plankton Study*. China Science Press, Beijing (in Chinese).

Changes in the fish species composition of all Austrian lakes >50 ha during the last 150 years

D. ZICK & H. GASSNER

Federal Agency of Water Management, Institute of Freshwater Ecology, Fisheries Management and Lake Research, Mondsee, Austria

P. FILZMOSER

Department of Statistics and Probability Theory, Vienna University of Technology, Vienna, Austria

J. WANZENBÖCK, B. PAMMINGER-LAHNSTEINER & G. TISCHLER

Austrian Academy of Science, Institute for Limnology, Mondsee, Austria

Abstract The fish communities of all Austrian natural lakes ($n = 43$) larger than 50 ha in surface area were assessed and the historical fish communities in *c.* 1850 were reconstructed. During the last 150 years, the fish communities of Austrian lakes have altered: in 49% of lakes at least one indigenous fish species, usually sensitive or small-bodied taxa, is now missing. Conversely, in all but one of the 43 lakes the number of fish species has increased. In particular, certain fish species of interest to angling and commercial fisheries now occur in more lakes. Generalised linear models were used to identify variables that would explain the loss of fish species using categories of lake use (ranking score). The category *human population density* around the lakes seemed to be one of the main causes for the loss of fish species.

KEYWORDS: fish communities, human impact, indigenous fish species, loss of fish species, Water Framework Directive.

Introduction

In recent years, increased interest in aquatic ecosystem health has created a need for approaches to assess aquatic ecosystem condition. The European Union Water Framework Directive (EU-WFD) uses the biological elements phytoplankton, macrophytes, benthic invertebrate fauna and fish to assess the status of lakes (EU 2000). To determine ecological condition, knowledge about the near natural state of ecosystems, *i.e.* before human degradation, is important. Unfortunately, lakes with undisturbed, natural fish communities, which can be used as reference, are not available in Austria; anthropogenic impacts over the past 100 years have affected European freshwater ecosystems and cultural eutrophication has caused changes in fish communities. For instance, most Austrian lakes

have undergone cultural eutrophication and more recent re-oligotrophication (Gassner, Jagsch, Zick, Bruscek & Frey 2002). The modification of lake in- and outflows represents another important stressor for aquatic organisms. Many of the Austrian lakes are affected by hydroelectric power plants and exhibit water level fluctuations between 1 m and approximately 15 m.

For centuries most Austrian lakes have been managed for commercial fisheries and angling. Consequently, changes in composition or abundance of fish assemblages not only result from degradation of the environment, but also through fisheries management. Annual stocking programmes and overfishing often resulted in a deterioration of the fish communities. One of the major impacts on aquatic ecosystems is suggested to originate from fish stock enhancement practices

Correspondence: Daniela Zick, Federal Agency of Water Management, Institute of Freshwater Ecology, Fisheries Management and Lake Research, Scharfling 18, A-5310 Mondsee, Austria (e-mail: daniela.zick@baw.at)

(Cowx 1998), particularly species from North America favoured by anglers. To date, 27 species have been intentionally or accidentally introduced in Austria (Miksch 2002). Not all of them are able to reproduce successfully, but many have established in Austrian lakes.

Generally there is an enormous scientific deficit concerning knowledge of fish communities in Austrian lakes. There are valid fish species lists for only two of the nine Austrian provinces: Lower Austria (Kummer 1999) and Carinthia (Honsig-Erlenburg & Petutschnig 2002). However, the fish species of particular lakes (e.g. Lake Constance: Fischer & Eckmann 1997) have been studied and there are several studies on the ecology, biology and management of specific fish species like coregonids *Coregonus* sp. (e.g. Wanzenböck & Jagsch 1998; Wanzenböck, Gassner, Hassan, Lahnsteiner & Hauseder 2002; Gassner, Hassan & Wanzenböck 2004; Lahnsteiner & Wanzenböck 2004) or perch, *Perca fluviatilis* L., but a complete list of fish species for all Austrian lakes is not available.

Unfortunately, no undisturbed large lakes with native fish communities are available in Austria, thus the native fish communities can only be characterised using historical information. Steedman, Whillans, Behm, Bray, Cullis, Holland, Stoddart & White (1996) and Kelso, Steedman & Stoddart (1996) showed that historical information was helpful for the reconstruction of original conditions in the Great Lakes region of North America.

The aim of this study was to assess the present fish communities of all natural Austrian lakes > 50 ha, and to reconstruct the original native fish communities of these lakes, before intensive human interference. These reconstructed historic fish assemblages provide an essential basis for the implementation of the EU-WFD, and knowledge about the historical fish communities is very useful for fisheries management in the future, especially for stocking programmes. The relationship between the loss of fish species and various categories of human impact were also examined.

