

BIOLOGISCHE STATION NEUSIEDLER SEE
BIOLOGISCHES FORSCHUNGSINSTITUT FÜR BURGENLAND

BFB - Bericht 91

A.H. Farnleitner, T.C. Zechmeister & A.K.T. Kirschner

**Vorkommen und Abschätzung des
Botulinum-Neurotoxin-Giftbildungspotenzials
und dessen Zuordnung zu ökologischen
Parametern in den Lacken des
Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel**



Illmitz 2003

ISSN 0257-3105

BIOLOGISCHE STATION NEUSIEDLER SEE

BIOLOGISCHES FORSCHUNGSINSTITUT FÜR BURGENLAND

BFB - Bericht 91

A.H. Farnleitner, T.C. Zechmeister & A.K.T. Kirschner

Vorkommen und Abschätzung des Botulinum-Neurotoxin-Giftbildungspotenzials und dessen Zuordnung zu ökologischen Parametern in den Lacken des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel



Illmitz 2003

ISSN 0257-3105

Eigentümer, Herausgeber, Verleger:
Biologisches Forschungsinstitut Burgenland, A - 7142 Illmitz
Schriftleitung: Univ. Prof. Dr. A. Herzig
Layout: Ing. F. Rauchwarter
Druck: Doncsecs, Pinkafeld
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor.
Für den Inhalt ist der Autor verantwortlich.

BS 
**Biologische Station
Neusiedler See**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Allgemeine Hintergründe zum Auftreten von Vogelbotulismus	4
1.2	Molekularbiologischer Hintergrund BoNt toxischer Clostridien	4
1.3	Vogelbotulismus an den Lacken des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel	5
1.4	Zielsetzung	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Untersuchungsgebiet und Probennahme	7
2.2	Toxikologische Analysen	7
2.3	Ökologische Begleitparameter	9
2.4	Statistische Analysen	10
3	Ergebnisse	10
3.1	In situ BoNt C1 Analyse	10
3.2	BoNt C1 - Toxinbildungspotenzial	12
3.3	In situ BoNt C1 Genfragmentnachweis	13
3.4	In vitro BoNt C1 Genfragmentnachweis nach Kultivierung	14
3.5	Ökologische Begleitparameter	15
4	Diskussion	23
4.1	Die Rolle von Kadaver und Maden als in situ BoNT C1 Toxinquelle	23
4.2	Die Rolle der Sedimente als in situ BoNT C1 Toxinquelle	25
4.3	Die Rolle der Sediment-Wirbellosen als in situ BoNT C1 Toxinquelle	26
4.4	Toxicoinfektion	27
4.5	In vitro BoNT C1 Toxinbildungspotenzial der Sedimente	27
4.6	Verteilung von BoNT C1 Genen in den Sedimenten und Vogelfäkalien	29
4.7	Limnologische Charakteristik der Lacken und ihr Bezug zur BoNT C1 Toxigenese	30
4.8	Modellvorstellung "BoNT Toxigenese und Vogelbotulismus" für den Untersuchungszeitraum 2000/2001	33
4.9	Resultierende Maßnahmen	33
5	Zusammenfassung	34
6	Literatur	37
7	Anhang	39

Vorkommen und Abschätzung des Botulinum-Neurotoxin-Giftbildungspotenzials und dessen Zuordnung zu ökologischen Parametern in den Lacken des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel

A.H. Farnleitner*, T.C. Zechmeister** & A.K.T. Kirschner***

*Institut für Verfahrens-, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9, A-1060 Wien.

**Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.

***Institut für Medizinische Biologie, Arbeitsgruppe Mikrobiologie, Universität Wien, Währingerstraße 10, A-1090 Wien

Kurzfassung: Während der Jahre 2000/2001 wurde eine interdisziplinäre Studie an den Lacken des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel durchgeführt, um die ökotoxikologische Bedeutung potenzieller Botulinum Neurotoxin C1 (BoNt C1) Quellen zu evaluieren, und um den seit zumindest 20 Jahren in fluktuierenden Intervallen auftretenden Vogelbotulismus im Nationalpark mit ökologischen Faktoren in Zusammenhang stellen zu können. Neben toxikologischen und mikrobiologischen Daten (Vorkommen des BoNt C1 Toxins, des BoNt C1 Gens, des BoNt C1 Giftbildungspotenzials bzw. der BoNt C1 toxischen Zellen /Sporen) wurden zahlreiche ökologische Variablen erhoben. Vogelleichen und sich darin entwickelnde Fliegenlarven konnten in diesem Zeitraum als die Haupttoxinquellen geortet werden. Im Sediment lebende Evertebraten und Interstitialwasser hingegen zeigten keine ökologisch relevanten, verfügbaren Konzentrationen an Botulinumtoxin. Der Kontaminationsgrad mit BoNt C1 Clostridienzellen / -sporen in den Sedimenten der untersuchten Lacken war mit 42 % der untersuchten Proben in low risk und 88 % in high risk Habitaten sehr hoch, sodass es beim Vorhandensein geeigneter Wachstumssubstrate (z.B. Vogelleichen) und günstigen Wachstumsbedingungen (z.B. hohe Temperaturen) zu einer raschen BoNt C1 Toxigenese kommen kann. Interessanterweise wurden zwischen Habitaten mit hohem und niedrigem Botulismusrisiko signifikante Unterschiede wichtiger ökologischer Parameter festgestellt, wie Vogelzahlen, sowie pH-Wert, Redoxpotenzial, organischer Gehalt, heterotrophes Bakterienwachstum und Makrozoobenthoszahlen in den Sedimenten der untersuchten Lacken, was von unterschiedlicher indirekter (z.B.: zunehmende Vogeldichte mit zunehmender Futtermittelverfügbarkeit durch höhere Makrozoobenthosdichten) und direkter Bedeutung (z.B.: abnehmende Stabilität von BoNt C1 Toxin bei höheren pH-Werten im Sediment) für Botulismusausbrüche sein kann. Auf der Basis der gesammelten Daten wird ein kausales Erklärungsmodell „Vogelbotulismus an den Lacken in den Jahren 2000/2001“ vorgeschlagen und die Bedeutung des Maden-Kadaverzyklus für einen Ausbruch diskutiert. Allerdings muss betont werden, dass dieses Modell nur mit Vorsicht über diese Periode hinaus extrapoliert werden sollte, da Botulismus ein langfristig fluktuierendes Phänomen darstellt und insbesondere weil die Situation 2000/2001 sich in Bezug auf Artzusammensetzung und Zahlen der Vogelverluste von den Hauptausbruchsjahren deutlich unterschied.

Abstract: During 2000/2001 an interdisciplinary study was performed in order to determine the ecotoxicological significance of suspicious macro- and microenvironments for botulinum neurotoxin C1 (BoNt C1) production in relation to their ecological conditions at various shallow saline pools in the Austrian national park Neusiedler See – Seewinkel. In this area avian botulism has been occurring at fluctuating intervals for at least 20 years. Besides toxicological and microbiological variables concerning avian botulism (i.e. prevalence of BoNt C1 toxin, BoNt C1 gene, BoNt C1 production potential/BoNt C1 toxigenic cells/spores), a variety of environmental parameters were investigated. Avian carcasses and maggots feeding on them could be determined as the major BoNt C1 toxin sources during 2000/2001. In contrast, sediment invertebrates and interstitial water did not show available ecologically relevant toxin concentrations during the considered period. The general contamination of the saline pool sediments with toxigenic BoNt C1 clostridia cells/spores was very high (42 % positive samples in low risk and 88 % in high risk areas). Availability of appropriate growth substrates (e.g. carcasses) and growth conditions (e.g. high temperature) are therefore likely to result in a rapid BoNt C1 toxigenesis in the considered environment. Interestingly, a trend between "high risk" and "low risk" habitats differing in sediment parameters such as pH, pE, organic matter, heterotrophic bacterial growth, and macrozoobenthos abundance could be detected, which may lead to varying indirectly or directly influencing factors of botulism outbreaks such as increasing bird/carcass abundance by improved food availability (i.e. increased macrozoobenthos abundance) or reduced stability of BoNt C1 toxin (e.g. increased sediment pH). Based on the collected data a causal model of "the avian botulism 2000/2001 at the saline pools" is proposed and the importance of the carcass – maggot cycle for an outbreak is discussed. However, it has to be emphasized that this model was developed for 2000/2001 and should be extrapolated only with caution as botulism has proved to be a fluctuating long-term phenomenon and as the situation 2000/2001 differed significantly from the major outbreaks in the past with respect to bird carcass abundance as well as species composition of dying birds.

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Hintergründe zum Auftreten von Vogelbotulismus

Botulismus ist weltweit eine ernstzunehmende Todesursache bei Vögeln (Azuma & Itoh 1987; Gimenez & Ciccarelli 1987; Haagsma 1987a; Harrigan 1987; Smart et al. 1987) und verursacht einen großen, wenn nicht den größten Anteil an krankheitsbedingter Mortalität weltweit. Darüber hinaus kann Botulismus in Vogelschutzgebieten, wie am Beispiel der Lacken des Neusiedler See - Gebietes aufgezeigt, ein potenzielles Artenschutzproblem darstellen (Grüll et al. 1987, und Zitate darin). Weltweit sind seit dem Beginn der ersten Aufzeichnungen dieser Erkrankung viele Millionen Wasservögel getötet worden. Davon waren mindestens 117 Vogelarten aus 22 Familien betroffen (Jensen & Price 1987).

Vogelbotulismus ist nach derzeitigem Stand der Wissenschaft keine Infektionskrankheit, sondern wird durch eine Intoxikation mit von *Clostridium* spp. gebildeten Neurotoxinen ausgelöst. Die Giftbildung erfolgt dabei außerhalb des toxinsensitiven Organismus und wird über die Nahrung bzw. Nahrungskette aufgenommen (Mitchell & Rosendal 1987). Von den bisher 7 bekannten BoNt (Botulismus Neurotoxin) Serotypen (A, B, C1, D, E, F, G) ist vor allem BoNt Serotyp C1 für Vogelbotulismusausbrüche verantwortlich (Popoff 1995), obwohl auch andere BoNt Serotypen die Potenz besitzen (Clark 1987).

Zum Ausbruch einer Epidemie sind nach Mitchell und Rosendal (1987) folgende Voraussetzungen notwendig:

1. eine toxinsensitive Vogelpopulation,
2. lebensfähige BoNt C1 toxische Clostridienstämme,
3. Präsenz von geeigneten Mikro- und Makroumgebungen, die das Wachstum und die Giftbildung ermöglichen und
4. ein Mechanismus, der das Toxin und/oder die Clostridien in den Organismus befördert (z.B. über Nahrungskette).

Während man über das Ausmaß der Betroffenheit der toxinsensitiven Vogelarten (Jensen & Price 1987; Clark, 1987) und auch über die Art und Weise der Intoxikation (Haagsma 1987b; Clark 1987) gute Vorstellungen hat, ist über die Ökologie toxischer Clostridien, das Habitat der Toxigenese und die dafür notwendigen ökosystemaren Voraussetzungen für die Giftbildung wenig bekannt. Im Gegensatz dazu hat man in letzter Zeit, nicht zuletzt wegen ihrer humanpathogenen Relevanz und therapeutischen Anwendungsmöglichkeit (Hatheway 1995; Schantz & Johnson 1992) viel über die Molekularbiologie und Genetik BoNt toxischer Clostridien spp. und ihrer Toxine in Erfahrung gebracht (Moriishi et al. 1996; Minton 1995).

Im Großen und Ganzen gibt es zwei Hypothesen, die die Art und Weise der Giftbildung in natürlichen Gewässern erklären sollen:

1. "Sludgebed Hypothese": Wachstum und Giftbildung der Clostridien erfolgt bei günstigen Bedin-

gungen (Anaerobie, hohe Temperaturen, passende Substratverhältnisse, etc.) im Gewässerboden. Untersuchungen von Grüll et al. (1987) haben gezeigt, dass zu bestimmten Zeitpunkten in einigen Lacken durchaus günstige "toxigene" Wachstumsverhältnisse herrschen (Grüll et al. 1987, und Zitate darin). Interessanterweise war dabei eine Korrelation zwischen Eutrophierungerscheinungen und dem Auftreten von Wasservogel-Botulismus zu bemerken (Grüll et al. 1987, und Zitate darin). Im Gegensatz dazu konnte aber nur relativ selten BoNt C1 direkt aus dem Sediment extrahiert werden (Haagsma 1987b).

2. "Microenvironment-Hypothese": Giftbildung und Wachstum der Clostridien erfolgt mehr oder weniger unabhängig von äußeren Bedingungen innerhalb von Vertebraten und/oder Evertrebraten. Dabei stellen verwesende Wirbeltierkadaver erwiesenermaßen ausgezeichnete Bedingungen für Wachstum und Giftproduktion der Clostridien dar. BoNt Konzentrationen bis zu 10^6 LD₅₀ pro Gramm Tiergewebe wurden detektiert (Haagsma 1987b). Daneben wurde auch BoNt in aquatischen Invertebraten nachgewiesen. Daphnia-Arten enthielten beispielsweise bis zu 64 LD₅₀ Konzentrationen pro Gramm (Haagsma 1987b). Massensterben von Evertrebraten (z.B. Trockenfallen von Sedimenten) könnten so zur potenziellen Intoxikationsquelle für Wasservögel führen. Für die Lacken im Neusiedler See-Gebiet dürfte das jedoch nicht zutreffen, da trockenfallende Sedimente bis zum Absterben der Evertrebraten so ausgetrocknet sind, dass sie für die Nahrungssuche der Vögel uninteressant werden. Zudem sind die kleinen Evertrebratenleichen sehr zerbrechlich und zerfallen rasch (Grüll et al. 1987). Insgesamt deuten die Untersuchungen zwar auf die Richtigkeit der "Microenvironment -Theorie" (Haagsma 1987b), doch gibt es keine schlüssigen Beweise, die eine eindeutige Aussage zuließen. Bedingt durch dieses Wissensdefizit der BoNt C1 Toxigenese stützen sich Präventivmaßnahmen nicht auf kausale, sondern hauptsächlich auf statistische Wahrscheinlichkeitsmodelle (Wobeser 1987). Eine genauere Kenntnis der Ökologie toxischer Clostridien in limnischen Bereichen ist daher von großer Bedeutung für kausale Erklärungsmodelle und damit auch für eine Gefahrengutbeurteilung eines möglichen Botulismusausbruches.

1.2. Molekularbiologischer Hintergrund BoNt toxischer Clostridien

Botulismus Neurotoxin (BoNt) produzierende Clostridien zeigen sehr unterschiedliche bakteriologische Eigenschaften. Ihre Zuordnung zur Species *Clostridium botulinum* aufgrund eines einzigen phänotypischen Merkmales, nämlich der der BoNt Produktion, erscheint nicht mehr haltbar (Hatheway 1990). Darüber hinaus sind die verschiedenen Botulismogene (Serotypen A, B, C1, D, E, F, G) mehr oder weniger instabile phänotypische Eigenschaften und können in unterschiedlichem Maße durch lateralen Gentransfer (Phagen, Plasmide, Transposons) übertragen werden (Popoff 1995,

und Zitate darin). So können z.B. verschiedene nicht pathogene Clostridien Stämme durch Transduktion in BoNt C1 produzierende Stämme konvertiert werden (Eklund et al. 1987). Basierend auf phylogenetischen Eigenschaften (DNA/DNA Hybridisation, 16S rRNA Vergleiche) können vier Gruppen unterschieden werden (I, II, III, IV). Die BoNt C1 produzierenden Stämme gehören hauptsächlich zur biochemisch sehr heterogenen Gruppe III. Sie sind nicht oder nur schwach proteolytisch, fermentieren Glucose, Glycerol, Inositol, Ribose und Xylose. Ihre Zellwand enthält keine Zucker oder nur Spuren von Glucose. Ferner wachsen sie noch bei höheren Temperaturen (einige bis 45°C) als andere BoNt produzierende Clostridien (Smith 1975). Genetisch kann man sie zumindest in zwei Subgruppen aufteilen (Stamm Stockholm und andere *Clostridium botulinum* C-Stämme; zitiert in Popoff 1995).

Das für das BoNt C1 codierende Gen ist auf einem Bakteriophagen (TOX+) lokalisiert und geht meist einen pseudolysogenen Zustand mit der Clostridiumzelle ein. Eklund et al. (1987) konnten in Transduktionsversuchen zeigen, dass es eine Fülle verschiedener lysogener Typen von TOX+-Phagen gibt. Das Spektrum reicht von hoch lytischen bis lysogenen Varianten, wobei diese einer starken Selektion bezüglich ihrer lysogenen Eigenschaften unterworfen sind. Faktoren wie Temperatur, Salzkonzentration, Alkalinität und Interaktionen mit anderen Bakterien beeinflussen diese Bakterien-Phagen Beziehung. Es wird angenommen, dass in der Natur eine Fülle verschiedenster TOX+-Phagen unterschiedlichster Toxizität vorhanden sind, die

durch Übertragung (z.B. Überschwemmungen, Vogelkot) zu sensitiven Clostridien und nachfolgende Transduktion unter günstigen Wachstumsbedingungen Botulismus-Epidemien auslösen können (Eklund et al. 1987).

Clostridien spp. die von einem TOX+ Phagen lysogen konvertiert sind, können das Botulismus Neurotoxin C1 exprimieren. Mittlerweile sind alle DNA Sequenzen der 7 BoNt bekannt (Minton 1995).

1.3. Vogelbotulismus an den Lacken des Nationalparks Neusiedler see - Seewinkel

In Österreich trat Vogelbotulismus gesichert erstmals 1982 und 1983 an den Salzlacken des Seewinkels auf (Grüll 1983). In den Sommermonaten von 1997 ist es zur bisher größten Epidemie im Lackengebiet gekommen, bei der über 5000 Kadaver aufgesammelt wurden (Grüll & Rauer 2000). Betrachtet man die aufgesammelten Kadaver im Lackengebiet des Nationalparks im Zeitverlauf (Abb. 1) so wird deutlich, dass es sich bei den Epidemien um stark zeitlich fluktuierende Ereignisse handelte, d.h. Jahre massiven Vogelsterbens wurden von Jahren mit geringen bis keinen Verlusten gefolgt (z.B. 1982 bis 1987). Das Auftreten von zyklisch-fluktuierenden Botulismusepidemien ist von vielen weltweiten Ereignissen und Gebieten bekannt (Westphal 1991, und Zitate darin) und daher mit der im Nationalpark angetroffenen Situation offensichtlich in Übereinstimmung.