Materials and methods

Data collection

The native fish species composition of all Austrian natural lakes ($n = 43$) larger than 50 ha in surface area was reconstructed using various historical documents and historical harvest records. Historical data on fish communities were collected from Austrian archives, libraries, an inquiry to fisheries managers and the internet (FishBase; homepages of museums). Further,

the fish collection of the Natural History Museum in Vienna was searched for deposits of fish species from Austrian lakes.

A total of 1161 historical quotations about fishes in Austrian lakes was analysed. The references ranged from monthly historical papers, to books and handwritten documents. In addition, there were 172 historical museum specimens (21 species) verified for 22 different lakes. Most of the historical fish references dated from 1850 to 1900, nevertheless the oldest documents used in this study dated back to the 15th century. For each lake all data collected were summarised as a preliminary fish species list and the native fish communities were reconstructed using six specific criteria (Table 1).

The nomenclature of the Austrian freshwater fishes used in the past was quite different from the current nomenclature according to Spindler (1997). For this reason, historical data were checked for synonyms explained in, for example Fitzinger (1832); Heckel (1854); Heckel & Kner (1858); Henschel (1890) and Kottelat (1997), and they were fitted to the current nomenclature of the Austrian fresh water fishes according to Spindler (1997). Coregonid fishes were named as *Coregonus* sp. for simplification. The results of the reconstruction were expressed as lists of native fish species in c. 1850 for each of the large Austrian lakes.

Table 1. Criteria list for the reconstruction of the native fish species lists (based on the preliminary species lists) in the Austrian lakes

No.	Definition
1.	Alien species were excluded from the preliminary lists of native fish species [i.e. species introduced from abroad, e.g. pumpkinseed, <i>Lepomis gibbosus</i> (L.)]
2.	Translocated fish species were excluded [i.e. species native to another Austrian region, but untypical for the location, e.g. European eel, <i>Anguilla anguilla</i> (L.), or pikeperch, <i>Sander lucioperca</i> (L.), in the Salzkammergut lakes]
3.	In the historical literature running waters fish species, such as brown trout, <i>Salmo trutta</i> f. <i>fario</i> L., grayling, <i>Thymallus thymallus</i> (L.), barbel, <i>Barbus barbus</i> (L.), spirilin, <i>Alburnoides bipunctatus</i> (Bloch), dace, <i>Leuciscus leuciscus</i> (L.), ide, <i>Leuciscus idus</i> (L.) and nase, <i>Chondrostoma nasus</i> (L.) were often described as inhabiting standing waters. Nevertheless these fish species inhabit lakes only for a short period of time and do not live there over their whole life cycle. Thus they were not considered in the present study
4.	Sometimes there was confusions of names; incorrectly named fish species were excluded
5.	A lack of available data resulted in exclusion from the preliminary list of native fish species
6.	In a few unclear cases, the decision about native presence/absence of a fish species was done by expert opinion

The current fish species composition was compiled using an inquiry to the fisheries management committee of the particular lakes and, if available, using recent fishing surveys (e.g. Gassner & Wanzenböck 1999). The questions to the fisheries management committees of the Austrian lakes were: 'What are the contemporary fish species in your lake?'; 'What are the native fish species in your lake?' and 'Is there some recent or historical literature available about your lake?' All but one questionnaire was returned and they contained useful data that could be analysed. The construction procedure of the current fish species lists was similar to the historical fish species lists except point 1 (alien species) and 2 (translocated species) (Table 1). Although an inquiry is recognised as not being an error-free method to assess the current fish assemblages, it provides a first insight to the status of the fish species assemblages in Austria.

Statistical analysis

The goal of the statistical analysis of the data was to understand the relationship between a target variable and the predicting variables. However, because of the categorical or binomial variables, a classical least squares regression approach would not be appropriate because nonlinear relationships and heteroscedasticity would result in a poor model fit. Therefore a more flexible class of models, namely generalised linear models (GLMs), was used (McCulloch & Searle 2001; Simonoff 2003). GLMs allow a unified treatment of statistical methodology for several important classes of models. The binomial model for binomial target variables and the Poisson model for categorical target variables were considered. The analysis was done with the statistics software package R (available at <http://cran.R-project.org>) following the details of Venables & Ripley (1999). To keep the models simple, only main effects models were considered. For the model selection, a stepwise procedure was used where the value of the Akaike Information Criterion (AIC) was minimised. The AIC (Akaike 1974) is a number associated with each model, it is most commonly used for model selection. A measure for the model fit was the residual deviance which measures the discrepancy between observed and fitted values. This measure is approximately chi-squared distributed (with the corresponding residual degrees of freedom), and a chi-squared *P*-value can be computed. If this chi-squared *P*-value is < 5%, the model fit can be considered to be poor.