Korrektweise muss bei der überwiegenden Anzahl von den im Nationalparkgebiet eingesammel-

Individuen

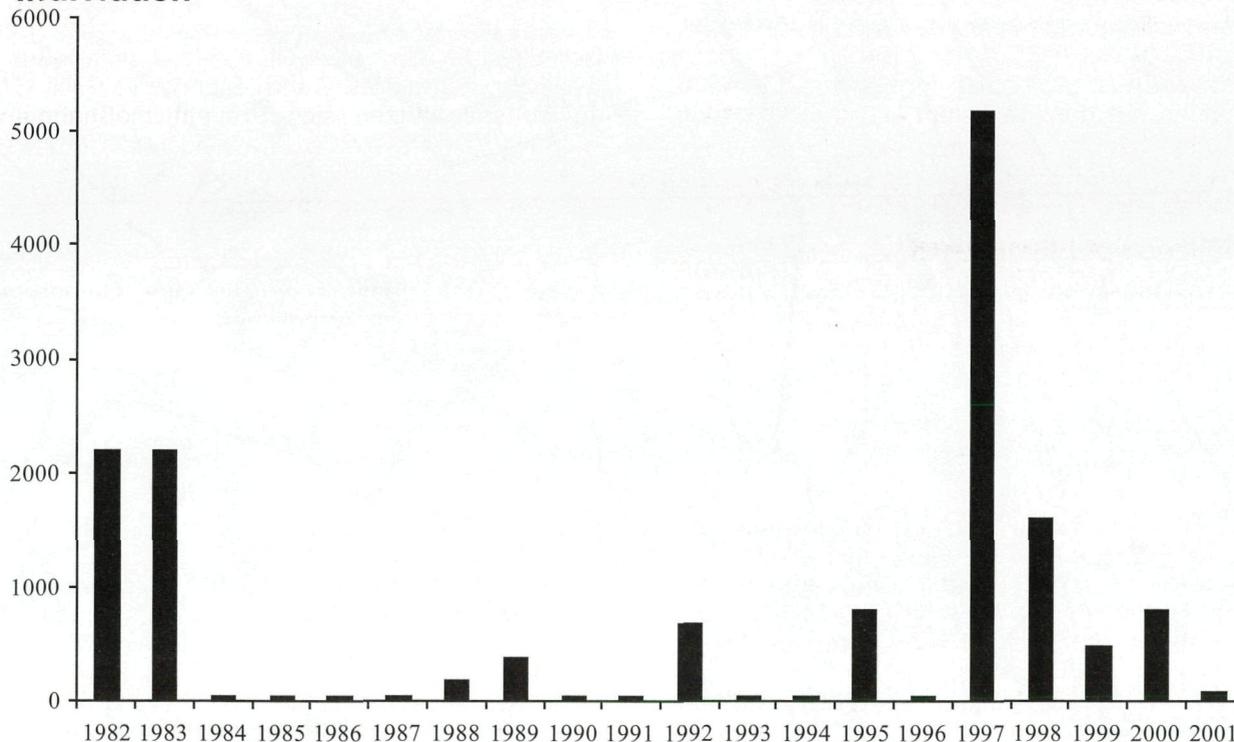


Abb. 1: Registrierte Vogelverluste [Individuen] an den Salzlacken des Nationalparks Neusiedler See – Seewinkel von 1982 bis 2001

ten Vogelkadavern von presumtiven Botulismusergüssen ausgegangen werden, da nur der Serumtest auf BoNT - Gehalt bei noch lebenden oder frischtoten Opfern letztendlich eine Botulismusintoxikation diagnostizieren kann. Dies ist natürlich kaum in der Praxis durchführbar, und eine Untersuchung geeigneter Vögel konnte daher nur bei großen Ausbrüchen an repräsentativen Stichproben durchgeführt werden (z.B. Grill & Rauer 2000). Es ist kaum möglich genügend Serum von schon länger gestorbenen Tieren zu bekommen, und darüber hinaus kann ein positiver BoNT Nachweis in verwesenden Kadavern eine falsche Diagnose ergeben, da BoNT Bildung post mortem im Kadaver stattfinden kann (Westphal 1991).

Insgesamt wurden seit 1982 über 13.000 Kadaver von den Gebietsbetreuern der Nationalparkverwaltung Neusiedler see - Seewinkel im Lackengebiet aufgesammelt (Grüll et al. 2000; Waba V., persönliche Mitteilung). Dabei wurden überwiegend die gut einsehbaren Lackenflächen abgesucht. Die Anzahl der in unzugänglichen Schilfbereichen liegenden Kadaver ist nicht genau bekannt, jedoch zeigte sich bei einer einmaligen raumzeitlich begrenzten Suchaktion, dass der überwiegende Teil der Kadaver in gut einsehbaren Arealen anzutreffen war (Grüll et al. 1987). Die aufgesammelten Kadaver stammten von 61 Vogelarten (Grüll & Rauer 2000). Am stärksten betroffen waren dabei die Stockente mit ca. 31 %, die Krickente mit 21 %, gefolgt von der Lachmöwe mit 12 %, dem Blässhuhn mit 10 % und der Löffelente mit 6 %. Von den restlichen 20 % entfielen

rund 6 % auf weitere Entenarten, 2 % auf Großmöwen und 8 % auf Limikolen. Eine Diskussion der Artenschutzrelevanz von Botulismusepidemien im Lackengebiet des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel wird in Grill & Rauer (2000) gegeben. Abgesehen vom ersten großen Ausbruch 1982 - 1983, wo der Illmitzer Zicksee besonders betroffen war, verlagerte sich das Botulismusergehen in der Folge in das fünf Kilometer entfernte Gebiet der Langen Lacke und der Wörtenlacke (Gebietsübersicht siehe Abb. 2). Dieses Gebiet kann, mit Ausnahme der Rochuslacke 1985, als das Zentrum des Vogelbotulismus an den Lacken des Nationalparks Neusiedler See-Seewinkel angesehen werden. Im Gegensatz dazu waren Lackenbereiche wie Oberstinker und Unterstinker bis heute nicht von Botulismusepidemien betroffen. Der Beginn der Botulismusepidemien lag immer innerhalb der Monate Juni bis September und nach Ende September trat kein Botulismus mehr auf (Grüll & Rauer 2000).

1.4 Zielsetzung

Ausgehend von der Studie "Ökologische Untersuchungen am Wasservogelbotulismus im Seewinkel (Grüll et al. 1987) sollte diese Arbeit erste grundlegende Einblicke in die Sedimentmikrobiologie mit spezieller Bezugnahme auf das BoNT C1 (Botulismus Neurotoxin Serotyp C1) Giftbildungspotenzial sowie das Auftreten von in situ BoNT C1 Toxinen und Genen an ausgewählten Lackenstandorten



Abb. 2: Gebietsübersicht und Probenahmeorte (schwarze Punkte).

und Umweltkompartimenten des Nationalparks gewähren. Als repräsentative Lackenstandorte wurden die Lange Lacke (LL), die Wörtenlacke (WL), die Zicklacke (ZL) und der Ober- (OS) und Unterstinker (US) ausgewählt (Gebietsübersicht siehe Abb. 2). Die Bereiche LL und WL wurden ausgewählt, da sie das derzeitige Zentrum des Botulismugeschehens im Nationalparkgelände darstellen (siehe auch Punkt 1.3). Der Bereich ZL wurde eingebunden, da es hier erstmals 1982 gesichert zu beträchtlichem Vogelbotulismus gekommen ist. Im Gegensatz dazu wurden zusätzlich die Lackenbereiche OS und US ausgewählt, da hier noch keine Epidemien aufgetreten sind. Darüber hinaus wurde eine Stelle in einer Rohrlacke des Neusiedler Sees mituntersucht (siehe Methoden). Aufgrund dieser Standortwahl standen Gebiete zur Verfügung, die historisch gesehen unterschiedlichste Ausbruchsriskiken darstellen (d.h. "High Risk" vs. "Low Risk" Gebiete).

Nach einer Phase der Methodenadaptierung wurden chemophysikalische, limnologische sowie mikrobiell-ökologische Basisdaten erhoben, die in einer Charakterisierung der verschiedenen ausgewählten Lacken und ihrer Sedimente resultierte. Parallel dazu wurde ein räumliches und zeitliches Verteilungsmuster von in situ BoNT C1 Toxinen, BoNT C1 Genen und BoNT C1 Giftpotenzialen erstellt, die eine Zuordnung zu den erhobenen ökologischen Parametern ermöglichte. Aufgrund der erhobenen Daten liegen nun erste grundlegende Einblicke in die komplexen ökologischen Zusammenhänge des Phänomens Vogelbotulismus vor, und es kann ein kausales Erklärungsmodell für den Untersuchungszeitraum 2000 und 2001 erstellt werden (siehe Diskussion). Aufgrund der Ergebnisse wurden weitere Vorgangsweisen sowie grundlegende Managementmaßnahmen zur Reduktion des Ausbruchsriskikos bzw. der Verlustzahlen abgeleitet.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgebiet und Probennahme

Untersuchungsgebiet und -zeitraum: Während der Periode Mai 2000 bis August 2001 wurden im 2 wöchigen (Mai - September) bis 6 wöchigen Abstand (Oktober - April) an den sechs Lackenstandorten Lange Lacke-Sauspitz (LLSS), Lange Lacke-Todesstrand (LLTS), Westliche Wörtenlacke (WL), Illmitzer Zicklacke (ZL), Unterer Stinker (US) und Oberer Stinker (OS), sowie an einem Referenzstandort im Schilfgürtel des Neusiedler Sees nahe der Biologischen Station (BS) Proben genommen (Abb. 2). Insgesamt fanden 23 Probennahmen statt. Die Probenorte repräsentieren eine Auswahl von Standorten mit hohem bis geringem Botulismusrisiko. Lacken mit hohem Risiko (LLSS, LLTS, WL, ZL) waren häufig von Botulismusepidemien betroffen, Lacken mit niedrigem Botulismusrisiko (US, OS, BS) waren bis dato nie von Botulismusepidemien betroffen.

Probennahme: Die Reihenfolge der an einem Tag beprobten Stellen wurde laufend geändert, um im

Mittel den Einfluss tageszeitlicher Schwankungen auszugleichen. Die Probennahme der Probenmaterialien für die Detektion von Botulismus Neurotoxin C1 (BoNT C1) und dem korrespondierenden Gen erfolgte immer auf Höhe der Wasseranschlagslinie, sodass aufgrund der schwankenden Wasserstände die Orte der Probennahmen laufend angepasst werden mussten (Anhang I – V). Alle um die und in den Lacken gefundenen Vogelkadaver wurden auf Larven von Evertrebraten, meist Maden von Schmeißfliegen (Calliphoridae), untersucht. Alle Proben wurden in gekühltem Zustand ins Labor gebracht.

Die Probennahme für die Erhebung der ökologischen Begleitparameter erfolgte von einem am Ufer befindlichen Referenzpunkt aus entlang eines Transektes in Richtung Lackenzentrum. Als Ufer wurde die Wasseranschlagslinie zu Beginn der Untersuchungen definiert. Dieser Zeitpunkt entsprach in allen Lacken den Pegelhöchstständen während der Untersuchungsperiode. Für die Bestimmung der chemophysikalischen Parameter, sowie von Chlorophyll a und Totalphosphor, wurden je Probenstelle drei 1 L Wasserproben in Polyethylenflaschen ohne Aufwirbelung des Sedimentes entlang des Transektes entnommen und in gekühltem Zustand ins Labor gebracht. Für die Bestimmung der mikrobiell ökologischen Parameter wurden 6 Sedimentkerne entlang des Transektes entnommen, sowie 2 Sedimentkerne zur Bestimmung des pH- und Redoxgradienten. Die gekühlt ins Labor gebrachten Sedimentkerne wurden in oxische (oberste 0 - 0,5 cm) und anoxische Sedimentschichten unterteilt (1 - 3 cm) und die Proben der jeweiligen Zonen miteinander vermischt und durch starkes Umrühren mit einem Löffel homogenisiert. Die Aufteilung und Vermischung der anoxischen Proben erfolgte dabei unter Begasung mit einem CO₂/N₂ Gemisch.

2.2 Toxikologische Analysen

Probenmaterialien für direkte (in situ) BoNT C1 Analyse

Evertrebratenlarven von Vogelkadavern: Alle gefundenen Vogelkadaver wurden auf Evertrebratenlarven (weilers als Maden bezeichnet) hin untersucht und diese gegebenenfalls ab einer Mindestgröße von ca. 3 mm gesammelt. Die Maden wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und das durchschnittliche Einzelgewicht ermittelt. Die Proben wurden bei 4° C bis zur Probenaufarbeitung gelagert. Insgesamt wurden 66 Madenproben von Vogelkadavern untersucht, 28 vom Standort LLSS (Westseite), 16 vom Standort LLTS (Nordseite; Anhang I), 18 von der WL (Südseite; Anhang I), je 2 von der ZL (Westseite; Anhang II) und vom US (Westseite; Anhang III). Am OS (Südseite; Anhang IV) sowie im Schilfgürtel bei der BS (Anhang V) konnten keine Vogelkadaver mit Maden geortet werden. Repräsentative Madenproben wurden mit 90 % Ethanol fixiert und dankenswerterweise von Dr. Ruth Contreras-Lichtenberg (Naturhistorisches Museum, Wien) bestimmt. Zusätzlich wurden auch Fischfunde auf Maden hin untersucht (7 Madenproben aus Fischen des US). Die Probenvorbereitung

erfolgte wie bei den Maden der Vogelkadaver.

Interstitialwasser: Interstitialwasser der Lackensedimente wurde aus Sedimentkernen (0 – 10 cm Tiefe), welche im Seichtwasserbereich an 5 Stellen entlang der Wasseranschlagslinie gestochen wurden, nach Zentrifugation mit 1500 x g (10 min, 4 °C) gewonnen. Das Massenverhältnis Interstitialwasser zu Sedimentmasse wurde bestimmt und das Interstitialwasser bei 4 °C bis zur Probenaufarbeitung gelagert. Insgesamt wurden 95 Interstitialwasserproben gewonnen, 19 Proben von LLSS, 9 von LLTS, 17 von der WL, 16 von der ZL, 15 vom US, 19 vom OS, vom Schilfgürtel bei der BS wurden keine Proben analysiert.

Makrozoobenthos: Sedimentmischproben (0 – 2 cm Tiefe) wurden im Seichtwasserbereich entlang der Wasseranschlagslinie an 10 Stellen pro Lackenstandort als Mischprobe gesammelt (2 kg) und das Makrozoobenthos durch einen fraktionierten Schlämmvorgang mit 1 mm und 400 µm Schlämmentzen erhalten. Das Verhältnis Makrozoobenthos-Masse zu Sedimentfrischmasse wurde bestimmt und bei 4 °C bis zur Probenaufarbeitung gelagert. Insgesamt wurden 67 Makrozoobenthosproben gewonnen, davon 13 vom Standort LLSS, 8 vom Standort LLTS, 12 von der WL, 11 von der ZL und dem US sowie 12 vom OS.

Probenmaterialien für die Bestimmung des BoNt C1 Toxinbildungspotenziales sowie BoNt C1 Genanalysen

Lackensedimente: Insgesamt wurden 135 Sedimentproben aus einer Tiefe von 0 - 10 cm als Mischproben von zehn unterschiedlichen Stellen im Ufer- sowie Seichtwasserbereich entlang der Wasseranschlagslinie entnommen. Die Proben wurden bis zur Probenanalyse bei 4 °C gelagert. 23 Proben wurden im Gebiet LLSS, sowie 12 Proben im Bereich LLTS gesammelt. An der WL wurden 20 Proben, an der ZL wurden 21 Mischproben gezogen. Am US und OS wurden 23 bzw. 22 Proben gesammelt, im Bereich BS 14 Sedimentmischproben.

Vogelfäkalien: In einem 100 m² Transektareal nächst der Wasseranschlagslinie wurden insgesamt 96 Mischproben von Vogelfäkalien gesammelt, wobei versucht wurde, das momentan vorhandene Vogelartenspektrum mit besonderer Beachtung des Verhältnisses von Enten, Gänsen, Möwen und Limikolen wiederzugeben. Die Proben wurden bis zur Probenanalyse bei 4 °C gelagert. 19 Proben wurden im Gebiet LLSS, 7 Proben im Bereich LLTS, 10 an der WL, 16 Mischproben an der ZL, 19 am US, 15 am OS und 14 im Bereich BS gesammelt.

Probenaufarbeitung für die in situ BoNt C1 Toxinanalyse

Vorbereitung der Proben: Gewaschene und gewogene Evertibraten von Vogelkadavern (ca. 1 – 2 g) wurden mittels sterilem Mörser und Pistill in definiertem Volumen von Gelatinephosphat-Puffer (0,2 % w/v Gelatine (Merck, Wien, Österreich); 0,4 % w/v Na₂HPO₄ (Sigma, Wien, Österreich); pH 6,2 (eingestellt mit HCl) verrieben und für 12 h bei 4 °C die Proteine durch Diffusion extrahiert. Die Proben wurden daraufhin mit 1000 x g für 5 min zentrifugiert

und der Überstand mittels 0,22 µm Spritzenfilter (Millipore, Wien, Österreich) sterilfiltriert. 2 x 0,5 ml wurden nach Einstellung des pH - Wertes auf 7 - 8 zur Detektion von BoNt C1 - Toxin herangezogen und wie beim Maustest beschrieben appliziert (Hatheway 1988; Ruckdeschel 1992; Haagsma 1987b).

Die Interstitialwasserprobe wurde bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert um Feinsedimente abzuscheiden. Der Überstand wurde mittels 0,22 µm Spritzenfilter (Millipore, Wien, Österreich) sterilfiltriert, in mit siedendem Wasser equilibrierten Dialysehäuschen mit einem Molekulargewichts-Cut-Off von 12.000 Dalton (Roth, Graz, Österreich) abgefüllt und mittels Polyethylenglykol 20.000 (PEG 20.000) (Roth, Graz, Österreich) auf 10 % des ursprünglichen Volumens eingengt. 2 x 0,5 ml des eingengten Interstitialwassers wurden nach Einstellung des pH - Wertes auf 7 – 8 ohne weitere Aufreinigung zur Detektion von BoNt C1 - Toxin herangezogen und wie beim Maustest beschrieben appliziert. Die Probenaufarbeitung der Makrozoobenthos-Proben erfolgte gleich wie die Probenaufarbeitung der Maden.

Toxin-Nachweis mittels Maustest: Für den Maustest (Quodrup & Sudheimer 1949) wurden je 2 x 0,5 ml sterilfiltrierte Proben (Maden-Extrakte, Makrozoobenthos-Extrakte, eingengte Interstitialwasserproben bzw. Kulturüberstände von Sedimenten und Vogelfäkalien) verwendet, wobei eine Probe für 5 min auf 99 °C zur Denaturierung des Toxins erhitzt, anschließend zentrifugiert und sterilfiltriert wurde. Für jeden Test wurden zwei Mäuse herangezogen. Die Kulturüberstände wurden mit je 0,1 ml Hanks Medium (15.000 units Penicillin G, 1.000 units Mycostatin, 5 % Glycerin, 15 mg Streptomycinsulfat, 200 µg Gentamycin, 1 l Hanks balanced salt solution; pH 7,6) vermischt und ca. 30 g schweren White-Swiss-Mäusen (Charles River, Hannover, Deutschland) intraperitoneal appliziert. Die Mäuse wurden 4 Tage beobachtet. Eine Botulismusdiagnose erfolgte, wenn die Maus, die die unveränderte Probe appliziert bekam, starb oder typische Botulismus-Symptome zeigte (Wespentaille, Lidverengung, Fellveränderungen), während die Kontroll-Maus (denaturierte Probe) keine Symptome aufwies. Negativ wurde der Test bewertet, wenn beide Mäuse keine Botulismussymptome aufwiesen. Wurden bei der Kontroll-Maus Symptome beobachtet, wurde der Test wiederholt. Als Kontrolle wurde bei statistisch ausgewählten 10 % der Proben einer dritten Maus BoNt C1 Antitoxin (CDC-Atlanta, USA) 30 min vor der Applikation des Kulturüberstandes verabreicht, um die Spezifität des Toxinnachweises zu verifizieren. In allen Fällen wurde BoNt C1 eindeutig nachgewiesen.

Probenaufarbeitung für die Bestimmung des BoNt C1 Toxinbildungspotenziales

Zur Kultivierung der Sedimentproben und Vogelfäkalien wurden je 0,25 g der gemischten und homogenisierten Sedimentproben bzw. 0,5 g der Vogelfäkalproben in 10 ml anoxischem Cooked Meat Medium, hergestellt aus 1,5 % Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, 0,5 % Kaliumhydrogenphosphat, 0,05 % L-Cystein-HCl, 0,3 % Glukose (alle

Produkte von Merck Wien, Österreich), 1,25 g Cooked Meat (Difco Laboratories, Wien, Österreich), 0,1 ml Vitamin K-Heminlösung (Becton–Dickinson, Wien, Österreich), für 15 min auf 75 °C erhitzt und bei 37 °C für 24 h inkubiert, dann passagiert, wiederum für 15 min auf 75 °C erhitzt und weitere 3 Tage bei 37 °C inkubiert (Jansen 1987, Haagsma 1987b). Die Bakteriensuspension wurde abpipetiert und die Bakterien bei 8000 x g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde mit 0,22 µm Spritzenfilter (Millipore, Wien, Österreich) steriltfiltriert und 2 x 0,5 ml ohne weitere Aufreinigung zur Detektion von BoNt C1 - Toxin mittels Maustest bereitgestellt.

Probenaufarbeitung für BoNt C1 Genanalysen

Probenvorbereitung: Die DNA-Extraktion ohne Kultivierung erfolgte aus je 0,25 g homogenisiertem durchmischtem Sediment oder Vogelfäkalien mittels MOBIO Ultra Clean Soil DNA Kit (Prolabo, MerckEurolab, Paris, Frankreich) nach den Angaben des Herstellers. Die DNA-Extraktion nach Kultivierung erfolgte aus je 1 ml Kulturüberstand und wurde mit InstaGene Matrix (BioRad, Wien, Österreich) nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Die Qualität der isolierten DNA wurde mittels Gelelektrophorese getestet.