Chovanec, Fink, Gruber, Jagsch, Nagy, Weber & Wimmer (2002) summarised data about the use of Austrian lakes and their catchment areas. Based on

this information, it was hypothesised that different human activities would impair the fish species assemblages of the lakes, and thus nine predicting variables were defined. Indicators for human stressors were the intensity of tourism, fishery and water removal, and the variables human population density and the amount of soil sealing in the catchment area. In lakes with high values for these typical human stressors more species should be missing than in lakes with, for example, greater areas for agriculture or forest and bushes in their catchments. Furthermore, it was hypothesised that membership of one of the four lake types in Austria based on fish community structure as defined by Gassner, Wanzenböck, Zick, Tischler & Lahnsteiner (2005) would have an impact on the fish assemblages, since each type is managed in completely different ways concerning fisheries, use for leisure activities and hydroelectric power generation. Lake trophy was also selected as a defining variable because this may influence the survival of sensitive, oxygen demanding species. For the calculation of the GLMs, five different target variables were defined relating to missing fish species, varying from binomial data (yes/no) to species categories. It was hypothesised that human stressors (predicting variables) accounted for the loss of fish species. With reference to so-called sentinel species of the fish based Austrian lake types, minnow is missing in some Minnow Lakes. As there were no other sentinel species missing, only the variable of 'is minnow missing' was used for the GLM analyses.

To analyse the impact of intensity of human activity on the fish species inhabiting lakes, the data of Chovanec *et al.* (2002) were adapted and pooled into categories. Afterwards, the different categories of lake use (ranking score, Table 2) were tested for their contribution to the loss of fish species (Table 3). All 43 lakes were used in the analyses, with the exception of 'number of missing species' from which Neusiedlersee was excluded because the extreme value of eight missing species severely affected the model fit.

Results

The present fish communities of the Austrian natural lakes were fundamentally different than the situation approximately 150 years before present. Forty-three fish species (native, translocated and alien species) were recorded as inhabiting the Austrian lakes at present, compared with only 33 fish species historically (three of them are now missing; Fig. 1). Nine of the 13 newly recorded fish species are alien species: North American lake trout, *Salvelinus namaycush* (Walbaum), grass

Table 2. Lake use variables (and categories) used for prediction in the generalised linear models

Category	Definition
1.*	Tourism (=bathing, diving, excursion boating, individual boating, winter sports)
2.*	Fishery (=commercial fishing, angle fishing, fish farming)
3.*	Water removal (=hydroelectric power plants, irrigation, industrial water, fire-water, other water removals)
4.*	Human population density (=settlements, traffic) in the catchment area
5.	Trophy = oligotroph, oligo-mesotroph, meso-eutroph
6.	Fish based lake type = Arctic Char Lake, Minnow Lake, Bleak Lake, Pikeperch Lake (Gassner <i>et al.</i> 2005)
7.	Soil sealing = km ² covered with buildings in the catchment area
8.	Agricultural area = km ² farm land in the catchment area
9.	Forest and bushes = km ² in the catchment area

*The category consists of several subcategories, for each subcategory ranking scores for the degree of utilisation from 0 (none) to 3 (intensive) were used. The sums of the subcategories were used for calculations.

Table 3. Lack of fish species variables (and categories) used as target in the generalised linear models

Category	Definition
1.	Are there any fish species missing: yes/no
2.	Number of missing fish species
3.	Category of missing fish species: no species missing = 0; 1–2 species missing = 1; 3–5 species missing = 2; > 5 species missing = 3
4.	Are there any small-bodied taxa missing: yes/no (i.e. minnow, <i>Phoxinus phoxinus</i> , bullhead, <i>Cottus gobius</i> , stone loach, <i>Barbatula barbatula</i>)
5.	Is minnow missing (type specific fish species for Austrian lakes, Gassner <i>et al.</i> 2005): yes/no

carp, *Ctenopharyngodon idella* Val., stone moroko, *Pseudorasbora parva* Temminck & Schlegel, threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., largemouth bass, *Micropterus salmoides* (Lacepède), bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis* (Val.), silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.), pumpkinseed, *Lepomis gibbosus* (L.) and brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* (Le Sueur). For example, pumpkinseed and grass carp were documented in nine (21%) and silver carp in seven (16%) of the 43 lakes. In addition to the alien fish species, four translocated fish species, prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch), tubenose goby, *Proterorhinus marmoratus* (Pallas), starlet, *Acipenser ruthenus* L. and ziege, *Pelecus cultratus* (L.), were newly documented in Austrian lakes. In all but one of the 43 lakes, the number of fish species increased