Genfragmentnachweis mittels Nested-PCR: Die gewählten Primer (Anhang VI) befinden sich in drei konservierten Regionen der L-Ketten-Region des Toxins Serotyp 468 C1. Für die Initial-PCR wurde das Primerpaar ToxC-625 und ToxC-1049R herangezogen, wodurch ein Fragment mit rund 424 bp amplifiziert wurde, das als Template für den Nested-PCR-Step diente. Für den Nested-PCR-Step wurde das Primerpaar ToxC-625 und ToxC-850R verwendet (Anhang VII; Williamson et al. 1999). Der Reaktionsansatz (100 µl) wurde mit Modifikationen (touch-down-approach, hot-start) nach Williamson et al. (1999) am DNA-Thermocycler PRISMUS 25 (MWG-Biotech, München, Deutschland) durchgeführt (Anhang VIII). Eine Negativ-Kontrolle und eine Positiv-Kontrolle wurde bei jedem Experiment durchgeführt. 10 µl der Amplifikationsprodukte wurden mittels Gel-Elektrophorese mit einem 2 % Agarose-Gel (Gibco – Life Technologies, Wien, Österreich) in 1 x TAE Puffer (Gibco – Life Technologies, Wien, Österreich) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (BioRad, Wien, Österreich) gefärbt und die Amplifikationsprodukte mittels UV-Transilluminator visualisiert.

2.3 Ökologische Begleitparameter

Vogelabundanz: Pro Beprobungstermin und –ort wurde die momentan sichtbare Vogelabundanz mit dem Feldstecher abgeschätzt. Lag die Individuenzahl einer Art unter 20 wurde die genaue Anzahl ermittelt, über 20 Individuen wurde der Wert auf die Zehnerstelle gerundet, ab 200 Individuen wurde auf die nächsten 50 gerundet. Wir waren bestrebt, trotz Sichteinschränkungen (Buchten, Inseln und Schilf-Vegetation) und unterschiedlicher Wasserstände die Abundanzabschätzungen auf Lackenflächen vergleichbarer Größe zu beziehen. Im Gebiet des Schilfgürtels bei der Biologischen Station sind die Abundanzen mit großer Wahrscheinlichkeit

unterschätzt, da hauptsächlich auffliegende und ruhende Vögel registriert werden konnten.

Fäkalexamination (FTX): Pro Beprobungstermin und –ort wurden auf einem 100 m² Streifen (1 m x 100 m) parallel zur Wasseranschlagslinie die Vogelfäkalien gezählt, wobei größere Ansammlungen auf einer Fläche von 10 x 10 cm als 1 Fäkalienfund gewertet wurde. Erfasst wurden Enten-, Gänse-, Limikolen- und Möwen-Fäkalien. Die Menge der gefundenen Fäkalien im Beprobungsstreifen wurde als FTX₁₀₀ bezeichnet. Vergleichbare Abschätzungsmethoden wurden bisher nur in der Wildbiologie beschrieben (Gossow 1999).

Meteorologische Daten: Alle meteorologischen Daten (Windgeschwindigkeit, Lufttemperatur und Regenmengen) wurden von automatischen Messstationen (Biologische Station Neusiedler See, Unterer Stinker, Fuchslochlacke) aufgezeichnet.

Hydrographische Daten – Pegelstände: Pegelstände der Lacken LL, ZL, US und OS wurden dankenswerterweise vom Amt der burgenländischen Landesregierung (Hydrographischer Dienst) zur Verfügung gestellt.

Chemophysikalische Wasserparameter: Wassertemperatur und Leitfähigkeit wurden in-situ mit einer kombinierten WTW Sonde (WTW, LF 330) gemessen. Der pH-Wert wurde in-situ mit einer Seibold GHM Sonde bestimmt. Totalphosphor wurde von der Biologischen Station Illmitz bestimmt.

Chlorophyll a: Die Chlorophyllwerte wurden von der Biologischen Station Illmitz bestimmt.

Fäkalindikatoren: Bestimmungen der Belastung mit Fäkalcoliformen, Fäkalstreptococci und *Escherichia coli* wurden am Institut für Wassergüte des Bundesamtes für Wasserwirtschaft durchgeführt.

Chemophysikalische Sedimentparameter: Um den Trockenmasseanteil und Wassergehalt der Sedimente zu bestimmen, wurde eine bestimmte Menge frisches Sediment (Frischmasse) 3 Tage bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet und danach der Trockenmasseanteil bestimmt. Der Wassergehalt ergab sich aus der Differenz von Frischmasse und Trockenmasse. Der organische Anteil des Sedimentes wurde nach Verbrennung des getrockneten Sedimentes im Muffelofen bei 480 °C für 5 h bestimmt und aus dem Gewichtsverlust der organische Anteil berechnet. Redoxpotenzial und pH Wert wurden mit einer Seibold GHM Sonde entlang eines Tiefenprofils in 0,5 cm - 1 cm Abständen bis zu einer Tiefe von 7 cm in den Sedimentkernen gemessen.

Bakterienzellzahlen im Sediment: Eine bestimmte Menge (1 - 2 g) der oxischen und anoxischen Proben wurden in 50 ml Greiner-Röhrchen eingewogen und mit 34 ml Formaldehydlösung fixiert (Endkonzentration: 4 %). Nach Zugabe von 5 ml NaPP₄ (Endkonzentration: 0,01 M) wurden die Proben mit Ultraschall behandelt (3 x 20 sec; 50 W; Branson Sonifier 450), um die Ablösung der Zellen von den Sedimentpartikeln zu erreichen. 1 ml der behandelten Probe wurde nach entsprechender Verdünnung (50 - 250 x) mit einer 0,01% DAPI-Lösung angefärbt, durch ein 0,2 µm Polycarbonat-Filter (Millipore) filtriert und im Fluoreszenzmikroskop (Leica) untersucht. Die Bakterienzellen wurden im Wellen-

längenbereich von 340 nm - 380 nm angeregt und bei > 430 nm detektiert (Fluoreszenz des DAPI Farbstoffes).

Sedimentbakterien – Zellvolumina und Zellbiomasse: Mit Hilfe einer Okularmikrometerskala wurde das Zellvolumen (V ; μm^3) der Bakterien bestimmt. Die Zellkohlenstoffbiomasse (C ; fg C Zelle^{-1}) wurde dann nach Norland (1993) anhand der Formel $C = 120 \times V^{0.72}$ berechnet.

Bakterielle Sekundärproduktion im Sediment: Für die Produktion der heterotrophen Bakterien im oxischen und anoxischen Sediment wurde die Leucin-Inkorporationsmethode herangezogen (Kirschner & Velimirov 1999). ^{14}C -Leucin (oxische Proben: spezifische Aktivität: $325 \text{ mCi mmol}^{-1}$; ARC International, USA) bzw. ^3H -Leucin (anoxische Proben: spezifische Aktivität: 170 Ci mmol^{-1} ; ARC, USA) mit einer Endkonzentration von $120 \mu\text{M}$ wurden zu $0,20 \text{ g}$ eingewogener Sedimentprobe gegeben, die mit $200 \mu\text{l}$ autoklaviertem durch Zentrifugation gewonnenem Interstitialwasser verdünnt wurden. Für die anoxischen Proben wurde das Interstitialwasser durch Ausblasen mit einem CO_2/N_2 Gemisch von Sauerstoff befreit. Es wurden jeweils 4 Proben und 2 Nullproben, die mit $50 \mu\text{l}$ Formaldehyd (Endkonzentration: 4%) versetzt wurden, pro Lacke und Sedimentschicht verwendet. Die Proben wurden nach 1 Stunde Inkubation bei in-situ Temperatur im Labor fixiert. Bei anoxischen Proben erfolgte die Inkubation in einer Anaerobier-Werkbank (Haereus 2000). Nach Zentrifugation der Proben ($16.000 \times \text{g}$; 10 min) und Entfernen der überschüssigen Radioaktivität durch Abpipettieren des Überstandes wurden die Proteine durch Zugabe von 1 ml einer $0,6 \text{ M NaOH} / 0,1\% \text{ SDS} / 25 \text{ mM EDTA}$ -Lösung 4 Stunden bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie 12 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert. Die Proteine wurden nach Zugabe von $60 \mu\text{l}$ Trichloressigsäure (Endkonz. 5%) und nachfolgender Zentrifugation ($16.000 \times \text{g}$; 10 min) ausgefällt und in $0,2 \text{ ml}$ $0,6 \text{ M NaOH}$ gelöst (1 h ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$). Die gelösten Proteine wurden in 20 ml Szintillationsröhrchen übertragen, mit $5 - 10 \text{ ml}$ Szintillationscocktail versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Ein großer Bereich von Leucinkonzentrationen ($2 - 240 \mu\text{M}$) wurde für oxische und anoxische Proben in je 60 Versuchen getestet, die alle eine Sättigung der Leucin-Aufnahme durch die Bakterien bei $< 120 \mu\text{M}$ ergaben. Die $[^3\text{H}]$ -Leucin Inkorporationsraten wurden nach Simon and Azam (1989) in Kohlenstoffproduktion (BSP) umgerechnet.

Makrozoobenthos: Proben zur Bestimmung der in den Lackensedimenten vorkommenden Makrozoobenthosorganismen wurden 1 x pro Monat genommen. 200 ml der obersten 2 cm der Sedimente wurden mit 10 ml Formaldehyd (Endkonzentration: 2%) fixiert. Die Proben wurden quantitativ unter dem Mikroskop von MMag. Angelika Schellander ausgewertet und die Makrozoobenthosorganismen in taxonomischen Großgruppen ausgezählt. Nematoden wurden nicht berücksichtigt.

2.4 Statistische Analysen

Zur statistischen Analyse diente das Programm SPSS 10 für Macintosh. Zum Vergleich der einzel-

nen Standorte wurde der Kruskal- Wallis Test herangezogen.

3. Ergebnisse

3.1 In situ BoNt C1 Analyse

Vogelkadaver & Maden von Vogelkadavern: Von in den Jahren 2000/2001 im Rahmen des Botulismusprojektes gefundenen 173 Vogelkadavern wurden 50 % am Standort LLSS, 21 % am Standort LLTS, 17 % an der WL, 3 % an der ZL, 5 % am US und 4% am OS gefunden (Abb. 3). Im Schilfgürtel bei der BS wurden keine toten Vögel gefunden. Es soll erwähnt werden, dass Vogelleichen juveniler Vögel (vor allem Lachmöwe und Kiebitz) bei den Daten Berücksichtigung fanden. Von den gesammelten 173 Kadavern waren dabei 69 % Lachmöwen und Mittelmeermöwen, 12 % Limikolen, 7 % Enten, 8 % Gänse sowie 4 % andere Arten (Abb. 4). Die Vergleichszahlen der von den Gebietsbetreuern des Nationalparks im gleichen Zeitraum der Jahre 2000/2001 aufgesammelten Kadaver (insgesamt 572) betragen für die Lachmöwen und Mittelmeermöwen 415 (72%), für die Limikolen 94 (16%), für die Enten 16 (3%), für die Gänse 20 (4%) sowie 5 % für andere Arten (Abb. 4). Somit widerspiegeln die im Rahmen des Botulismusprojektes erfassten Kadaver die relativen Verhältnisse der betroffenen Vogelgruppen. Die dominierende Anzahl an Möwenkadavern steht dabei im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen der Vogelverlustzahlen im Nationalpark Neusiedler See – Seewinkel (siehe Diskussion).

Ein Anteil von 38 % aller im Zuge des Projektes aufgesammelten Kadaver ($n = 66$) enthielten im Verdauungstrakt Maden, wobei vor allem Maden der Fliegenfamilie Calliphoridae (Schmeißfliegen)

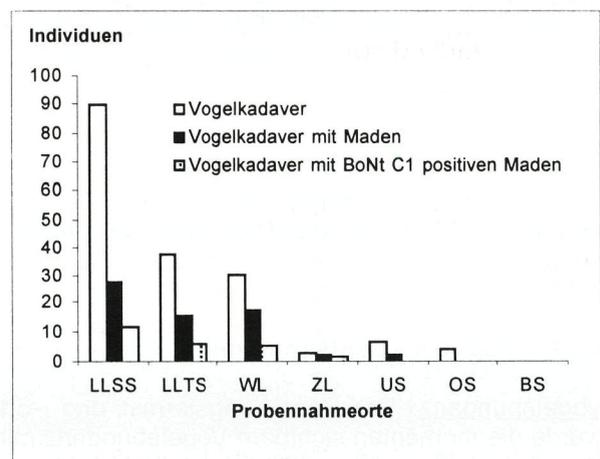


Abb. 3: Summe aller registrierten Vogelkadaver, Summe der registrierten Vogelkadaver mit Maden sowie Summe der registrierten Vogelkadaver mit BoNt C1 - positiven Maden an den entsprechenden Probennahmeorten. LLSS: Lange Lacke Sauspitz; LLTS: Lange Lacke Todesstrand; WL: Wörthenlacke; ZL: Zicklacke; US: Unterer Stinker; OS: Oberer Stinker; BS: Schilfgürtel bei Biologischer Station.

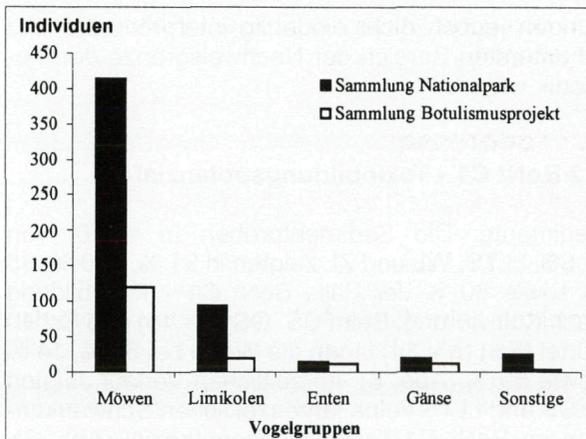


Abb. 4: Durch die Gebietsbetreuer des Nationalparks sowie die im Zuge des Botulismusprojektes gesammelte Kadaver in den Jahren 2000 und 2001

angetroffen wurden (Maden wurden von mehreren repräsentativen Zeitpunkten einer taxonomischen Bestimmung unterzogen). Dabei wiesen im Mittel 36 % aller gefundenen Kadaver mit Madenproben (n = 24) mit dem Maustest eindeutig detektierbare Mengen an BoNT C1 auf. Im Detail enthielten Maden von Kadavern zu 42 %, 38 %, 28 % bzw. 50 % Toxin die am Standort LLSS, LLTS, WL, sowie ZL gefunden wurden.

An den Probennahmeorten wurden in den beiden Untersuchungsjahren 229 Fische gefunden, 210 allein am US nach rapiden Wasserverlusten und einer Hitzewelle im Sommer 2000. Davon wurde ein kleiner Teil (n = 12) der Fischleichen (LLSS, LLTS, WL, US), die Madenbildung aufwiesen, auf Botulismustoxine untersucht. Die Maden der Fische, die vermutlich durch Sauerstoffmangel verendeten, enthielten keine mit dem Maustest detektierbaren Mengen an BoNT A, B, C1, D oder E.

BoNT C1 in den Maden der Vogelleichen konnte im Jahr 2000 von Anfang Juni bis Ende August sowie im Jahr 2001 von Ende Mai bis Anfang August detektiert werden und das Auftreten von BoNT C1 war somit auf die Sommermonate beschränkt (Abb. 5). Im Jahr 2000 waren in der genannten Zeitspanne 37 % aller Madenproben toxin-positiv, im Jahr 2001 waren es 40 %. Funde von Vögeln mit toxischen Maden traten im Jahr 2000 erst 2 – 4 Wochen nach dem ersten Auffinden von toten Vögeln mit Maden auf, wogegen 2001 vom Anfang der Madenbildung an BoNT C1 Toxin detektiert werden konnte (Abb. 5).

Interstitialwasser: In 86 von 101 untersuchten Interstitialwasserproben (85 %) konnte kein BoNT C1 Toxin mit dem Maus-Bioassay detektiert werden (Abb. 6). In den restlichen 15 Proben (15 %) konnte jedoch ein BoNT C1 Toxingehalt mit dem Maus-Bioassay nicht ausgeschlossen werden. Es wurden schwach positive Reaktionen bei den Mäusen festgestellt, die aufgrund der äußerst geringen Intoxikationserscheinungen jedoch nicht eindeutig interpretierbar (schwache botulismusspezifische Symptome wie Lidverengung, struppiges Fell, Appetitlosigkeit, Tod trat jedoch nie auf) und im untersten Bereich der Nachweisgrenze waren. Es soll dabei erwähnt werden, dass das Interstitialwasser dabei um einen Faktor 10 bis 20 mittels Dialyse eingengt wurde um eine Konzentrationssteigerung zu erzielen.

Makrozoobenthos: In 70 von 79 untersuchten Makrozoobenthosproben (89 %), die aus je 2 kg Sediment isoliert wurden, konnte kein BoNT C1 Toxin mit dem Maus-Bioassay detektiert werden (Abb. 7). In den restlichen 9 Proben (11 %) konnte ein BoNT C1 Toxingehalt mit dem Maus-Bioassay nicht ausgeschlossen werden. Es wurden schwach positive Reaktionen bei den Mäusen festgestellt, die aufgrund der äußerst geringen Intoxikationserschei-

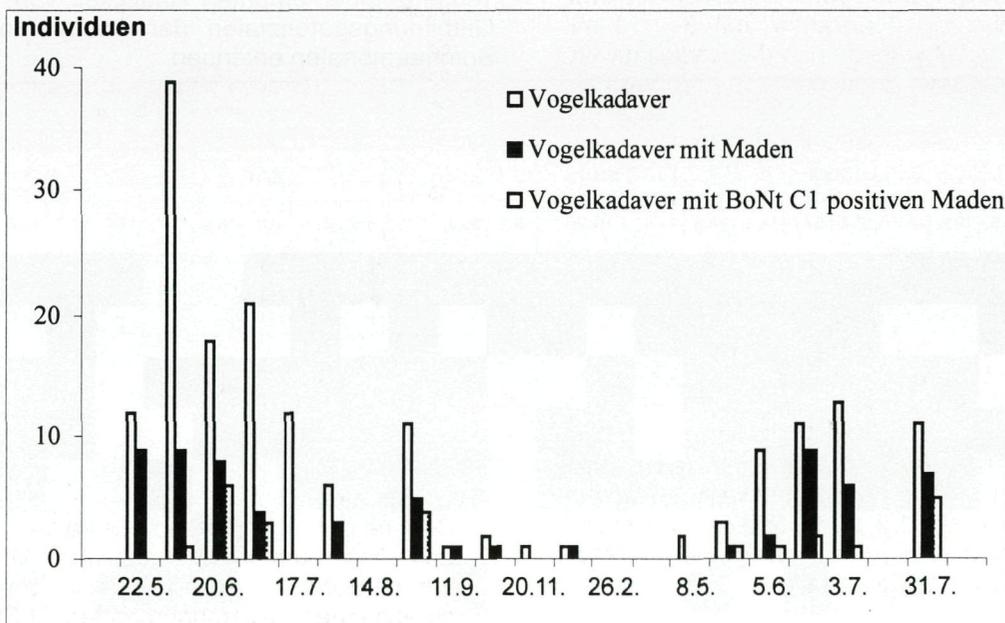


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der im Zuge des Projektes registrierten Vogelkadaver, der registrierten Vogelkadaver mit Maden sowie der registrierten Vogelkadaver mit BoNT C1 – positiven Maden im gesamten Probennahmegebiet.

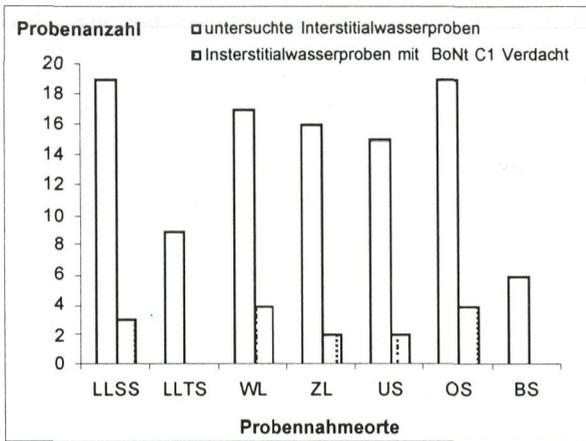


Abb. 6: Gesamtzahl der analysierten Interstitialwasserproben und Interstitialwasserproben mit BoNT C1 Verdacht. Abkürzungen wie in Abb. 3.

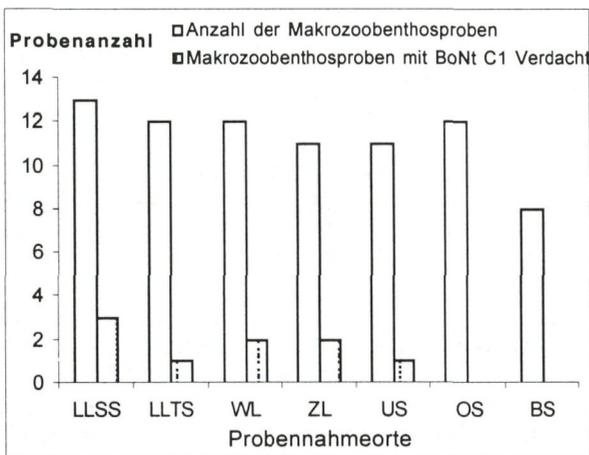


Abb. 7: Gesamtzahl der analysierten Makrozoobenthosproben und Makrozoobenthosproben mit BoNT C1-Verdacht. Abkürzungen wie in Abb. 3.

nungen jedoch nicht eindeutig interpretierbar und im untersten Bereich der Nachweisgrenze der Methodik waren.

3.2 BoNT C1 - Toxinbildungspotenzial

Sedimente: Die Sedimentproben (n = 76) von LLSS, LLTS, WL und ZL zeigten in 91 %, 100 %, 85 % sowie 80 % der Fälle BoNT C1 - Toxinbildung nach Kultivierung. Beim US, OS (n = 45) und Schilfgürtel (BS) (n = 14) lagen die Werte bei 65 %, 14 % sowie 50 % (Abb. 8). Im zeitlichen Verlauf zeigten LLSS und LLTS keine jahreszeitlichen Schwankungen im BoNT C1 Toxinbildungspotenzial (Abb. 8), abgesehen von zwei Hochsommerproben im Jahr 2001 (18. Juni und 3. Juli), wo die LLSS Bucht ausgetrocknet war. Es konnte sonst in jeder Probe ein BoNT C1 Toxinbildungspotenzial nachgewiesen werden. In den Herbst- und Wintermonaten wiesen 3 von 5 Proben der WL kein BoNT C1 Toxinbildungspotenzial auf (Abb. 8). Die Proben der ZL zeigten eine verminderte Häufigkeit von positiven BoNT C1 Toxinbildungspotenzialen im Frühjahr 2000, im Jänner 2001 und kurz vor der Austrocknung der Lacke im Juli 2001 (Abb. 8). Der US bot ein ähnliches Bild, jedoch waren hier mehrere Beprobungstermine mit einer geringeren Häufigkeit von positiven BoNT C1 Toxinbildungspotenzialen im Sommer 2001 zu verzeichnen, die Lacke trocknete nicht aus. Der OS zeigte ein wesentlich anderes Ergebnis, hier konnte ein BoNT C1 Giftbildungspotenzial nur im August 2000 und im Frühsommer 2001 detektiert werden (Abb. 8). Im Schilfgürtel nahe der Biologischen Station konnte ein BoNT C1 Giftbildungspotenzial nur in den Sommermonaten nachgewiesen werden. Weiters liegt ein positiver Befund vom März 2001 vor (Abb. 8), ein vollständiger Jahreszyklus wurde jedoch nicht erhoben. Insgesamt lassen die Daten eine leichte jahreszeitliche Tendenz einer erhöhten Häufigkeit von BoNT C1 Giftbildungspotenzialen der Sedimente in den Sommermonaten erkennen.

	2000										2001								Gesamt						
	8.5.	22.5.	5.6.	19.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	28.8.	11.9.	2.10.	20.11.	8.1.	26.2.	3.4.	8.5.	21.5.	5.6.	18.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	n	+(%)
LLSS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	23	91
LLTS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12	100
WL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	20	85
ZL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	21	81
US	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	23	65
OS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	22	13
BS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	14	50

Abb. 8: BoNT C1 - Giftbildungspotenzial der untersuchten Sedimentproben in den Jahren 2000 und 2001; schwarze Kästchen: positives Giftbildungspotenzial, graue Kästchen: negatives Giftbildungspotenzial, weiße Kästchen: nicht untersucht; n: Anzahl der untersuchten Proben; + (%): Prozentsatz an positiven Proben.

	2000											2001											Gesamt		
	8.5.	22.5.	5.6.	19.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	28.8.	11.9.	2.10.	20.11.	8.1.	26.2.	3.4.	8.5.	21.5.	5.6.	18.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	n	+(%)
LLSS	■		■	■	■	■	■				■	■								■	■	■		19	42
LLTS		■									■													7	14
WL					■	■								■	■								■	16	19
ZL											■			■				■		■			■	10	40
US										■						■				■	■	■	■	19	26
OS								■													■	■	■	15	13
BS				■													■				■	■	■	10	30

Abb. 9: BoNt C1 - Giftbildungspotenzial der untersuchten Vogelfäkalien in den Jahren 2000 und 2001; schwarze Kästchen: positives Giftbildungspotenzial, graue Kästchen: negatives Giftbildungspotenzial, weiße Kästchen: nicht untersucht. n: Anzahl der untersuchten Proben; + (%): Prozentsatz an positiven Proben.

Vogelfäkalien: Die Fäkalproben (n = 52) von LLSS, LLTS und WL zeigten in 42 %, 14 % sowie 40 % der Fälle Toxinbildung. Bei ZL, US, OS (n = 34) und Schilfgürtel (BS) (n = 10) lagen die Werte bei 18 %, 26 %, 13 % sowie 30 % (Abb. 9). Während an den Probenorten LLSS, WL, ZL, US und OS Fäkalien von verschiedensten Vogelarten gefunden wurden, beschränkten sich die Funde am LLTS fast ausschließlich auf Gänse. Im Schilfgürtel (BS) wurden vor allem Fäkalien von Gänsen und Blässhühnern gesammelt. Der jahreszeitliche Verlauf an den Lacken bietet ein uneinheitliches Bild (Abb. 9).

3.3 In situ BoNt C1 Genfragmentnachweis

Sedimente: Die in situ Sedimentprobenanalysen (n = 76) von LLSS, LLTS, WL und ZL erbrachten in 65 %, 58 %, 80 % sowie 71 % der Fälle die Detektion des BoNt C1 Genfragmentes. Beim US, OS (n = 45) und BS (n = 14) lagen die Werte bei 61 %, 50 % sowie 43 %, und somit im Mittel um nur 15 % niedriger als bei den Standorten, wo signifikante historische Vogelbotulismusausbüche bisher zu ver-

zeichnen waren. Dieses Ergebnis lässt auf eine ubiquitäre Verteilung des BoNt C1 - Gens in Sedimenten des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel schließen (Abb. 10). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich, dass bis 17.7.2000 alle Standorte und Proben positive in situ BoNt C1 Genfragment Nachweise erbrachten. Danach kam es zu einer abnehmenden Tendenz der Häufigkeiten an positiven Nachweisen (Abb. 10).

Vogelfäkalien: Die Vogelfäkalien (n = 54) von LLSS, LLTS, WL und ZL erbrachte in 42 %, 50 %, 50 % sowie 40 % der Fälle die Detektion des BoNt C1 Genfragmentes (Abb. 11). Bei US, OS (n = 33) und BS (n = 11) lagen die Werte bei 42 %, 57 % sowie 27 %. Im Mittel konnte in 43 % aller Vogelfäkalproben das BoNt C1 Fragment in situ nachgewiesen werden, wobei im gesamten Beprobungsareal eine ähnliche Verteilung vorherrschte. Im zeitlichen Verlauf zeigten die einzelnen Standorte ähnliche Ergebnisse wie bei den Sedimentproben. Auch bei den Fäkalproben wurden im Jahr 2001 geringere Häufigkeiten an BoNt C1 Genfragmenten detektiert als im Jahr 2000 (Abb. 11).

	2000											2001											Gesamt		
	8.5.	22.5.	5.6.	19.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	28.8.	11.9.	2.10.	20.11.	8.1.	26.2.	3.4.	8.5.	21.5.	5.6.	18.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	n	+(%)
LLSS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	23	65
LLTS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12	58
WL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	20	80
ZL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	21	71
US	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	23	61
OS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	22	50
BS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	14	43

Abb. 10: In situ Nachweis des BoNt C1 - Genfragmentes in den untersuchten Sedimentproben in den Jahren 2000 und 2001; schwarze Kästchen: positiver Genfragmentnachweis, graue Kästchen: negativer Genfragmentnachweis, weiße Kästchen: nicht untersucht; n: Anzahl der untersuchten Proben; + (%): Prozentsatz an positiven Proben.

	2000												2001												Gesamt	
	8.5.	22.5.	5.6.	19.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	28.8.	11.9.	2.10.	20.11.	8.1.	26.2.	3.4.	8.5.	21.5.	5.6.	18.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	n	+(%)	
LLSS																								19	42	
LLTS																								8	50	
WL																								12	50	
ZL																								15	40	
US																								19	42	
OS																								14	57	
BS																								11	27	

Abb. 11: In situ Nachweis des BoNt C1 - Genfragmentes in den untersuchten Vogelfäkalien in den Jahren 2000 und 2001; schwarze Kästchen: positiver Genfragmentnachweis, graue Kästchen: negativer Genfragmentnachweis, weiße Kästchen: nicht untersucht; n: Anzahl der untersuchten Proben; + (%): Prozentsatz an positiven Proben.

3.4 In vitro BoNt C1 Genfragment - Nachweis nach Kultivierung (korrespondierend zu BoNt C1 Giftbildungspotenzial)

Sedimente: Die Sedimentproben (n = 76) von LLSS, LLTS, WL und ZL erbrachten in 87 %, 100 %, 70 % sowie 66 % der Fälle die Detektion des Toxingenes nach Kultivierung. Bei US, OS (n = 46) und BS (n = 14) lagen die Werte bei 87 %, 68 % sowie 64 %, und somit in vergleichbarer Größenordnung wie bei Standorten, wo bis dato signifikante historische Vogelbotulismusausbüche zu verzeichnen waren (Abb. 12). Im Mittel konnte in 77 % aller in Nährmedium angereicherten Sedimentproben (n = 136) das BoNt C1 Genfragment nachgewiesen werden. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich, dass es bei allen Standorten vor allem in den Winter- sowie in den Frühlingsmonaten 2001 in einigen Proben

zu keinem positiven BoNt C1 Gennachweis kam (Abb. 12). Verglichen mit den in situ Nachweisen des BoNt C1 - Gens aller Standorte (Abb. 10) zeigten die BoNt C1 Genfragmentnachweise nach Kultivierung im Mittel eine um ca. 16 % höhere positive Häufigkeit der Detektion.

Vogelfäkalien: Die Fäkalproben (n = 53) von LLSS, LLTS, WL und ZL erbrachten nach Kultivierung in 95 %, 63 %, 82 % sowie 60 % der Fälle die Detektion des BoNt C1 Genfragmentes. Bei US, OS (n = 31) und BS (n = 9) lagen die Werte bei 68 %, 75 % sowie 56 %, und waren somit vergleichbar mit Standorten, wo signifikante historische Vogelbotulismusausbüche zu verzeichnen waren (Abb. 13). Im Mittel konnte in 73 % aller angereicherten Vogelfäkalproben (n = 93) das BoNt C1 Genfragment nachgewiesen werden. Im zeitlichen Verlauf zeigten sich bei LLSS, LLTS sowie WL während der ge-

	2000												2001												Gesamt	
	8.5.	22.5.	5.6.	19.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	28.8.	11.9.	2.10.	20.11.	8.1.	26.2.	3.4.	8.5.	21.5.	5.6.	18.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	n	+(%)	
LLSS																								23	87	
LLTS																								12	100	
WL																								20	70	
ZL																								21	67	
US																								23	87	
OS																								22	68	
BS																								14	64	

Abb. 12: In vitro Nachweis des BoNt C1 - Genfragmentes in den untersuchten Sedimentproben (nach Kultivierung) in den Jahren 2000 und 2001; schwarze Kästchen: positiver Genfragmentnachweis, graue Kästchen: negativer Genfragmentnachweis, weiße Kästchen: nicht untersucht; n: Anzahl der untersuchten Proben; + (%): Prozentsatz an positiven Proben.

samten Probensaison positive Nachweise von BoNtC1 Genfragmenten in kultivierten Fäkalproben. Im Hochwinter und im Mai/Juni konnten jedoch zum Teil keine BoNt C1 Genfragmente detektiert werden (Abb. 13). Bei ZL und US wurden ne-

gative Ergebnisse zu allen Jahreszeiten festgestellt. Für den OS und den Standort BS lässt sich aufgrund der geringen Probenanzahl kein Jahresverlauf ableiten.

	2000											2001											Gesamt		
	8.5.	22.5.	5.6.	19.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	28.8.	11.9.	2.10.	20.11.	8.1.	26.2.	3.4.	8.5.	21.5.	5.6.	18.6.	3.7.	17.7.	31.7.	14.8.	n	+(%)
LLSS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19	95
LLTS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8	62
WL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	11	82
ZL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15	60
US	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19	68
OS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12	75
BS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9	56

Abb. 13: In vitro Nachweis des BoNt C1 - Genfragmentes in den untersuchten Vogelfäkalien (nach Kultivierung) in den Jahren 2000 und 2001; schwarze Kästchen: positiver Genfragmentnachweis, graue Kästchen: negativer Genfragmentnachweis, weiße Kästchen: nicht untersucht; n: Anzahl der untersuchten Proben; + (%): Prozentsatz an positiven Proben.

3.5 Ökologische Begleitparameter

Vogelabundanzen und Fäkalientaxierung (FTX): Aufgrund der Schwankungen der örtlichen Verteilung der Vogelpopulationen an den jeweiligen Lacken wurden die Daten aller 23 Einzelerhebungen aufsummiert. Dabei zeigten sich hoch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gewässern ($\chi^2 = 28,4$; $p < 0,001$). Die höchsten Vogelabundanzen konnten mit 31.600 Individuen (aufsummierte Individuen pro Zählfläche) bei LLTS gesichtet werden, die geringsten Abundanzen an

der BS mit 390 Individuen pro Zählfläche (Abb. 14). Es ist jedoch zu bedenken, dass im Gebiet des Schilfgürtels bei der Biologischen Station die Abundanzen wahrscheinlich unterschätzt sind, da hauptsächlich auffliegende und ruhende Vögel registriert werden konnten. Die FTX-Werte wurden ebenfalls als Summe aller 23 Probennahmen berechnet und schwankten zwischen 225 (BS) und 2715 (LLTS) Fäkalien pro 100 m² (Abb. 14). Eine hoch signifikante Korrelation zur Summe der Vogelabundanzen wurde gefunden ($r = 0,98$; $p < 0,001$; Abb. 15).

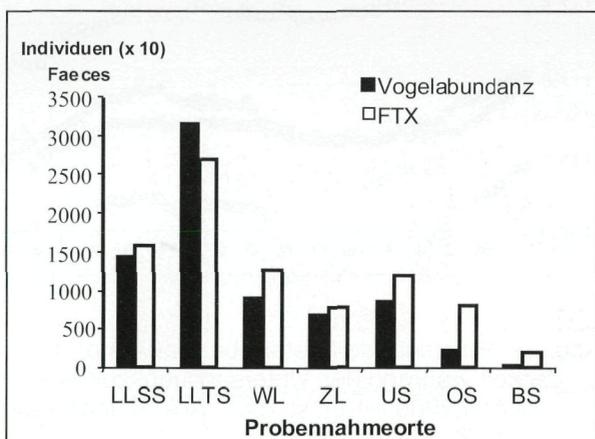


Abb. 14: Summe der Vogelabundanzen (über alle Probennahmen aufsummierte Individuen pro Zählfläche; [10 Individuen]) und Summe an FTX (Fäkalientaxierung; [Faeces 100m⁻²]) an den jeweiligen Probennahmeorten im Jahr 2000 und 2001. Abkürzungen wie in Abb. 3.

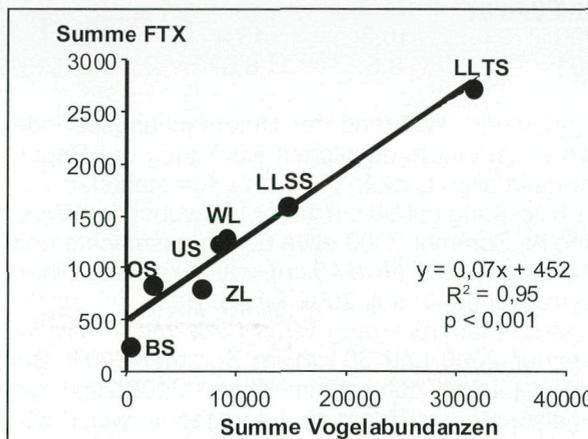


Abb. 15: Regression der Summe der erfassten Vogelabundanzen [aufsummierte Individuen pro Zählfläche] auf Summe FTX [Faeces 100m⁻²] an den einzelnen Probennahmeorten im Jahr 2000 und 2001. Abkürzungen wie in Abb. 3.

Meteorologische Daten: Während der Untersuchungsperiode Mai 2000 bis August 2001 schwankten die Lufttemperaturen zwischen -19,2 und 37,6 °C. Abbildung 16A zeigt die Wochenmittel der Lufttemperaturen vor dem jeweiligen Probenahmetermin, wobei von April bis September Wochenmittel > 15 °C beobachtet wurden. Abbildung 16B zeigt die Niederschlagsmengen, die in der Woche vor dem jeweiligen Probenahmetermin registriert wurden. Deutlich zu erkennen ist, dass im Jahr 2000 der Juli ein relativ feuchter und kalter Monat war mit durchschnittlichen Wochenniederschlagsmengen von 30 mm und einem Wochenmittel-Temperaturrückgang von 6 °C. Im Jahr 2001 hingegen waren bereits ab Mai relativ hohe Wochenniederschlagsmengen > 25 mm zu beobachten und es blieb auch bis Ende Juni mit Wochenmitteln von 17 °C relativ kühl. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Mittelwerte von Temperatur, Windgeschwindigkeiten und Niederschlagssummen während der Monate Mai bis August, in denen auch in den Jahren 2000 und 2001 Botulismusausbürche verzeichnet wurden. Auch dabei wird ersichtlich, dass der Sommer 2001 im Mittel kühler und niederschlagsreicher war als im Jahr 2000. Die Windgeschwindigkeiten waren im Jahr 2001 durchschnittlich um 15 - 30 % höher als im Jahr 2000, was in Hinblick auf die Eiablage auf Vogelkadaver durch Aasfliegen von Bedeutung sein könnte.

Tab.1: 4-Monatsmittelwerte (Temperatur; Wind) und 4-Monatssummen (Niederschlag) für die Monate Mai bis August in den Untersuchungsjahren 2000 und 2001

	Biologische Station	Unterstinker	Fuchsloch-lacke
<u>Temperatur (°C)</u>			
2000	20,2	20,0	20,0
2001	19,8	19,9	19,5
<u>Niederschlag (mm)</u>			
2000	113	160	216
2001	252	190	341
<u>Wind (km/h)</u>			
2000	10,3	13,4	6,9
2001	8,5	8,6	9,9

Pegelstände: Während der Untersuchungsperiode kam es zu einem deutlichen Rückgang der Pegelstände in allen Lacken (Abb. 17). Am stärksten war der Rückgang mit 90 cm in der LL, wobei der Rückgang im Sommer 2000 etwa 60 cm ausmachte und im Sommer 2001 etwa 45 cm, was zu einer völligen Austrocknung im Juli 2001 führte. Bei den OS machte der Gesamtrückgang 60 cm aus mit 45 cm im Sommer 2000 und 30 cm im Sommer 2001. Bei beiden Lacken nahmen im Winter 2000/2001 die Pegelstände um 15 cm zu. Interessanterweise war der US wesentlich begünstigt und der gesamte Wasserverlust von 35 cm im Sommer 2000 wurde während des Winters wieder ersetzt. Da bei der ZL die Daten nur unvollständig vorliegen, kann der Rückgang im Sommer 2000 auf mindestens 35 cm geschätzt werden, wobei zu erwähnen ist, dass die ZL im September 2000 und Juli 2001 vollständig ausgetrocknet war.