(mean: 4.95 added species; min = 0, max = 13). Fish species of interest to angling and commercial fisheries, e.g. European eel, *Anguilla anguilla* (L.), pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), common carp, *Cyprinus carpio* L., catfish, *Silurus glanis* L., whitefish, *Coregonus* sp. and tench, *Tinca tinca* (L.), showed a large increase. Historically, eel inhabited only one lake (2%), but this species is now found in 25 lakes (58%). Pikeperch extended its occurrence from three lakes (7%) to 24 lakes (56%). Some non-commercially-exploited fish species, like rudd, *Scardinius erythrophthalmus* (L.), crucian carp, *Carassius carassius* (L.), ruffe, *Gymnocephalus cernuus* (L.) and perch, *P. fluviatilis* L., also extended their distribution enormously. Most species were added in the lowland lakes, and generally the number of species decreased with increasing altitude (Fig. 2). Large lakes as well as small lakes gained new species (Fig. 3).

Conversely, in 21 of the 43 large Austrian lakes some native fish species were missing. Small-bodied taxa, such as minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.), bullhead, *Cottus gobio* L., or stone loach, *Barbatula barbatula* (L.), could no longer be found in many lakes. Minnow was missing in seven, bullhead in six and stone loach in five Austrian lakes. Furthermore, sensitive species like Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), burbot, *Lota lota* (L.), European lake trout, *Salmo trutta* f. *lacustris* L. and pearlfish, *Rutilus frisii meidingeri* (Heckel), often disappeared. In Neusiedlersee, three native species mudminnow, *Umbra krameri* Walbaum, spined loach, *Cobitis taenia* L., blue bream, *Abramis ballerus* (L.), which originally occurred in this lake only, are now missing. In some lakes even hardy species like pike, *Esox lucius* L., (Haldensee), bream, *Abramis brama* (L.) (Fuschlsee, Haldensee, Vilsalpsee) or white bream, *Abramis bjoerkna* (L.) (Klopeinersee) were missing.

Statistical analysis

For the target variable *fish species are missing*, the model was built with the variables *tourism*, *fishery*, *human population density*, *trophy*, *lake type*, *soil sealing* and *agricultural area* (Table 4). The variables *fishery* and *agricultural area* had significant influence to the target variable *fish species are missing* ($P = 0.05$), whereas the *soil sealing* was significant only at $P = 0.1$. The *number of missing species* was significantly related with the *human population density* around the lake ($P = 0.001$), although the model fit was rather poor (chi-squared P -value: 5.73%). The model fit was better for the *category of missing species*, where the categories *fishery* and *lake type* were determining. The *missing*

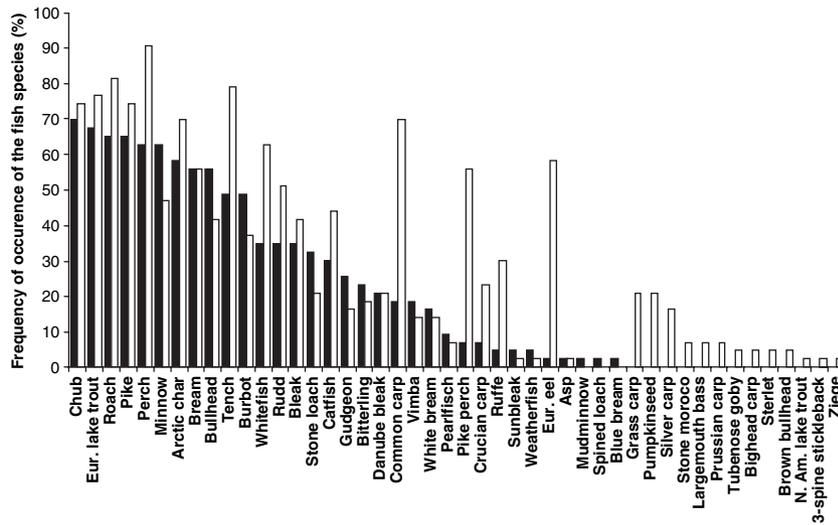


Figure 1. Frequency of occurrence of fish species in all natural Austrian lakes > 50 ha. ■ Reconstructed occurrence, □ current occurrence.

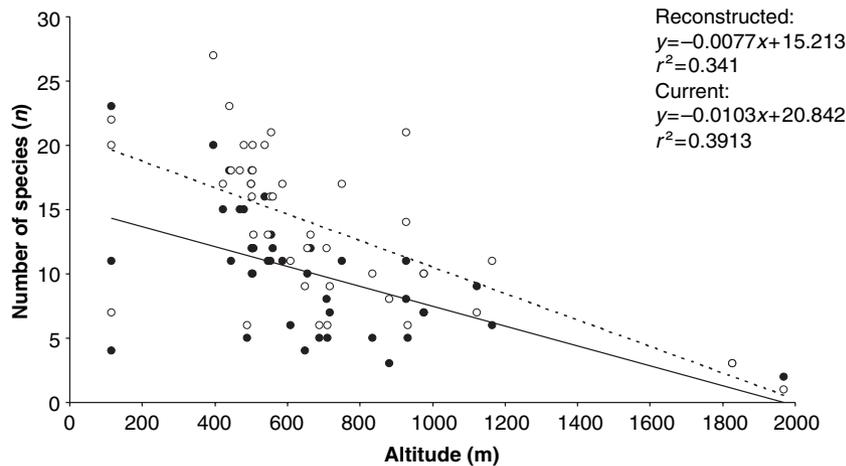


Figure 2. Altitude and number of fish species in natural Austrian lakes > 50 ha. ● Reconstructed number of species, ○ current number of species.

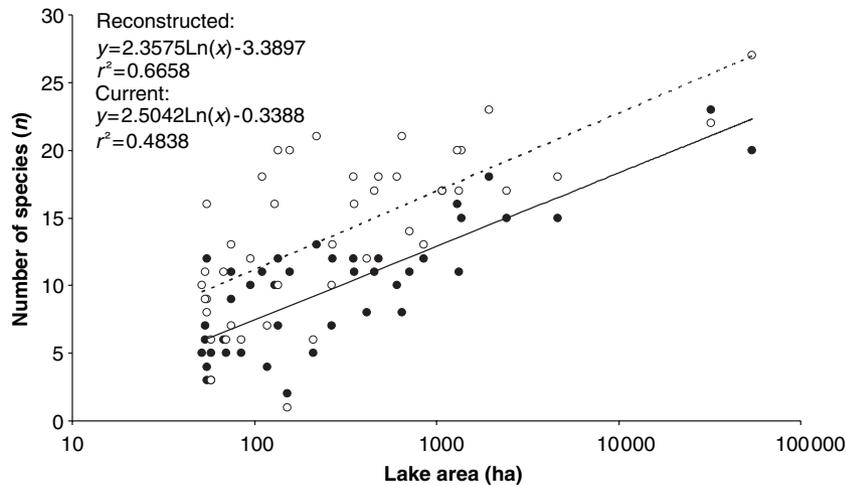


Figure 3. Lake area and number of fish species in natural Austrian lakes > 50 ha. ● Reconstructed number of species, ○ current number of species.

Table 4. Results of the generalised linear model (GLM) analysis. Each column in the box corresponds to a particular GLM. The predicting variables are arranged vertically and the target variables horizontally

	Fish species are missing (yes/no)	Number of missing species‡	Category of missing species	Small-bodied taxa are missing (yes/no)	Minnow is missing (yes/no)
<i>Tourism</i>	yes				*
<i>Fishery</i>	*		†		*
<i>Water removal</i>					*
<i>Human population density</i>	yes	***		†	*
<i>Trophy</i>	yes				
<i>Lake type</i>	yes		†		
<i>Soil sealing</i>	†			*	†
<i>Agricultural area</i>	*			yes	†
<i>Forest and bushes</i>					†
GLM model	Binomial	Poisson	Poisson	Binomial	Binomial
Residual deviance	44.6	55	37.8	48.7	16
Residual degrees of freedom	35	40	40	39	35
Chi-squared <i>P</i> -value	12.85%	5.73%	57.16%	13.66%	99.76%

Empty cell, variable was not selected for the model; yes, variable was selected for the model.

*Significance at level 0.05, **significance at level 0.01, ***significance at level 0.001.

†Significance at level 0.1.

‡Neusiedlersee excluded.

small-bodied taxa seemed to be influenced by *soil sealing* ($P = 0.05$). The target variable *minnow is missing* was connected with most of the tested variables.