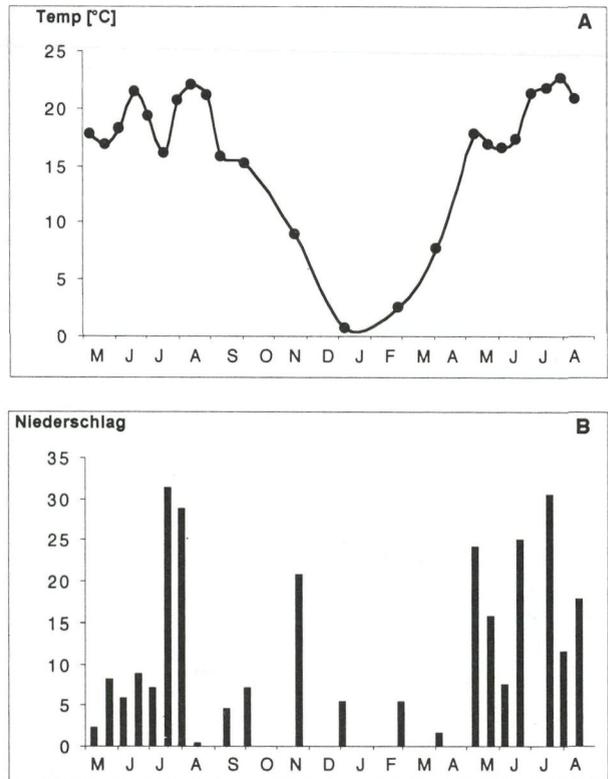


Abb. 16: Wochenmittel der Lufttemperaturen [°C] vor dem jeweiligen Probenahmetermin (A) sowie Niederschlagsmengen [mm], die in der Woche vor dem jeweiligen Probenahmetermin registriert wurden (B) während des Untersuchungszeitraumes Mai 2000 - August 2001

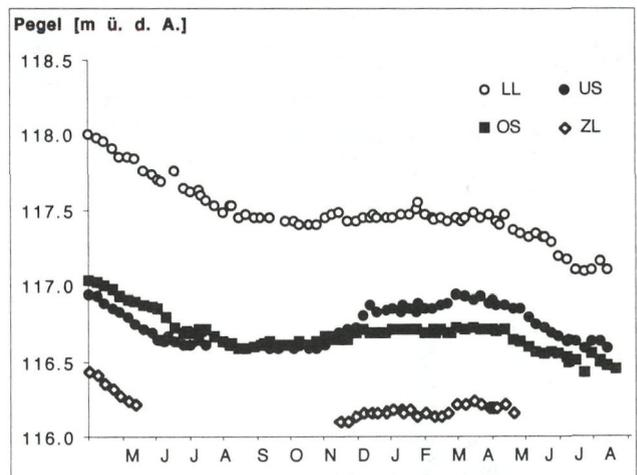


Abb. 17: Pegelstände [Meter über der Adria] der Lacken während des Untersuchungszeitraumes Mai 2000 - August 2001; Abkürzungen wie in Abb. 3.

Chemophysikalische Wasserparameter: Da die Probenahme aufgrund der Vielzahl der erhobenen Parameter jeweils einen ganzen Tag in Anspruch nahm, sind die Unterschiede der Wassertemperaturen zwischen den Lacken an den einzelnen Terminen auf die unterschiedlichen Entnahmezeit-

punkte während des Tages zurückzuführen. Die höchste gemessene Temperatur von 35,4 °C wurde dabei im August 2001 an der ZL registriert (Abb. 18A). Werte bis zu 35 °C wurden aber auch im Jahr 2000 erreicht. Da die Leitfähigkeits- und pH- Werte temperaturkompensiert auf 25 °C angegeben wurden, sind die jahreszeitlichen Schwankungen nicht durch die temperaturbedingte Tagesrhythmik überlagert. Die Leitfähigkeit zeigte hoch signifikante Unterschiede zwischen den Lacken ($\chi^2 = 40,4$; $p < 0,001$) und war im Mittel (Median: 10,6 mS cm⁻¹) bei OS und ZL am höchsten, wobei die höchsten Werte im Jahr 2000 mit 30,3 mS cm⁻¹ an der ZL gemessen wurden, und im Jahr 2001 mit 39 mS cm⁻¹ am OS (Abb. 18B). In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass der höchste im Rahmen der Studie gemessene Wert bei 62 mS cm⁻¹ lag (OS), der am Vorabend des Probennahmetermines am 17. Juli, 2001, 2 Stunden vor einem Schlechtwet-

tereinbruch mit heftigen Regenfällen registriert wurde. Ebenfalls hohe Leitfähigkeitswerte bis 29 mS cm⁻¹ wurden im Jahr 2001 in der WL registriert, während die Werte in den anderen Lacken (US, LL) sowie an der Referenzstelle Biologische Station (BS) deutlich niedriger lagen. Die Lange Lacke erreichte nur kurz vor ihrer Austrocknung im August 2001 Werte > 10 mS cm⁻¹, der Unterstinker nur im Juni 2000, als der südliche Teil dieser Lacke austrocknete. Die pH-Werte schwankten in den 5 Lacken (Abb. 18C) zwischen 8,9 (WL) und 10,9 (ZL), während an der BS im Mittel nur Werte von 8,7 gemessen wurden. Die Unterschiede zwischen den Lacken waren hoch signifikant ($\chi^2 = 48,6$; $p < 0,001$). Die höchsten Werte hatten im Mittel die ZL (9,9) und der OS (9,8), die niedrigsten Werte die WL (9,3). Lange Lacke und Unterstinker wiesen im Mittel Werte von 9,5 auf. Ein deutliches jahreszeitliches Verlaufsmuster konnte nicht festgestellt werden.

Die Totalphosphorwerte (Abb.19A) erreichten extrem hohe Konzentrationen von bis zu 11700 µg P L⁻¹ (OS). Signifikante Unterschiede ($\chi^2 = 31,3$; $p < 0,001$) wurden zwischen den Lacken beobachtet, wobei der OS mit einem Median von 3360 µg P L⁻¹ (n = 21) die deutlich höchsten Konzentrationen aufwies, US, LL und WL folgten mit Medianen von 1200 - 1300 µg P L⁻¹ (n = 21), die Zicklacke hingegen zeigte mit einem Median von 480 µg P L⁻¹ (n = 21) die geringsten Konzentrationen der 5 Lacken. Noch geringere Konzentrationen mit einem Median von 290 µg P L⁻¹ (n = 18) wurden im Schilfgürtel bei der BS beobachtet. Im Jahresverlauf war in beiden Jahren ein deutlicher Anstieg im Sommer zu beobachten.

Die Chlorophyllwerte zeigten deutliche Schwankungen während des Jahres mit hohen Werten während der Vegetationsperiode und geringeren Werten im Winter. Im Jahr 2001 war in der LL eine massive Algenblüte zu beobachten, was sich in Chlorophyll a Konzentrationen von bis zu 1720 µg L⁻¹ Anfang August manifestierte (Abb. 19B). Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die extreme Dynamik, der die Organismen in den Lacken unterliegen. Ende Juli wurde im Ostteil der LL bei völliger Windstille ein Chlorophyll Wert von 3 µg L⁻¹ registriert und bereits 2 Wochen danach der Maximalwert von 1720 µg L⁻¹. Auch US und WL erreichten die Konzentrationen über 300 µg L⁻¹, während im OS die Chlorophyll-Konzentrationen mit maximal 133 µg L⁻¹ angesichts der extrem hohen Cyanobakteriendichten von bis zu 1000 x 10⁹ L⁻¹ (Daten nicht gezeigt; Kirschner, Eiler, Zechmeister et al. 2002) erstaunlich gering waren. Die mit Abstand geringsten Chlorophyll Konzentrationen wurden an der ZL beobachtet, was auf die Stabilisierung des Sedimentes durch den dicken Biofilm am Gewässerboden verursacht wurde. Die Unterschiede zwischen den Lacken waren statistisch hoch signifikant ($\chi^2 = 39,0$; $p < 0,001$).

Bakterielle Fäkalindikatoren: Anhand der Fäkalindikatoren wurde versucht, den Fäkaleintrag der Vögel in die verschiedenen untersuchten Gewässer abzuschätzen. Es zeigte sich, dass am Standort LLTS die höchsten Vogelzahlen (Summe der beobachteten Vögel während des Untersuchungszeit-

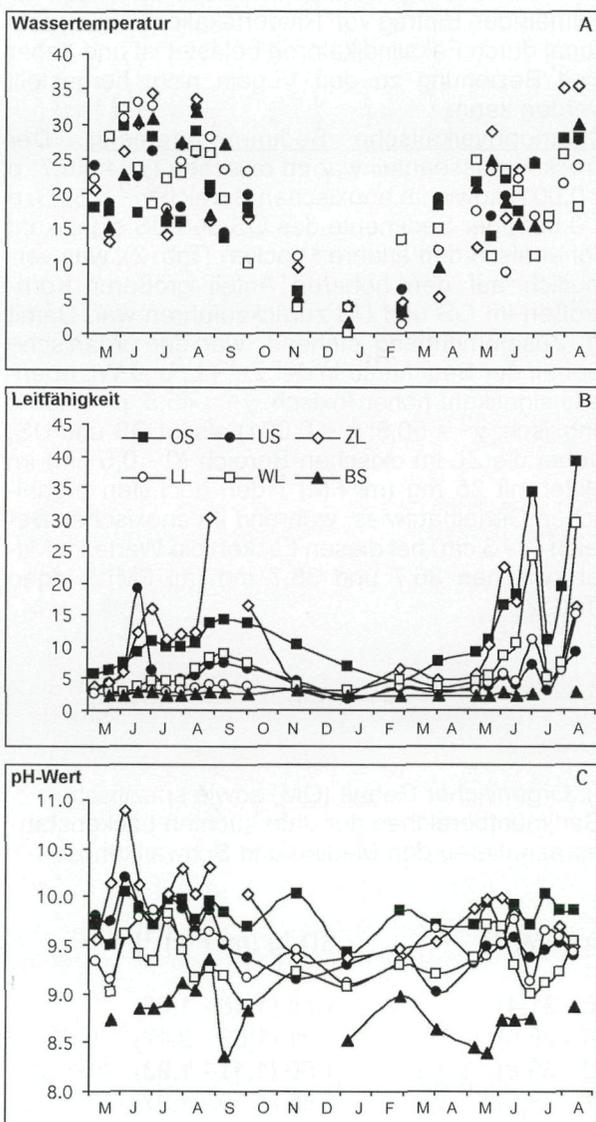


Abb. 18: Wassertemperatur [°C], Leitfähigkeit [mS cm⁻¹] und pH-Wert in den 5 untersuchten Lacken und im Schilfgürtel des Neusiedler Sees (BS) während des Untersuchungszeitraumes Mai 2000 - Aug. 2001; Abkürzungen wie in Abb. 3.

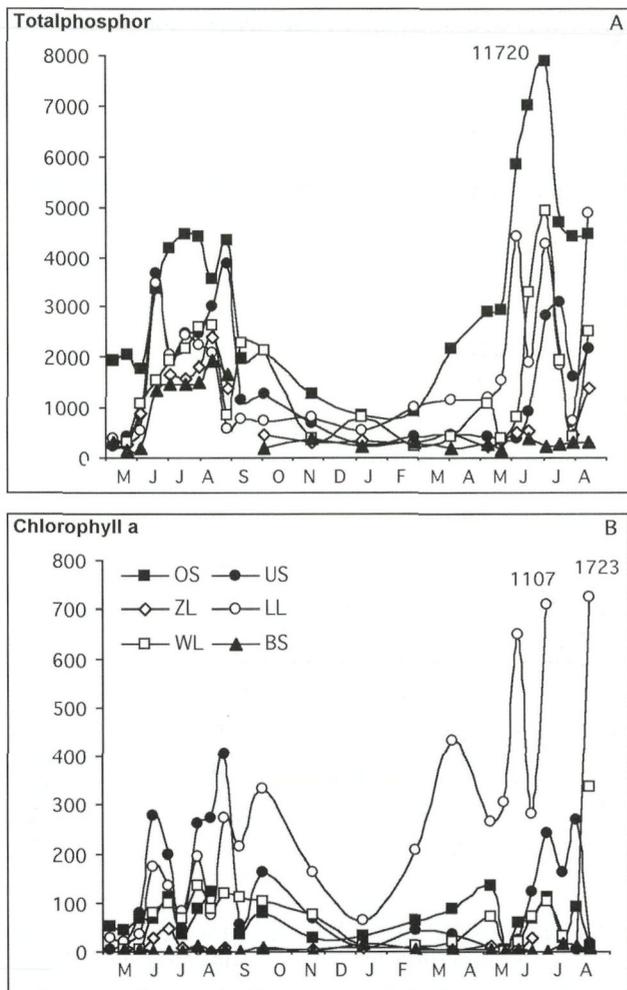


Abb.19: Totalphosphor [$\mu\text{gP L}^{-1}$] und Chlorophyll a Werte [$\mu\text{g L}^{-1}$] der 5 untersuchten Lacken und im Schilfgürtel des Neusiedler Sees (BS) während des Untersuchungszeitraumes Mai 2000 - Aug. 2001; Abkürzungen wie in Abb. 3.

raumes; vgl. Abb. 14) als auch der höchste Fäkalieninput (FTX; vgl. Abb. 14) beobachtet wurden, die niedrigsten Werte wurden am Standort BS beobachtet. Die Mittelwerte der Fäkalstreptokokken (FS) wiesen sowohl mit dem FTX als auch mit den Vogelabundanz eine hoch signifikante positive Korrelation auf und bestätigen die Validität der Vogelabundanz- und FTX-Bestimmungen (Abb. 20). Auch für die Fäkalcoliformen (FC) und *Escherichia coli* Bakterien (EC) wurde ein Ansteigen mit steigender Vogelabundanz und FTX beobachtet, die Beziehung war aber nicht linear und im unteren Bereich der Skala (FTX und Vogelabundanz > 1000) waren die Unterschiede dieser Indikatoren nicht hoch genug. Die Lücken stellen also mit Jahresmedienen für die Fäkalstreptokokken zwischen 5 und 27 KBE ml^{-1} sehr stark fäkal belastete Ökosysteme dar. Es sei noch erwähnt, dass in diesen Korrelationsgraphiken die westliche Wörtenlacke nicht miteinbezogen wurde, da diese durch den regelmäßigen Eintrag von Rinderfäkalien überproportional durch Fäkalindikatoren belastet ist und daher eine Beziehung zu den Vögeln nicht hergestellt werden kann.

Chemophysikalische Sedimentparameter: Der Trockenmasseanteil war im oxischen ($\chi^2 = 45,7$; $p < 0,001$) sowie im anoxischen Bereich ($\chi^2 = 56,3$; $p < 0,001$) der Sedimente des OS und US signifikant höher als in den anderen Lacken (Tab. 2), was vermutlich auf den höheren Anteil größerer Korngrößen im OS und US zurückzuführen war. Damit im Zusammenhang stehend, war der organische Gehalt der Sedimente in der ZL, LL, und WL ebenfalls signifikant höher (oxisch: $\chi^2 = 45,5$; $p < 0,001$; anoxisch: $\chi^2 = 50,8$; $p < 0,001$) als im OS und US, wobei die ZL im oxischen Bereich (0 - 0,5 cm) im Mittel mit $35 \text{ mg (ml FM)}^{-1}$ den höchsten organischen Gehalt aufwies, während im anoxischen Bereich (1 - 3 cm) bei diesen Lacken die Werte im Mittel zwischen $36,7$ und $38,7 \text{ mg (ml FM)}^{-1}$ lagen (Tab. 2).

Tab. 2: Trockenmasseanteil (TM) an der Frischmasse (FM), Organischer Gehalt (OM) sowie spezifische Sedimentdichte (SD) in den oxischen und anoxischen Sedimentbereichen der untersuchten Lackenstandorte während der Untersuchungsperiode. Die Werte repräsentieren den Median und Schwankungsbereich ($n = 21$)

		TM [% FM]	OM [mg (ml FM) $^{-1}$]	SD [g (ml FM) $^{-1}$]
OS	oxisch	71,2 (46,3 - 74,8)	16,7 (12,6 - 31,4)	1,78 (1,48 - 1,96)
	anoxisch	78,6 (72,3 - 80,4)	18,6 (10,0 - 28,8)	1,91 (1,63 - 2,17)
US	oxisch	61,2 (17,9 - 73,9)	19,7 (9,2 - 39,8)	1,50 (1,11 - 1,93)
	anoxisch	73,9 (40,8 - 86,1)	11,6 (8,7 - 38,5)	1,85 (1,30 - 1,97)
ZL	oxisch	39,9 (26,1 - 71,2)	35,0 (20,0 - 51,9)	1,32 (1,07 - 1,61)
	anoxisch	68,7 (42,9 - 80,9)	37,1 (12,5 - 54,2)	1,65 (1,28 - 1,76)
LL	oxisch	37,6 (22,5 - 56,2)	25,8 (16,2 - 47,5)	1,26 (1,16 - 1,54)
	anoxisch	54,4 (39,2 - 74,4)	38,7 (16,8 - 69,0)	1,48 (1,28 - 1,88)
WL	oxisch	45,8 (33,2 - 68,3)	26,1 (21,0 - 48,4)	1,34 (1,25 - 1,60)
	anoxisch	66,7 (51,1 - 75,7)	36,7 (19,8 - 49,1)	1,62 (1,43 - 1,86)

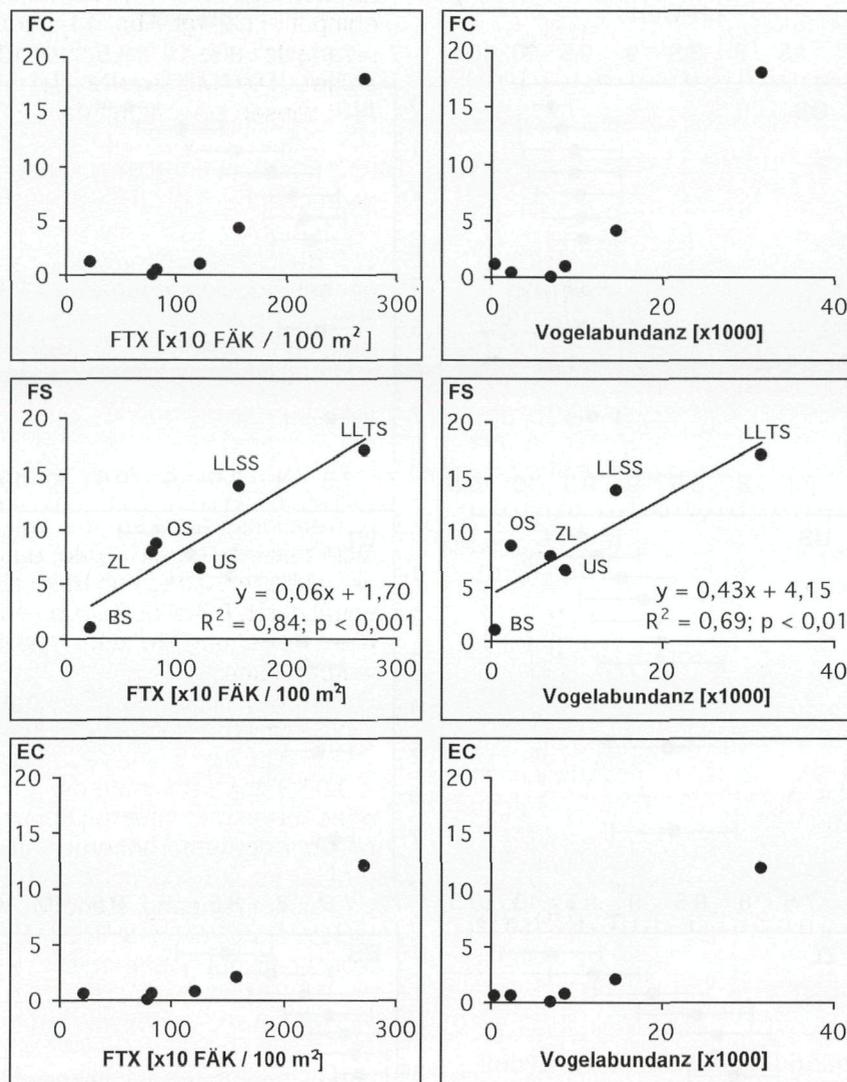


Abb. 20: Beziehungen zwischen den aufsummierten FTX-Werten und Vogelabundanz (Individuen pro Zählfläche; $n = 23$) zu den Mittelwerten ($n = 12$) der untersuchten Fäkalindikatoren [KBE ml⁻¹] FC (Fäkalcoliforme), FS (Fäkalstreptokokken) sowie EC (*Escherichia coli*) an den jeweiligen Probenstandorten. Abkürzungen wie in Abb. 3.