Discussion

The species composition of fish communities is an important quality element of the EU-WFD. The objective of the EU-WFD is to prevent the further deterioration of the condition of water bodies, and that all more or less strongly impaired and disturbed water bodies achieve 'good' status by the year 2015. One of the basic components of an assessment of changes in species communities is definition of reference status, which is based on anthropogenically least-disturbed or near natural ecological conditions. Unfortunately, nearly all of the lakes in the alpine and prealpine regions of central Europe are changed by human activities. Thus, it is necessary to use historical data sets for the lake-specific reconstruction of the native fish species for all Austrian lakes > 50 ha. Historical records on fisheries in Austrian lakes date back to the 15th century. Many of these old records were hand-written and therefore very difficult and time consuming to evaluate. Furthermore, in these hand-written documents, it was the commercially important species that were mainly documented. Commercially unimportant species, such as minnow, bullhead and stone loach, were often imprecisely documented (Gassner *et al.* 2005). In many cases different cyprinid species were regularly summarised in a group called "Weißfische"

and juveniles of various species were called "Sängel" (Freudlsperger 1936). Sometimes these facts made it very difficult to identify specific fish species. However, the huge amount of data and the reconstruction procedure gave some confidence in the historical fish species lists. Nevertheless, the application of historical data for the reconstruction of native fish species lists always includes an undefined uncertainty, which is based on the different quality and quantity of historical data. Conversely, if historical data are used carefully they will give very important, and often the only, information about the native fish species composition of lakes (Steedman *et al.* 1996). During the last century the fish communities of the Austrian natural lakes have been fundamentally altered. Human-induced environmental changes in surface waters have led to a loss of indigenous fish species. In 49% of the lakes at least one native fish species was missing. On the other hand, certain fish species of interest to commercial fisheries and angling increased enormously.

On a worldwide scale, the main cause of freshwater fish species decline is various forms of habitat alteration (Harrison & Stiassny 1999). For instance, human-induced nutrient input caused fundamental changes in lake chemistry leading to dissolved oxygen depletion. Evants, Nicholls, Allen & McMurtry (1996) showed that oxygen depletion and associated loss of cold-water habitat severely affected some fish species in Lake Simcoe, where the end-of-summer hypolimnetic dissolved oxygen conditions shifted from sublethal to incipient lethal for North American lake trout,

S. namaycush, and possibly for lake whitefish, *Coregonus clupeaformis* (Mitchill), and lake herring, *Coregonus sardinella* Val. In Austria, hypolimnetic oxygen depletion during the 1970s and 1980s led to the extinction of Arctic char in lakes Irrsee and Mondsee (Jagsch 1987) and to a dramatic break down of the *Coregonus* population in the Trumer Lakes (Moog & Jagsch 1980).

In Austria, 28% of the natural lakes are affected by hydroelectric power plants (Chovanec *et al.* 2002), e.g. Achensee undergoes water level fluctuations of 11 m every year. In such circumstances, juvenile fishes are impaired by the loss of habitat because of massive shoreline degradation. Other impacts of hydraulic engineering result from the establishment of migration barriers that interrupt the river continuum causing breakdown of lake trout population in many lakes. Since 1950 the loss of spawning migrations has nearly led to the extinction of this fish species in Lake Constance (Ruhlé 1996) and in other lakes.

Since 1950, lakes have been used for recreational activities. The impact of tourism could be an important stressor, especially for sensitive and small-bodied taxa. Fishes may be severely disturbed by recreational activities, such as permanent bathing, boating, diving, skating or curling and even lose their habitats or spawning areas.

Strong impacts on aquatic ecosystems were also caused by fisheries management. Fish populations tend to be heavily influenced by direct manipulation of the assemblage through overfishing, removal of unwanted species or addition of desirable species (Cowx 2002). The fish species–lake area relationship deteriorated as a result of the introduction of new fish species ($r^2_{\text{reconstructed}} = 0.67/r^2_{\text{current}} = 0.48$). Introduced species may affect indigenous species by competing for resources, preying on native fauna, transferring pathogens, significantly altering habitat or by genetic deterioration through hybridisation (Cowx 1998). An example of favouring a commercially interesting fish species is the European eel. In Austria, the eel occurred only in Lake Constance (Rhine drainage system), but the species has been introduced into 24 other lakes (Danube drainage system). The presence of this predator could be a serious problem for small-bodied taxa.

Mehner, Diekmann, Brämick & Lemcke (2005) showed that fish community composition in German lakes was mainly determined by abiotic factors, whereas the impact of anthropogenic alterations of shore structure and human-use intensity of lakes were of minor importance. Nevertheless the *number of missing species* was significantly connected to the *human population density* around the lake. Increased

population densities lead to increased human pressure via, e.g. commercial utilisation or recreational activities, that affect the fish communities.

Minnow is a sentinel fish species in Austrian lakes (Gassner *et al.* 2005), consequently, it is important to determine which factors caused the loss of this small-bodied species. The relation with *tourism* and *water removal* seems reasonable, as minnows prefer mainly shallow habitats that are severely influenced by recreational activities and water level fluctuations. *Fishery* may also have an impact, mainly due to species introduction (e.g. European eel as a predator), but generally it is very hard to detect the main stressors for fish species and which human activities or which combination of factors finally lead to species extinction. Although much information about the use of Austrian lakes was available (Chovanec *et al.* 2002), it was not yet possible to identify precisely the main stressors to fish communities using GLM. Nevertheless, there are correlations between the lack of species and human impacts. It is very difficult to interpret the responses of a fish community to a variety of stressors. Kelso *et al.* (1996) assumed, it may be possible to relate unequivocally the effect of a change in a single factor (e.g. temperature) on the well-being of a single fish, but it is another matter to interpret the complex responses of fish communities to a suite of stressors. In many cases pollution, habitat modification and fisheries management, e.g. introduction of alien or translocated species or overfishing, appear to have worked either simultaneously or sequentially to induce the eventual extinction of fish species (Harrison & Stiassny 1999; Cowx 2002), and this may also be true in Austria.

References

- Akaike H. (1974) A new look at statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* **19**, 716–722.
- Chovanec A., Fink M.H., Gruber D., Jagsch A., Nagy M., Weber K. & Wimmer R. (2002) Erhebung und abiotische Typisierung der stehenden Gewässer Österreichs. *Österreichs Fischerei* **55**, 197–207.
- Cowx I.G. (ed.) (1998) *Stocking and Introduction of Fish*. Oxford: Fishing News Books, Blackwell Science, 464 pp.
- Cowx I.G. (2002) Analysis of threats to freshwater fish conservation: past and present challenges. In: M.J. Collares-Pereira, I.G. Cowx & M.M. Coelho (eds) *Conservation of Freshwater Fish: Options for the Future*. Oxford: Fishing News Books, Blackwell Science, pp. 201–220.
- EU (2000) *Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23 October 2000 establishing a frame-*