Wie in Abbildung 21 ersichtlich, wiesen die pH-Profile signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Probenorten auf (oxisch: $\chi^2 = 53,0$; $p < 0,001$; anoxisch: $\chi^2 = 66,5$; $p < 0,001$). Besonders auffällig war der geringe Rückgang des pH-Wertes im OS, der auch in 7 cm Tiefe im Mittel immer noch 9.3 betrug. Beim US sanken die pH-Werte im Mittel nicht unter 8.6, während in der LL, WL und ZL bereits in 1.5 cm Tiefe im Mittel Werte unter 8.5 beobachtet wurden. Die Sediment pH-Werte am Standort BS lagen deutlich unter denen des OS und US. Auch bei den Redoxprofilen waren ähnlich signifikante Unterschiede (oxisch: $\chi^2 = 34,5$; $p < 0,001$; anoxisch: $\chi^2 = 35,1$; $p < 0,001$) zu beobachten (Abb. 22). Beim OS war die Abnahme des Redoxpotenzials mit der Tiefe nur gering und die Werte lagen im Mittel auch in 7 cm Tiefe nie unter 280 mV. An LL, WL sowie am Standort BS wurden ab 1.5 cm Tiefe Werte gemessen, die deutlich unter -100 mV lagen. Beim US fielen die Werte im Mittel nie unter -80 mV, bei der ZL kam es unterhalb von 2 cm zu einem Anstieg.

Bakterienzellzahlen im Sediment: Die mittleren Bakterienzellzahlen lagen in der Langen Lacke und Wörtenlacke sowohl im oxischen ($\chi^2 = 45,8$; $p < 0,001$) als auch im anoxischen Sedimenthorizont ($\chi^2 = 46,1$; $p < 0,001$) signifikant über den Zellzahlen der anderen 3 Lacken (Tab. 3, 4). Wie Abbildung 23A zeigt, stiegen bei der LL vor allem im Jahr 2001 die Bakterienzahlen im Sommer stark an und erreichten im oxischen Sediment Werte von 71,8 (10^9 Zellen ml⁻¹). Ein deutlicher Anstieg war ebenfalls bei der Zicklacke ($25,1 \times 10^9$ Zellen ml⁻¹) zu beobachten, wo sich ein dicker Biofilm am Gewässerboden gebildet hatte. Auch im anoxischen Sediment (Abb. 23B) stiegen die Zellabundanz im Sommer 2001 bei der LL und WL auf Werte über 25×10^9 Zellen ml⁻¹. Überraschenderweise lagen die Abundanz im anoxischen Sediment nur zwischen 12 % und 40 % unter den Abundanz des oxischen Sedimenthorizontes.

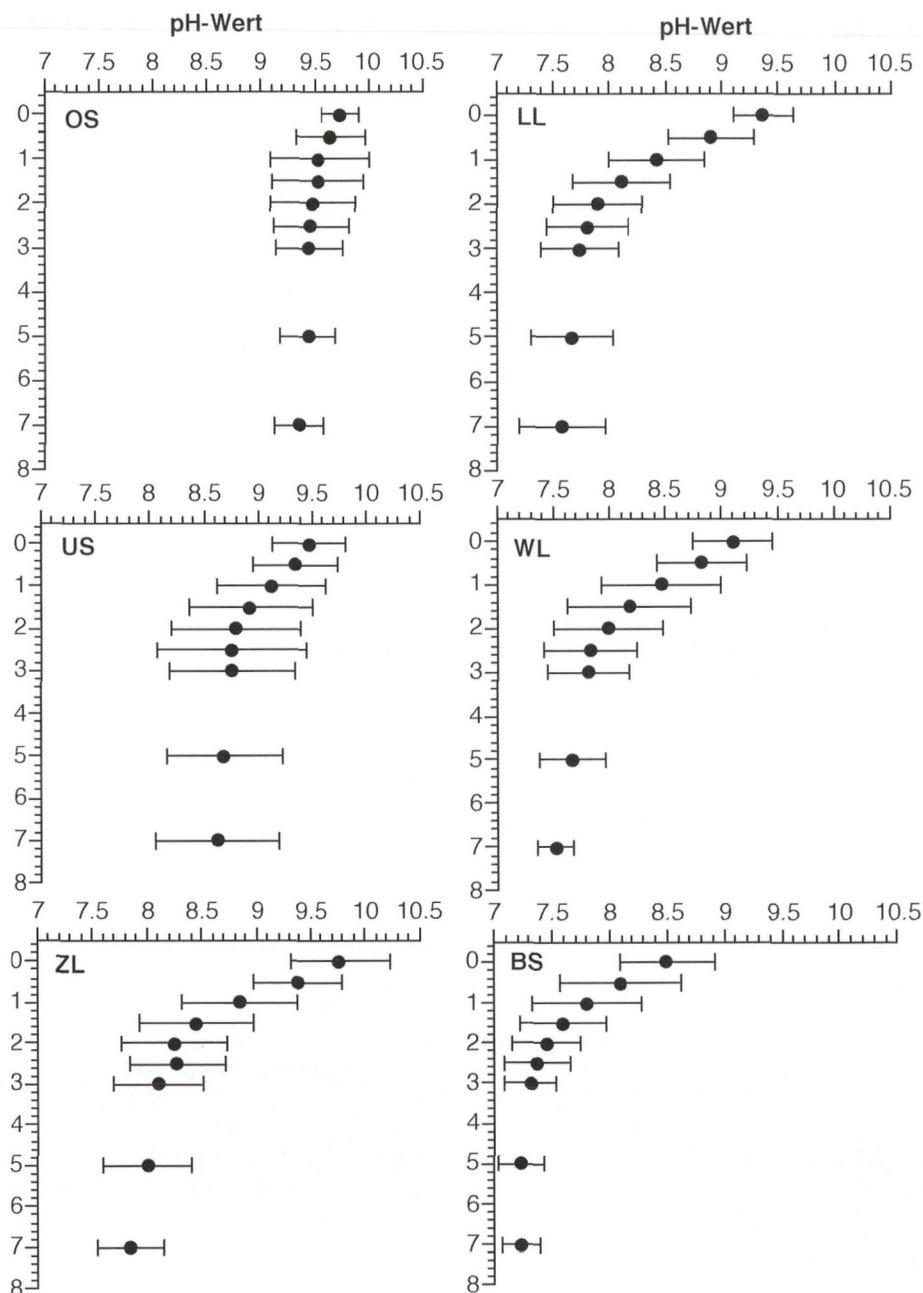


Abb. 21: Sediment pH-Profile in den 5 untersuchten Lacken und dem Standort BS. Die Werte repräsentieren das Mittel und die Standardabweichungen von 40 Profilen; y-Achse: cm Sedimenttiefe; Abkürzungen wie in Abb. 3.

Bakterienproduktion und Wachstumsraten: Die bakteriellen Produktionsraten lagen in der oxischen Sedimentschicht bei allen Lacken im Mittel zwischen 7 x (LL) bis 35 x (ZL) (Tab. 3, Tab. 4), die Wachstumsraten im Mittel zwischen 3,4 x (LL) bis 22 x (ZL) über den Raten des anoxischen Sedimenthorizontes. Die entsprechenden Verdopplungszeiten der Bakterienpopulationen im oxischen Sediment lagen im Mittel zwischen 2,3 (ZL) und 12,5 Tagen (OS), während sie im anoxischen Sediment zwischen 58 (LL) und 464 Tagen (US) lagen (Tab. 3, Tab. 4). Aus Abbildung 24A wird deutlich, dass in beiden Jahren die höchsten bakteriellen Produktionswerte mit bis zu 20100 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ in der ZL verzeichnet wurden, jeweils zu Zeitpunkten

als ein dicker Biofilm den Lackenboden bedeckte. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für die LL gemacht. Generell waren die Produktionsraten in der LL, WL und ZL deutlich über denen des US und OS, die Unterschiede zwischen den Lacken waren signifikant ($\chi^2 = 17,3$; $p < 0,005$). Im Jahr 2001 waren die Raten bei allen Lacken höher als im Jahr 2000. Auch bei den Wachstumsraten lag die Zicklacke mit einem Median von 0,306 Tag^{-1} deutlich vor den anderen Lacken (Tab. 3), der OS zeigte mit 0,056 Tag^{-1} den niedrigsten Medianwert.

Die anoxischen Produktionsraten waren an der LL und WL hoch signifikant ($\chi^2 = 47,5$; $p < 0,001$) über denen des OS, US und der ZL (Abb. 24B), wobei die maximalen Raten in der LL mit 1040 $\mu\text{g CL}^{-1} \text{h}^{-1}$

Tab. 3: Median und Schwankungsbreite der Bakterienzellzahlen (BN), bakteriellen Sekundärproduktion (BSP), Wachstumsraten (μ) und Verdoppelungszeiten (g) der Bakterienpopulationen im oxischen Sediment der Lacken während des Untersuchungszeitraumes (Mai 2000 - Juli 2001); n = 21

	OS	US	ZL	LL	WL
BN [10^9 ml^{-1}]	3,0 (1,5 - 8,7)	3,3 (1,2 - 12,3)	5,4 (1,8 - 25,1)	11,4 (4,0 - 71,8)	8,3 (5,5 - 13,3)
BSP [$\text{mgC L}^{-1} \text{ h}^{-1}$]	0,33 (0,10 - 2,4)	0,43 (0,04 - 4,7)	1,59 (0,03 - 20,1)	1,68 (0,09 - 14,4)	1,28 (0,06 - 7,2)
μ [d^{-1}]	0,056 ($\leq 0,48$)	0,105 ($\leq 1,29$)	0,306 ($\leq 1,28$)	0,104 ($\leq 0,49$)	0,107 ($\leq 0,66$)
g [d]	12,5 (1,44 - 37)	6,6 (0,54 - 27)	2,3 (0,54 - 96)	6,7 (1,40 - 147)	6,8 (1,04 - 87)

Tab. 4: Median und Schwankungsbreite der Bakterienzellzahlen (BN), bakteriellen Sekundärproduktion (BSP), Wachstumsraten (μ) und Verdoppelungszeiten (g) der Bakterienpopulationen im anoxischen Sediment der Lacken während des Untersuchungszeitraumes (Mai 2000 - Juli 2001), n = 21

	OS	US	ZL	LL	WL
BN [10^9 ml^{-1}]	2,4 (0,97 - 4,2)	2,9 (0,72 - 8,7)	4,5 (0,71 - 16,8)	6,9 (1,4 - 26,4)	6,0 (3,4 - 26,5)
BSP [$\text{mgC L}^{-1} \text{ h}^{-1}$]	0,022 (0,001 - 0,19)	0,026 (0,001 - 0,16)	0,046 (0,01 - 0,44)	0,26 (0,03 - 1,04)	0,18 (0,03 - 0,84)
μ [d^{-1}]	0,010 ($\leq 0,050$)	0,014 ($\leq 0,070$)	0,014 ($\leq 0,038$)	0,031 ($\leq 0,106$)	0,024 ($\leq 0,116$)
g [d]	351 (14 - 2500)	464 (10 - 3700)	143 (18 - 829)	58 (7 - 576)	73 (6 - 233)

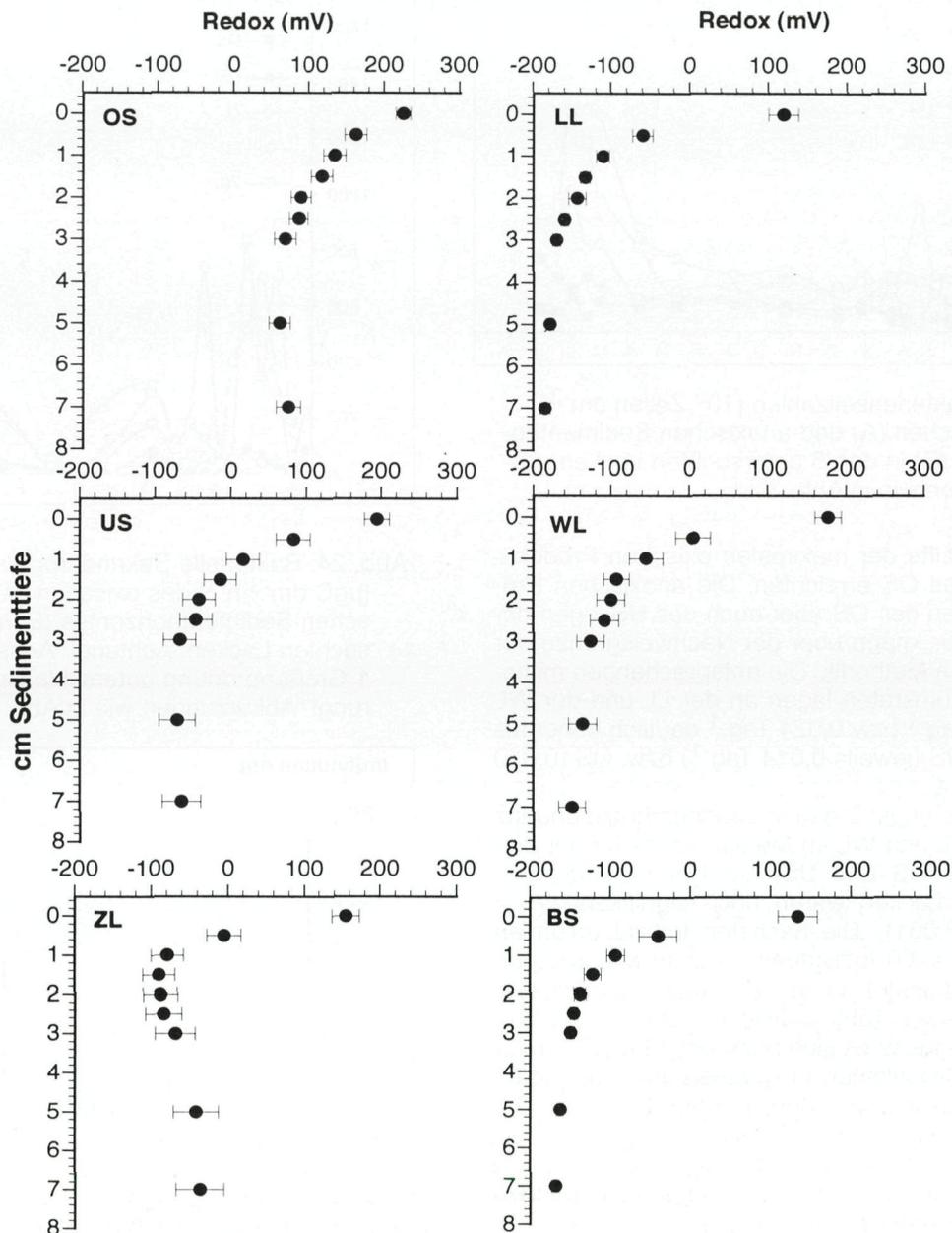


Abb. 22: Sediment Redox-Profile in den 5 untersuchten Lacken und dem Standort BS. Die Werte repräsentieren das Mittel und die Standardfehler von 40 Profilen. y-Achse: cm Sedimenttiefe; Abkürzungen wie in Abb. 3.

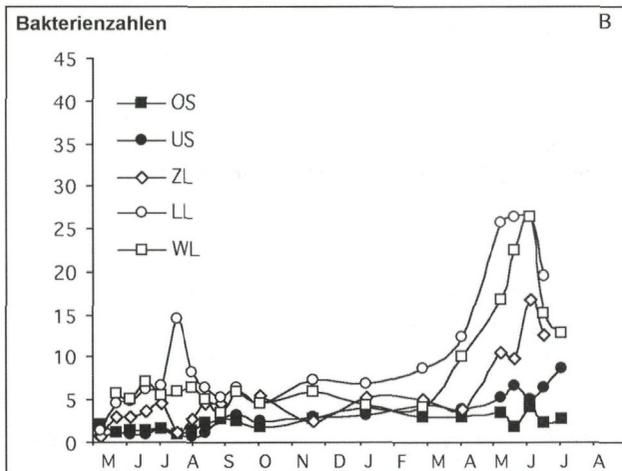
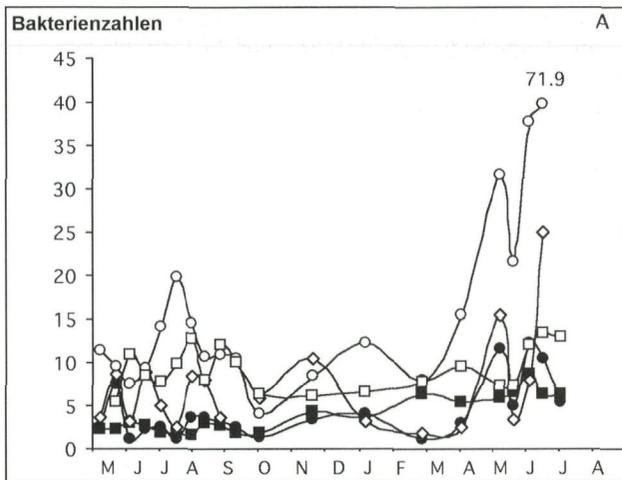


Abb. 23: Bakterienzellzahlen [10^9 Zellen dm^{-3}] des oxischen (A) und anoxischen Sedimenthorizontes (B) in den 5 untersuchten Lacken. Abkürzungen wie in Abb. 3.

etwa die Hälfte der maximalen oxischen Produktionsraten des OS erreichten. Die anoxischen Produktionsraten des OS aber auch des US lagen dabei meist nur knapp über der Nachweisgrenze der verwendeten Methodik. Die entsprechenden mittleren Wachstumsraten lagen an der LL und der WL mit $0,031 \text{ Tag}^{-1}$ bzw. $0,024 \text{ Tag}^{-1}$ deutlich höher als in der ZL, US (jeweils $0,014 \text{ Tag}^{-1}$) bzw. OS ($0,010 \text{ Tag}^{-1}$; Tab. 4).

Makrozoobenthos: Die Makrozoobenthosabundanz lag in der LL und WL im Median deutlich über den Werten des OS und US, die Unterschiede zwischen den Lacken waren hoch signifikant ($\chi^2 = 22,9$; $p < 0,001$). Die höchsten Individuenzahlen wurden mit $4400 \text{ Individuen } dm^{-3}$ im Mai 2000 an der LL beobachtet. In der ZL lagen die höchsten Werte bei etwa $1500 \text{ Individuen } dm^{-3}$ (Abb. 25). Generell handelte es sich beim Großteil (90 %) der gefunden Organismen um Larven von Chironomiden und Ceratopogoniden, andere Gruppen (Oligochäten, Trichopteren, Bryozoen) waren von geringerer Bedeutung und machten im Durchschnitt zusammen nur etwa 10 % der Gesamtorganismen aus (Daten nicht gezeigt).

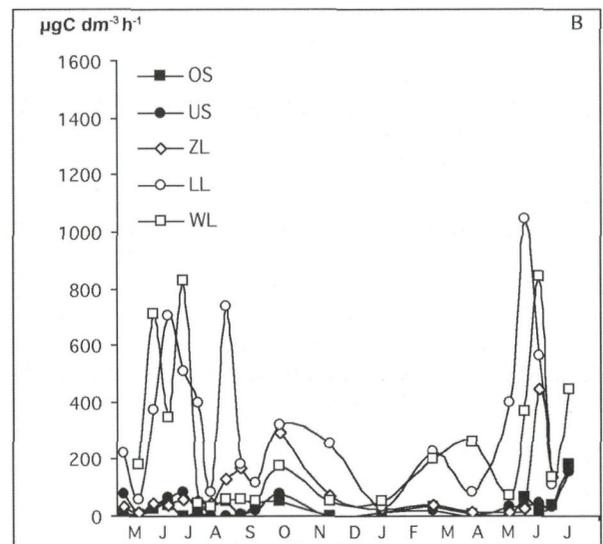
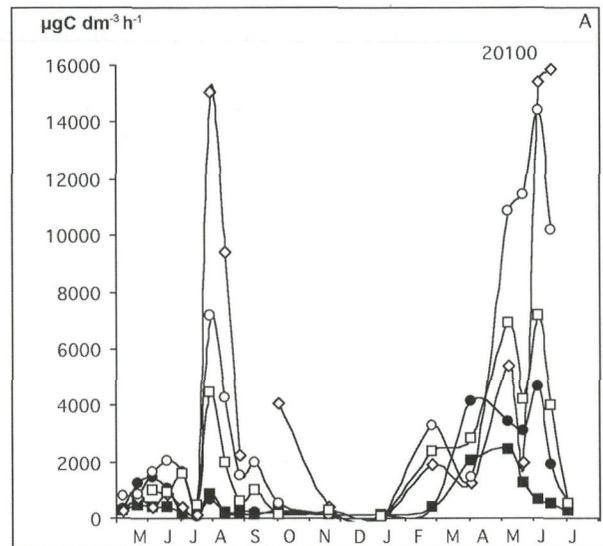


Abb. 24: Bakterielle Sekundärproduktionsraten [$\mu\text{gC } dm^{-3} h^{-1}$] des oxischen (A) und anoxischen Sedimenthorizontes (B) in den 5 untersuchten Lacken. Achtung!: Achsen zeigen um 1 Größenordnung unterschiedliche Skalierung! Abkürzungen wie in Abb. 3.