- work for community action in the field of water policy. Brussels: The European Parliament and the Council of the European Union, 72 pp.
- Evants D.O., Nicholls K.H., Allen Y.C. & McMurtry M.J. (1996) Historical land use, phosphorus loading, and loss of fish habitat in Lake Simcoe, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**(Suppl. 1), 194–218.
- Fischer P. & Eckmann R. (1997) Spatial distribution of littoral fish species in a large European lake, Lake Constance, Germany. *Archiv für Hydrobiologie* **140**, 91–116.
- Fitzinger L.J. (1832) Über die Ausarbeitung einer Fauna des Erzherzogtums Österreich, nebst einer systematischen Aufzählung der in diesem Lande vorkommenden Säugtiere, Reptilien und Fische als Prodrum einer Fauna derselben. *Beiträge zur Landeskunde Österreichs unter der Enns* **1**, 280–341 (In German).
- Freudlsperger H. (1936) Kurze Fischereigeschichte des Erzstiftes Salzburg. 1. Teil. *Mitteilungen der Gesellschaft für Landeskunde* **76**, 81–128 (In German).
- Gassner H. & Wanzenböck J. (1999) Fischökologische Leitbilder fünf ausgewählter Salzkammergutseen. *Limnologia* **29**, 436–448 (In German).
- Gassner H., Jagsch A., Zick D., Bruscek G. & Frey I. (2002) Die Wassergüte ausgewählter Seen des oberösterreichischen und steirischen Salzkammergutes. *Schriftenreihe des BAW* **15**, 1–125 (In German).
- Gassner H., Hassan Y. & Wanzenböck J. (2004) Adaptive management for a whitefish population exclusively exploited by anglers – first results after a test period of four years. *Annales Zoologici Fennici* **41**, 367–373.
- Gassner H., Wanzenböck J., Zick D., Tischler G. & Lahnsteiner B. (2005) Development of a fish based lake typology for natural Austrian Lakes > 50 ha based on the reconstructed historical fish communities. *International Review of Hydrobiology* **90**, 422–432.
- Harrison I.J. & Stiassny M.L.J. (1999) The quiet crisis: a preliminary listing of the freshwater fishes of the world that are extinct or “missing in action”. In: R.D.E. MacPhee (ed.) *Extinctions in Near Time: Causes, Contexts, and Consequences*. New York: Plenum Press, pp. 271–331.
- Heckel A. (1854) Verzeichnis der Fische des Donauebietes in der ganzen Ausdehnung des österreichischen Kaiserstaates. *Verhandlungen der zoologisch –botanischen Gesellschaft in Wien* **2**, 28–33 (In German).
- Heckel J. & Kner R. (1858) *Die Süßwasserfische der Österreichischen Monarchie mit Rücksicht auf die angrenzenden Länder*. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 388 pp (In German).
- Henschel G. (1890) *Unsere Süßwasserfische*. Leipzig und Wien: Verlag Franz Deuticke, 162 pp (In German).
- Honsig-Erlenburg W. & Petutschnig W. (2002) Fische, Neunaugen, Flusskrebse, Großmuscheln. *Sonderreihe des Naturwissenschaftlichen Vereins für Kärnten*. 1–257 (In German).
- Jagsch A. (1987) *Arctic Char in some of the Lakes of the Eastern Alps (Austria)*. Proceedings of the fourth ISACF workshop on Arctic Char. Sweden: Institute for Freshwater Research, Drottningholm, pp. 64–72.
- Kelso J.R.M., Steedman R.J. & Stoddart S.J. (1996) Historical causes of change in Great Lakes fish stocks and the implications for ecosystem rehabilitation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**(Suppl.1), 10–19.
- Kottelat M. (1997) European freshwater fishes. *Biologia Bratislava* **52/5**, 1–271.
- Kummer H. (1999) Der Fischbestand in den niederösterreichischen Voralpenseen. *Jahresbericht der biologischen Station Lunz* **16**, 175–182 (In German).
- Lahnsteiner B. & Wanzenböck J. (2004) Variability in the spatio-temporal distribution of larval European whitefish (*Coregonus lavaretus*, L.) in two Austrian lakes. *Annales Zoologici Fennici* **41**, 75–83.
- McCulloch C.E. & Searle S.R. (2001) *Generalized, Linear, and Mixed Models*. New York: John Wiley and Sons, 325 pp.
- Mehner T., Diekmann M., Brämick U. & Lemcke R. (2005) Composition of fish communities in German lakes as related to lake morphology, trophic state, shore structure and human-use intensity. *Freshwater Biology* **50**, 70–85.
- Mikschi E. (2002) Fische. In: F. Essl & W. Rabitsch (eds) *Neobiota in Österreich*. Wien: Umweltbundesamt, pp. 197–204 (In German).
- Moog O. & Jagsch A. (1980) Zur Erforschungsgeschichte, Fischerei und limnologischen Situation der Salzburger Flachgauseen – Wallersee, Mattsee, Obertrumsee und Grabensee. *Studentische Forschung Salzburg* **1**, 73–103 (In German).
- Ruhlé C. (1996) Decline and conservation of migrating brown trout (*Salmo trutta f. lacustris*) of Lake Constance. In: A. Kirchhofer & D. Hefti (eds) *Conservation of Endangered Fresh Water Fish in Europe*. Basel: Birkhaeuser Verlag, pp. 203–211.
- Simonoff J.S. (2003) *Analyzing Categorical Data*. New York: Springer-Verlag, 486 pp.
- Spindler T. (1997) *Fischfauna in Österreich*. Ökologie-Gefährdung-Bioindikation-Fischerei-Gesetzgebung. Monographien 23. Wien: Bundesministerium für Umwelt, 140 pp (In German).
- Steedman R.J., Whillans T.H., Behm A.P., Bray K.E., Cullis K.I., Holland M.M., Stoddart S.J. & White R.J. (1996) Use of historical information for conservation and restoration of Great Lakes aquatic habitat. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**(Suppl. 1), 415–423.
- Venables W.N. & Ripley B.D. (1999) *Modern Applied Statistics with S-PLUS*, 3rd edn. New York: Springer-Verlag, 501 pp.

- Wanzenböck J. & Jagsch A. (1998) Comparison of larval whitefish densities in lakes with different schemes of larval stocking and fishing practice. *Archiv für Hydrobiologie Special Issues for Advanced Limnology (Biology and Management of Coregonid Fishes)* **50**, 497–505.
- Wanzenböck J., Gassner H., Hassan Y., Lahnsteiner B. & Hauseder G. (2002) Ecology of European whitefish, *Coregonus lavaretus*, in two Austrian lakes in relation to fisheries management and lake productivity. In: I.G. Cowx (ed.) *Management and Ecology of Lake and Reservoir Fisheries*. Oxford: Blackwell Science, pp. 58–69.