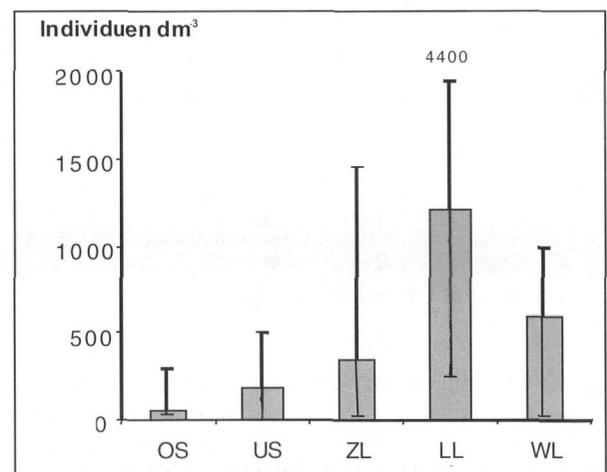


Abb. 25: Jahresmediane (Mai 2000 - April 2001) der Makrozoobenthosabundanz [$\text{Individuen } dm^{-3}$] in den 5 untersuchten Lacken ($n = 11$); Abkürzungen wie in Abb. 3.

4. Diskussion

Nach derzeitigem Stand des Wissens wird Vogelbotulismus in der überwiegenden Anzahl der Fälle durch eine Intoxikation mit Botulinum Neurotoxin Serotyp C1 (BoNt C1) verursacht, also durch die orale Aufnahme präformierten Neurotoxins, welches Vergiftungserscheinungen im betroffenen sensiblen Organismus hervorruft (Übersicht in Eklund & Dowell 1987; Westphal 1991). Es stellt sich daher die grundlegende Frage der BoNt C1 Verfügbarkeit und Stabilität, des BoNt C1 Transfers in den sensiblen Organismus, sowie des Ortes der BoNt C1 Toxinogenese im jeweiligen Ökosystem.

4.1 Die Rolle von Kadavern und Maden als in situ BoNt C1 Toxinquelle

Betrachtet man die an den Lacken im Nationalpark Neusiedler See - Seewinkel während der Saisonen 2000/2001 erhobenen in situ BoNt C1 Verfügbarkeiten in den untersuchten Umweltkompartimenten (d.h. Maden aus Vogel- und Fischkadavern, Interstitialwasserkompartiment, Makrozoobenthos) so kam der BoNt C1 Verfügbarkeit in Maden auf Vogelkadavern herausragende Bedeutung zu (Abb. 3, 5). Maden waren das einzige beprobte Umweltkompartiment, in dem signifikante BoNt C1 Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Nur wenige toxische Maden hätten im ungünstigsten Fall bei oraler Aufnahme ausgereicht, um fatale Vergiftungen bei Vögeln hervorzurufen (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Resultaten vergleichbarer Situationen (z.B. Hubalek & Halouzka 1991; Duncan & Jensen 1976; Haagsma et al. 1972; Lee 1962). Es ist gut belegt, dass sich Maden von Schmeiß- und Aasfliegen (Calliphoridae und Sarcophagidae) in faulem Fleisch von Kadavern entwickeln und mit ihrer extraoralen Verdauung, unter Einsatz proteolytischer Enzyme, tierisches Eiweiß außerhalb ihres Körpers spalten und verflüssigen. Diese Nährstoffbrühe, bestehend aus oligo- und monomeren Aminosäuren, bietet ein überaus exzellentes Nährmedium (vergleichbar mit einem mikrobiologischen Labormedium) für toxische BoNt C1 Clostridien (Smith, 1977). Maden können so gewissermaßen als "lebende Biokatalysatoren" fungieren, werden jedoch selbst nicht geschädigt, da Wirbellose gegenüber BoNt nicht empfindlich sind. Sie können jedoch große Mengen an Toxin aufnehmen/anreichern und bei oraler Aufnahme durch den Vogel fatale Intoxikationen hervorrufen. In der Literatur werden dabei Werte bis zu 10^5 und 10^6 MLD₅₀ (Giftdosis, bei der 50 % der Mäuse sterben) für 1 g BoNt C1 kontaminierte Maden angegeben (Hubalek & Halouzka 1991; Duncan & Jensen 1976; Richardson et al. 1965), wobei die Giftmengen in den Maden je nach Situation jedoch sehr schwanken können (Duncan & Jensen 1976). Allein das Spülwasser einer einzigen kontaminierten Made reichte auch aus um eine Maus zu töten (zitiert in Westphal 1991). Ist der Umstand, dass Maden auf Kadavern massive BoNt C1 Toxinkonzentrationen durch ihre katalytische Aktivität produzieren/anreichern können unumstritten, so ist die prinzipielle Bedeutung von BoNt C1

kontaminierten Maden für den Verlauf/ Ausbruch von Vogelbotulismusepidemien in Feuchtgebieten nicht restlos geklärt. So meiden die meisten Wildvögel den engen Kontakt mit Kadavern und nehmen nicht direkt Maden davon auf. In der vorhergehenden Untersuchung an den Lacken des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel konnte Grüll et al. (1987) lediglich Fressaktivitäten an Kadavern und das Herausheben von Maden bei juvenilen Lachmöwen verzeichnen. Im Gegensatz zu direkten Fressaktivitäten scheint jedoch ein möglicher Schlüssel in der gezielten und/oder zufälligen Aufnahme von Maden zu liegen, die nicht mehr im direkten Zusammenhang mit dem Kadaver stehen. Bei der Aasfliege *Lucilia caesar* konnten je nach Jahreszeit bereits etwa 3 bis 26 Tage nach Eiablage ein aktives Abwandern der Maden vom Kadaver festgestellt werden (Grüll et al. 1987). Im Flachwasser liegende Kadaver können so etwa zu einer Verbreitung von Maden in den Gewässern führen, wobei das Toxin noch lange aktiv bleiben kann. So konnten in im Freiland inkubierten Maden noch nach 130 Tagen Überwinterung BoNt C1 Gift detektiert werden (Hubalek & Halouzka 1991), obwohl die Konzentration des Giftes um einen Faktor von 25 bis 50 erniedrigt war. Es ist gut vorstellbar, dass wandernde und driftende Fliegenmaden somit von Vögeln mit ganz unterschiedlichen Techniken der Nahrungssuche aufgenommen werden können, wie etwa von gezielt pickenden Kiebitzen, gründelnden Enten oder seihenden Löfflern, ebenso wie von "Flugsammlern" wie Trauerseeschwalbe (Westphal 1991). In der Tat enthielten in Freiland gestorbene Krickenten mehrmals Fliegenmaden (J. Haagsma persönl. Mitteilung in Grüll et al. 1987). Darüber hinaus konnte in kleinen Versuchsteichen durch Zugabe eines infizierten Kadavers bei Stockenten Botulismus ausgelöst werden (Hunter 1970). Auch nach der Verpuppung von BoNt C1 kontaminierten Maden konnte aktives Toxin, wenn auch in weit geringeren Mengen (50 – 100 MLD₅₀) in Fliegen (Calliphoridae) nachgewiesen werden (Duncan & Jensen 1976) und Hubalek und Halouzka (1991) zeigten, dass große Mengen an BoNt C1 Toxin in Puppen derselben vorhanden sein können. Im Gegensatz dazu, konnte jedoch in der vorhergehenden Studie an den Lacken des Nationalparks kein Toxin in Fliegen von toxischen Maden detektiert werden (Grüll et al. 1987).

Basierend auf der Kadaver - Maden - BoNt C1 Interaktion wird der "Maden - Kadaver - Zyklus" als Ursache für explosionsartige Vogelbotulismusepidemien genannt und diskutiert (Hunter et al. 1970; Duncan & Jensen 1976; Reed & Rocke 1992). Es konnte gezeigt werden, dass ein gewisser Prozentsatz der Vogelpopulationen BoNt C1 Sporen in verschiedensten Körperteilen und Organen beinhalten kann (Duncan & Jensen 1976). Auch in dieser Untersuchung indizierten die Ergebnisse eine permanente Exposition des Vogelkörpers mit Sporen, da bis zu 40 % (Lange Lacke Bereich) der Vogelfäkalien mit BoNt C1 toxischen Sporen/Zellen kontaminiert waren (siehe Punkt 3.2, Abb. 9). Es soll erwähnt werden, dass toxische BoNt C1 Clostridien, im Gegensatz zu den günstigen Wachstumsbedingungen im Kadaver, im lebenden Organismus in

der Regel kein signifikantes Wachstum und keine Giftbildung zeigen (vgl. Absatz Toxikoinfektion weiter unten). Stirbt ein Vogel aus irgendeinem Grund (z.B. Alters- oder Katastrophentod), so können sich unter geeigneten Bedingungen (z.B. genügend hohe Sporenkonzentration im Kadaver, hohe Temperaturen, Ablage von Eiern durch Aasfliegen, etc..) in kurzer Zeit massenhaft BoNt C1 kontaminierte Maden entwickeln. Werden diese von anderen Vögeln aufgenommen, erkranken diese nun an Botulismus, ein Vorgang der auch als sekundäre Intoxikation bezeichnet wird (sekundäre Intoxikation, 1. Zyklus). Durch Aufnahme von BoNt C1 kontaminierten Maden können auch genügend Sporen mitaufgenommen werden, sodass auch Kadaver von Vögeln, die ursprünglich zu wenig oder keine Sporen beinhalteten, genügend Sporen für eine erneute BoNt C1 Toxinproduktion nach dem Tod des Vogels aufweisen und somit erneut bei anderen Vögeln weitere Intoxikationen (d.h. sekundäre Intoxikation 2. Zyklus) verursachen können (Rocke & Friend 2000). Aufgrund dieses innewohnenden exponentiellen Mechanismus wird erklärbar, dass innerhalb kurzer Zeit eine lawinenartige Vermehrung an Botulismusintoxikationen unter günstigen Bedingungen stattfinden kann. Der "Maden - Kadaver - Zyklus" wird von vielen Autoren als die dominante Ursache zumindest bei der explosiven Ausbreitung von Vogelbotulismusepidemien angeführt (Rocke & Friend 2000; Wobeser 1997; Duncan & Jensen 1976). Es konnte in Freilandexperimenten bestätigt werden, dass Kadaver - Maden Zyklen Vogelverluste durch Vergiftungen massiv verstärken (Reed & Rocke 1992).

An den Lacken des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel wurden in der vorliegenden Untersuchung während beider Untersuchungsjahre 2000/2001 regelmäßig in Kadavern BoNt C1 toxische Maden von etwa Mitte Mai bis Ende August angetroffen (Abb. 5). Dies erscheint umso bemerkenswerter, da auch im Jahre 2001, in dem nur äußerst geringe Vogelverluste verzeichnet werden konnten (vgl. Abb. 1), Kadaver mit BoNt C1 toxischen Maden vorhanden waren. Im Schnitt wurden ca. 40 % der madenhaltigen Kadaver mit BoNt C1 toxischen Maden vorgefunden, wobei ebenfalls ca. 40 % aller Kadaver Maden zu den Beprobungszeiten entwickelt hatten (Abb. 8). Es scheint daher im Jahre 2001 verfügbare BoNt C1 Quellen in "high risk" Gebieten der Seewinkellacken (LL, WL) gegeben zu haben, ohne dass es jedoch zu einem signifikanten Toxintransfer bzw. zur Auslösung einer Epidemie kam. Obwohl dieser Befund zunächst widersprüchlich zu dem vorhin diskutierten "Maden-Kadaver-Zyklus" erscheint, ist diese Beobachtung durchaus in Übereinstimmung mit einem kürzlich von Wobeser (1997) postulierten Erklärungsmodell zur Epidemiologie von Vogelbotulismus. Auf Grundlage des "Maden-Kadaver-Zyklus" postulierte Wobeser, dass verfügbare BoNt C1 Maden - Kadaver Toxinquellen sowie sekundäre Botulismus Intoxikationen in vielen Feuchtgebieten endemisch auf einem sehr geringen Niveau "dahinflackern". Zum Ausbruch einer Epidemie kommt es jedoch nur, wenn gewisse Schlüsselfaktoren zusammenwirken (siehe nächster und

übernächster Absatz). Obwohl es sich bei Vogelbotulismus primär um eine Intoxikationserscheinung handelt, können Vogelbotulismusepidemien - als "Maden-Kadaver-Zyklus" verstandenes Phänomen - rein numerisch als Infektionserkrankung erfasst werden, wobei den mit BoNt C1 Toxin und Sporen kontaminierten Maden die Rolle des Vektors zukommt. Die Reproduktionsrate R von Botulismusneuerkrankungen kann dabei, analog zur Infektionsrate (Fine et al. 1982), als die mittlere Anzahl von sekundären Vergiftungen in Folge eines einzelnen BoNt C1 kontaminierten Maden enthaltenden Kadavers in einer BoNt C1 sensitiven Vogelpopulation definiert werden. In Jahren in denen Botulismus kaum eine Rolle spielt, ist $R \leq 1$ (z.B. Situation Lacken des Seewinkels 2001). Kommt es jedoch zu Ausbrüchen, kann R beträchtliche Werte > 1 annehmen, bedenkt man nur, dass ein Kadaver tausende Maden enthalten kann und im ungünstigen Falle wenige Maden einen Vogel letal vergiften. So konnten Lee et al. (1962) und Foreyt & Abinanti (1980) aus Kadavern von Fasanen 5.000 bis 20.000 Maden absammeln. Nimmt man beispielsweise an, dass in einem Kadaver 1000 BoNt C1 sporen- und toxin kontaminierte Maden produziert, 10 % letztendlich im aquatischen Lackenbereich von Vögeln aufgenommen (d.h. Auswanderung und Verteilung eines Teiles der produzierten Maden in angrenzende Lackenbereiche und Aufnahme eines Teiles der abgewanderten Maden durch Vögel), und 5 Maden aufgenommen werden müssen um letale Intoxikationen hervorzurufen, so könnten etwa 20 Vögel von einem einzigen Kadaver vergiftet werden ($R = 20$). Auf dieser Basis wären daher für dieses hypothetische Beispiel ca. 250 BoNt C1 hältige Kadaver notwendig gewesen, um die ca. 5.000 Botulismusopfer im Sommer 1997 im Bereich Lange Lacke und Wörtenlacke im Nationalpark Neusiedler See Seewinkel zu vergiften (vgl. Abb. 1). Dies könnte theoretisch mit weniger als 2 Maden Kadaver Zyklen (1,84) gemäß des Zusammenhanges (1) stattfinden:

$$A_B = R^Z \quad (1),$$

wobei A_B die Anzahl der letalen Botulismusintoxikationen, Z die Zyklenanzahl des Maden - Kadaver - Zyklus, und R die Reproduktionsrate von Botulismusneuerkrankungen pro Zyklus darstellt; wobei R für dieses Beispiel, wie oben erläutert, mit 20 angenommen wurde. Der Ausgangskadaver wurde dabei in der Zyklenanzahl nicht mitberücksichtigt, da in ihm die ursprüngliche (d.h. originäre) Toxinbildung passiert. Obwohl dieses Beispiel willkürlich herausgegriffen wurde, zeigt es jedoch bildhaft das prinzipielle Potenzial eines solchen Mechanismus auf. Es ist durchaus anzunehmen, dass bei größeren Ausbrüchen mehrere originäre Toxinbildungen (d.h. Ausgangskadaver) gleichzeitig/zeitversetzt vorkommen können.

Um Botulismusepidemien formalistisch erklärbar zu machen, kann nun folgender Zusammenhang (2) gewählt werden (Wobeser 1997, modifiziert) welcher die Schlüsselfaktoren eines Zyklus nach Probabilitäten zu beschreiben versucht:

$$V_2 = V_1 \times P_s \times P_m \times \beta \quad (2),$$

wobei V_1 die Zahl der Vögel darstellt, die aus irgendeiner beliebigen Ursache in einem Feuchtgebiet verstorben sind und V_2 die Anzahl der durch sekundäre BoNt C1 Intoxikation aufgrund V_1 verstorbenen Vögel darstellt (R entspricht dabei V_2/V_1). Der Terminus P_s beschreibt dabei das Verhältnis der Vögel, die BoNt C1 toxische Sporen in ihrem Körper beinhalten, die nach dem Tod zur Giftbildung führen können; P_m beinhaltet die Fraktion der Kadaver, welche von Maden befallen werden und vorhanden sind bis die Maden gefressen, abwandern bzw. verteilt werden können; β stellt schließlich den Intoxikationskoeffizienten dar. Der Intoxikationskoeffizient β besteht aus zwei Komponenten, dem Faktor C welcher die Kontakthäufigkeit der Vögel mit dem toxischen Material in der Lacke beschreibt, und dem Faktor P_i welcher diese Kontakte zur Anzahl der letalen Intoxikationen in Beziehung setzt (d.h. das Verhältnis der Vögel, die genügend toxische Maden aufgenommen haben). Gleichung (2) besagt also, dass es zu maximalen Ausbrüchen kommt ($R \gg 1$), wenn möglichst viele Kadaver BoNt C1 Sporen enthalten und große Mengen an BoNt C1 hältige Maden effizient zu Vogelpopulationen hoher Abundanz übertragen werden. Dabei können je nach Situation einem oder mehreren Faktor(en) die minimierende bzw. kritische Steuergröße für eine Epidemieauslösung zukommen. Ist ein Gebiet, z.B. aufgrund historisch bedingter Epidemien, hochgradig mit toxischen BoNt C1 Sporen im Sediment kontaminiert, so ist es denkbar, dass der Großteil der Vogelpopulation erhöhte Sporenkonzentrationen beinhalten. In diesem Fall sind die Sporen nicht limitierend und spielen als steuernde Größe bei zeitlich fluktuierenden Epidemien eine untergeordnete Rolle (jedoch aber in der Ausbruchswahrscheinlichkeit). Das Ausmaß der Madenbildung (d.h. P_m), die Anzahl von V_1 , die Gesamtvogelabundanz, sowie die Übertragungseffizienz β werden daher potenziell als steuernde Faktoren bei der Epidemieauslösung Beachtung finden müssen. Sie sind alle Faktoren, die von Jahr zu Jahr beträchtlich schwanken können und somit zu dem typisch zyklischen Erscheinungsbild von Vogelbotulismusepidemien beitragen können. Aufgrund der seit 1980 in vielen Teilen Europas aufgetretenen Epidemien (Eklund & Dowell 1987; Westphal 1991) muss davon ausgegangen werden, dass viele Gebiete mit toxischen BoNt C1 Sporen/Zellen durchsucht sind und in erheblichen Konzentrationen vorliegen. In Gebieten mit geringen Sporenkonzentrationen ist es dagegen durchaus denkbar, dass P_s den limitierenden Faktor darstellt, und trotz starker Madenbildung kaum Toxinbildung und Intoxikationen stattfinden. Für eine Situation wie die der Langen Lacke / Wörtenlacke 2001 ist es aufgrund des oben Dargelegten erklärbar, dass trotz verfügbarer toxischer Maden keine Epidemie ausgelöst wurde, da mutmaßlicherweise die Übertragungseffizienz des Toxins nicht ausreichend war. In diesem Zusammenhang erscheint eine vergleichende Analyse der Artenzusammensetzung der Vogelverluste zwischen Jahren mit epidemiehaften Situationen und Jahren

geringer/keiner Botulismusopfer von Interesse. Die Artenzusammensetzung der Vogelverluste zwischen den Jahren 2000/2001 (geringe bis kaum Verluste) und Jahren mit massiven Epidemien zeigte einen signifikanten Unterschied. Waren während der Jahre mit massiven Epidemien (1982/1983 sowie 1997) Stockente (31 %) und Krickente (21 %) von den meisten Vogelverlusten betroffen (Grüll & Rauer 2000), so waren es 2000/2001 die Lach- und Weißkopfmöwen (72 %; Abb. 4). Während Enten in der Regel den unmittelbaren Kontakt mit Kadavern meiden, so ist zumindest von juvenilen Möwen bekannt, dass sie auch direkt am Kadaver Maden erbeuten (Grüll et al. 1987). Dieser Unterschied der Artenzusammensetzung der Vogelverluste deutet entweder darauf hin, dass in den Jahren massiver Epidemien andere Toxinquellen zu Verfügung standen (siehe Interstitialwasser und Makrozoobenthos als BoNt C1 Toxinquelle) oder aber der Toxintransfer via dem Madenvektor unterschiedlich ablief. So könnte etwa die Art der Abwanderung und der Verbreitung toxischer Maden variiert haben. Im Falle der Produktion toxischer Maden bilden Kadaver, die in der Nähe der Wasseranschlagslinie oder direkt in der Lacke liegen, wesentlich bessere Voraussetzungen zur effizienten Verteilung von Maden als Kadaver, die einen großen Abstand zur Wasseranschlagslinie besitzen. Maden können durch Turbulenzen, Wind- und Wellenaktivitäten verbreitet und so von nahrungssuchenden Vögeln mit aufgenommen werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Wirbellose des Sediments (Makrozoobenthos) in unmittelbarer Nähe von Kadavern Toxin aufnehmen können und so als Verbreitungsvektoren dienen (Duncan & Jensen 1976). Evertebraten in ausgetrockneten Sedimenten sind jedoch entweder kaum vorhanden oder können nicht als Nahrungsquelle dienen, da die harten Sedimente schwer von Vogelschnäbeln durchstoßen werden können (Grüll et al. 1987). Hydrologische Faktoren wie Pegelstand, Wasserfläche, Wasserstandsdynamik und Uferlänge können somit wichtige Faktoren in Bezug auf die Transfereffizienz toxischer Maden darstellen.

4.2 Die Rolle der Sedimente als in situ BoNt C1 Toxinquelle

Um für den Untersuchungszeitraum 2000/2001 an den Lacken des Nationalparks die Bedeutung der Sedimente als BoNt C1 Quelle zu erheben, wurde Interstitialwasser (Sedimentwasser) aus repräsentativen Lackenbereichen unterschiedlicher ökologischer Charakteristik untersucht. Wie in den Ergebnissen genauer dargestellt, konnte in ca. 85 % der untersuchten Interstitialwasserproben ($n = 101$) kein BoNt C1 Toxin mit dem Maus-Bioassay detektiert werden (Abb. 6). In den restlichen 15 % der Proben konnte jedoch ein BoNt C1 Toxingehalt mit dem Maus-Bioassay nicht ausgeschlossen werden. Es wurden schwach positive Reaktionen bei den Mäusen festgestellt, die aufgrund der äußerst geringen Intoxikationserscheinungen jedoch nicht eindeutig interpretierbar und im untersten Bereich der Nachweisgrenze der Methodik waren. Es soll dabei erwähnt werden, dass das Interstitialwasser dabei

um einen Faktor 10 bis 20 mittels Dialyse eingengt wurde, um eine Konzentrationssteigerung des BoNt C1 zu erzielen (Zechmeister & Kirschner et al. 2002). Darüber hinaus wurde an einigen Proben eine Bestimmung der Extraktionseffizienz vorgenommen die, je nach Sedimenttyp, im Bereich von 10 % bis 15 % variierte (Zechmeister & Kirschner et al. 2002). Dialyseanreicherung und Extraktionseffizienz kompensierten sich daher in etwa und man kann von einer leichten Konzentrationssteigerung der BoNt C1 Extrakte um einen Faktor von 1,1 bis 2 ausgehen. Um ein vom Maustest unabhängiges Analyseverfahren für BoNt C1 zu besitzen, steht derzeit ein Testverfahren (ELISA) auf Basis immunologischer Reaktionen in Entwicklung und Evaluierung (Zechmeister & Farnleitner et al. 2002). Was bedeutet nun die Tatsache, dass in 10 % der Sedimentwasserproben eine in situ BoNt C1 Toxinverfügbarkeit nicht ausgeschlossen werden konnte für eine mögliche Verursachung einer BoNt C1 Intoxikation der Vögel? Diese wichtige Frage soll anhand einer einfachen Relevanzabschätzung erörtert werden. Nimmt man für die 10 % der fraglichen Fälle einen sehr konservativen Schätzwert der BoNt C1 Konzentration von 1 MLD₅₀ je 1 ml Interstitialwasser an (es kam in keinem der Versuche jedoch zu einer tödlichen Vergiftung der Maus und die Konzentration lag daher darunter) und mittlere orale Wirkungskonzentration von $1,9 \times 10^4$ MLD₅₀ (Krickente), 5×10^4 MLD₅₀ (Gans), $3,2 \times 10^5$ MLD₅₀ (Stockente) und $2,5 \times 10^6$ MLD₅₀ (Lachmöwe) (Haagsma 1987A, Richardson et al. 1965; Duncan & Jensen 1976; Wobeser 1988), so hätten Krickenten 19 Liter, Gänse 50 Liter, Stockenten 320 Liter und Lachmöwen gar 2500 Liter Sedimentwasser pro Individuum aufnehmen müssen um an einer Botulismusintoxikation zu sterben. Dies hätte etwa einer mittleren Sedimentmenge (LL, Feinsediment Sauspitz) von 27 Liter, 73 Liter, 433 Liter, und 3620 Liter bei einer mittleren spezifischen Masse des Sediments von $1,5 \text{ g cm}^{-3}$ und einem Wassergehalt von 46 % entsprochen. Bedenkt man, dass die Giftextraktionseffizienz auch beim Vogel nicht 1 sondern darunter liegt, müssten noch weit größere Mengen veranschlagt werden. Diese Relevanzabschätzung zeigt daher deutlich, dass in den Jahren 2000/2001 das Sedimentwasser der Lacken im Nationalpark Neusiedler See - Seewinkel für eine direkte Intoxikation von Vögeln keine Rolle gespielt hat. Auch ein Kontamination mit BoNt C1 der Wassersäule von den angrenzenden Sedimenten kann aufgrund des vorliegenden Verdünnungseffektes und der guten Durchmischung der Lacken aufgrund ihrer Flachheit ausgeschlossen werden.

Im Labor durchgeführte Mikrokosmenversuche mit Sedimenten der Langen Lacke Sauspitz zeigten auf, dass eine prinzipielle BoNt C1 Toxinbildung im Interstitialwasser nicht ausgeschlossen werden darf, jedoch die Menge der Toxinbildung unter natürlichen Bedingungen (z.B. Algen als Wachstumssubstrate) äußerst gering erscheint (Kirschner & Herzig 2001).

Obwohl die Sludgebed-Hypothese, welche die Sedimente als Orte der BoNt C1 Toxinbildung postuliert (siehe Einleitung, Pullar 1934; Quortrup & Holt 1941), diskutiert wird, konnten bis jetzt in neuerer

Zeit kaum Belege für ihre Gültigkeit erbracht werden (z.B. Zitate in Westphal 1991). Rezente positive BoNt C1 Toxinnachweise im Sedimentwasser konnten einzig bei mit Kadavern assoziierten Proben erbracht werden (Haagsma 1987; Hubalek & Halouzka 1991). In diesem Falle ist jedoch der Ort der Giftbildung im Kadaver angesiedelt und BoNt C1 wird in das umgebende Milieu lediglich abgegeben. Obwohl nun Indizien einer prinzipiellen Möglichkeit der in situ Sediment BoNt C1 Toxinproduktion aufgrund der Dialyseanreicherung im Lackenbereich des Nationalpark Neusiedler See - Seewinkel vorliegen, war jedoch das Ausmaß der detektierbaren BoNt C1 Konzentration für die Saisonen 2000/2001 weit unterhalb der ökotoxikologischen Relevanz. Im Gegensatz zur direkten BoNt C1 – Übertragung mittels oraler Aufnahme von Sedimentwasser ist jedoch noch im folgenden die Möglichkeit des BoNt C1 Transfers/Anreicherung über das Nahrungsnetz in Betracht zu ziehen (siehe nächster Punkt). So ist es eine bekannte Tatsache, dass diverse xenobiotische Umweltgifte geringster Konzentrationen in aquatischen Nahrungsnetzen auf toxikologisch relevante Konzentrationen angereichert werden können (Fent 1998).

4.3 Die Rolle der Sediment-Wirbellosen als in situ BoNt C1 Toxinquelle

Um für den Untersuchungszeitraum 2000/2001 an den Lacken des Nationalparks die Bedeutung der Wirbellosen in den Lackensedimenten (Makrozoobenthos) als BoNt C1 Quelle zu erheben, wurden Makrozoobenthosproben aus repräsentativen Lackenbereichen unterschiedlicher ökologischer Charakteristik untersucht. Bei einer solchen Betrachtungsweise können nun prinzipiell zwei unterschiedliche Szenarien unterschieden werden:

1) wirbellose Tiere als "Microenvironments", in denen nach dem Tod toxische Clostridien unter günstigen Verhältnissen BoNt C1 produzieren können, und

2) lebende Wirbellose, die präformiertes BoNt C1 aus der Umwelt aufnehmen und somit entweder als Verbreitungsvektoren und/oder im Zuge des Nahrungsnetzes als Biomagnifikationsmechanismus dienen können.

Wie in den Ergebnissen genauer dargestellt, konnte in ca. 90 % (n = 79) der Proben kein BoNt C1 Toxin mit dem Maus-Bioassay detektiert werden. In ca. 10 % der restlichen Proben konnte jedoch ein BoNt C1 Toxingehalt mit dem Maus-Bioassay nicht ausgeschlossen werden (Abb. 7). Es wurden schwach positive Reaktionen bei den Mäusen festgestellt, die aufgrund der äußerst geringen Intoxikationserscheinungen, wie bei den Sedimentwasserproben dargestellt, nicht eindeutig interpretierbar und im untersten Bereich der Nachweisgrenze der Methodik waren. Nimmt man, analog der weiter oben dargestellten Relevanzabschätzung für das Sedimentwasser, für den Teil der fraglichen Fälle einen konservativen Schätzwert der BoNt C1 Konzentration von 1 MLD₅₀ je 2 g Wirbellose (Frischgewicht) an (es kam in keinem der Versuche zu einer tödlichen Vergiftung der Maus aus 2 g Wirbellosenextrakt) und mittlere orale Wirkungskonzentration

trationen von $1,9 \times 10^4$ MLD₅₀ (Krickente), 5×10^4 MLD₅₀ (Gans), $3,2 \times 10^5$ MLD₅₀ (Stockente) und $2,5 \times 10^6$ MLD₅₀ (Lachmöwe) (Haagsma 1987A, Richardson et al. 1965; Duncan & Jensen 1976; Wobeser 1988), so hätten Krickenten mindestens 38 kg, Gänse 100 kg, Stockenten 640 kg und Lachmöwen gar 5000 kg an Wirbellosenfrischmasse pro Individuum aufnehmen müssen, sodass 50 % der Vögel an Botulismusintoxikation gestorben wären. Für die Saisonen 2000/2001 an den Lacken des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel können daher Wirbellose im Sediment weder als signifikantes ökotoxikologisch relevantes Mikroenvironment zur BoNt C1 Toxigenese, noch als bedeutender Transfervektor oder Biomagnifikationsmechanismus angesehen werden. Diese Relevanzabschätzung wird darüber hinaus dadurch untermauert, dass in den Jahren 2000/2001 kaum Enten- und Limikolenverluste zu verzeichnen waren (gesamt ca. 100 Individuen) und Möwen (ca. 400 Individuen) die Masse an den Verlusten ausmachten. Wäre signifikante BoNt C1 Toxinverfügbarkeit 2000/2001 entweder im Sedimentwasser und/oder in Sediment - Evertebraten aufgetreten, so wäre eine andere Artenzusammensetzung der Verluste, aufgrund der unterschiedlichen Nahrungsökologie sowie der BoNt C1 Toxinsensitivitäten zu erwarten gewesen (siehe auch weiter oben). Ferner konnte anhand einer durchgeführten Kontingenzanalyse (mit und ohne Zeitverzögerung) zwischen den Zeitpunkten des Auftretens von BoNt C1 Toxinspuren im Sedimentwasser sowie den Evertebraten kein zeitlicher Zusammenhang detektiert werden ($p > 0.5$; Kramer-Kontingenzanalyse). Dies deutet darauf hin, dass kein nachweisbarer Transfer von BoNt C1 Toxinen von Sedimentwasser zu den Wirbellosen 2000/2001 stattgefunden hat.

In der Literatur wurden immer wieder BoNt C1 Verfügbarkeiten im Makrozoobenthos beschrieben (Zitate in Eklund & Dowell 1987; Westphal 1991). Es muss jedoch festgehalten werden, dass es sich bei diesen Fällen meist um Kadaver assoziierte Untersuchungen handelte (Haagsma 1987; Duncan & Jensen 1976; Hubalek & Halouzka 1991). Im Gegensatz dazu wurde die hier vorliegende Untersuchung an nicht Kadaver assoziierten Makrozoobenthosproben durchgeführt. Duncan & Jensen (1976) konnte beispielsweise eine erhöhte Anzahl an BoNt C1 positiven Sediment Evertebraten in unmittelbarer Nähe zu Kadavern feststellen. In größerer Entfernung zu Kadavern konnte jedoch in der Mehrheit der Sediment - Evertebraten kein Toxin festgestellt werden und die wenigen positiven Fälle waren unsichere Toxinnachweise (Duncan & Jensen 1976). Aufgrund der Literatur kann man davon ausgehen, dass bei einer Giftbildung in Wirbeltierkadavern eine Toxinübertragung auf lebende Sediment-Evertebraten stattfinden kann, die nachfolgend als Futterquelle dienen können. Von einer BoNt C1 Toxinanreicherung im Sinne einer Biomagnifikation liegen jedoch keine Beweise vor. Darüber hinaus erscheint die Hypothese, dass absterbende Sediment-Wirbellose als Substrat zur Toxinbildung dienen könnten als völlig unbewiesen (Haagsma 1987; Kirschner & Herzog 2001). Versu-

che mit verschiedenen toten Evertebraten die toxische BoNt C1 Sporen enthielten, konnten - wenn überhaupt - nur geringste ökotoxikologisch unrelevante Konzentrationen an Toxinen bilden (Kirschner & Herzog 2001).

4.4 Toxicoinfektion

In der Literatur wird auch das Vorkommen möglicher Toxicoinfektionen bei Vogelbotulismus diskutiert (Literaturübersicht bei Westphal 1991). Darunter versteht man eine BoNt - Produktion innerhalb des lebenden Vogels. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass in paarigen Blinddärmen von Hühnervögeln BoNt toxische Clostridien keimen, wachsen und Toxin produzieren können (Kurazono et al. 1987). Es wurden jedoch in vivo nur sehr geringe Toxinkonzentrationen gebildet, und da bei Hühnern im Blinddarm nur ein geringer Teil des Giftes resorbiert werden kann, kam es zu geringen Botulismuserkrankungen ohne letale Folgen (Westphal 1991). Bei Hühnervögeln aber auch bei Enten, Rallen und vielen Limikolen wird zum Kot ein sogenannter Blinddarmkot abgesetzt, den die Vögel wieder aufpicken (Westphal 1991). Basierend auf dieser Verhaltensform der Koprophagie wurde die sogenannte zyklische Toxicoinfektion postuliert (Kaji & Sakaguchi 1980). Dabei sollen toxische Sporen aufgenommen werden und im Blinddarm geringe Mengen an Toxin produzieren. Durch die nachfolgende zyklische Abgabe und Aufnahme des Blinddarminhaltes kann im Dünndarm jedoch Gift resorbiert werden, was zu Vergiftungserscheinungen führen soll, da BoNt sich kumulativ in den Blutgefäßen anreichern kann. Die zyklische Toxicoinfektion wurde bis dato nur bei Hausgeflügel nachgewiesen, der prinzipielle Mechanismus ist jedoch auch bei Wildvögeln denkbar (Westphal 1991).

Bezogen auf die Situation der Lacken des Nationalparks Neusiedler See-Seewinkel 2000/2001 erscheint die Möglichkeit einer Toxicoinfektion, wenn überhaupt existent, als unbedeutend. Dies kann aus folgenden Gründen abgeleitet werden. Erstens war der überwiegende Anteil der Opfer unter den Weißkopfmöwen vertreten (72%; Abb. 4), während eine Toxicoinfektion vor allem höhere Verluste unter den Limikolen und Enten hätte erwarten lassen. Die bis dato aufgetretenen großen wie auch kleinen Epidemien sind in unvorhersagbaren Schüben mit meist typischem Epidemieverlauf aufgetreten. Eine signifikante Toxicoinfektion hätte ein zeitlich homogeneres Auftreten unter den Vogelpopulationen erwarten lassen, da - wie nachgewiesen - zur Aufnahme in den Vogelkörper genügend toxische Sporen/Zellen im Sediment zur Verfügung standen/stehen (siehe nächstes Kapitel).

4.5 In vitro BoNt C1 Toxinbildungspotenzial der Sedimente und Vogelfäkalien

Unter einem BoNt C1 Giftbildungspotenzial versteht man, dass toxische BoNt C1 Clostridien im Probenmaterial enthalten sind und unter geeigneten Laboratoriums-Kultivierungsbedingungen (Fleischextraktmedium) und Sauerstoffausschluss BoNt C1 Toxin bilden können (siehe Methodik). Dies be-

deutet, dass funktionelle BoNt C1 "Toxinexpressionsseinheiten" in zumindest einem Teil der Population vorliegen müssen, und für die Zeitdauer der Potenzialbestimmung BoNt C1 Gene von der Zelle zur Expression des Toxins genutzt werden können (siehe Punkt 1.2). Bei der gewählten Methodik wurde dabei nicht in vegetative BoNt C1 toxische Zellen bzw. in BoNt C1 toxische Sporen unterschieden, und die Resultate beziehen sich dabei auf das gesamte vorhandene Giftbildungspotenzial in der jeweiligen untersuchten Probe. Liegt ein positives Giftbildungspotenzial vor und kann im Gegensatz dazu im Freiland jedoch kein in situ BoNt C1 Toxin nachgewiesen werden, so ist dies ein Beleg dafür, dass zwar prinzipiell Gift gebildet werden könnte, jedoch unter den gegebenen Freilandbedingungen wesentliche ökologische Parameter dies nicht erlauben. Dies können chemophysikalische Bedingungen (z.B. pH, NaCl Konzentration, Temperatur, Sauerstoffkonzentration), Substratversorgung, sowie biologische Faktoren (z.B. Wachstumskonkurrenz) sein (Westphal 1991). Eigene Laborversuche mit Sedimenten aus der Lange Lacke zeigten dabei, dass unter günstigen Umweltbedingungen (z.B. sommerliche Hitzeperiode) chemophysikalische und biologische Faktoren einer Toxigenese meist nicht im Wege stehen (siehe limnologische Charakteristik), jedoch für eine signifikante Toxinproduktion die Verfügbarkeit des Wachstumssubstrates die entscheidende/limitierende Rolle spielen kann (Kirschner & Herzog 2001).

Die Resultate der Erhebung des BoNt C1 Giftbildungspotenzials 2000/2001 ergaben einen deutlichen Unterschied zwischen Arealen mit hohem Botulismusrisiko (LL, WL, ZL) im Vergleich zu Arealen mit geringem historischen Botulismusrisiko (OS, US). Dabei wurde im Mittel bei ca. 90 % der Lackensedimente (n = 76) aus LL/WL/ZL Arealen ein BoNt C1 Giftbildungspotenzial detektiert, hingegen besaßen im Schnitt ca. 40 % der Lackensedimente (n = 45) aus OS/US Bereichen ein positives Giftbildungspotenzial (Abb. 8). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es während Epidemien zu einer Anreicherung von BoNt C1 toxischen Sporen/Zellen in umliegenden Arealen kommt. Da mit dem Kadaver – Maden Zyklus eine starke BoNt C1 Sporen-/Zellenanreicherung einhergeht, erscheint eine Kontamination und Anreicherung der umliegenden Sedimente naheliegend. Demnach sollte der Prozentsatz an Giftbildungspotenzialen vergangene Botulismusausbrüche widerspiegeln. In der Tat zeigen die Resultate, dass in unmittelbarer Vergangenheit (1997/1998) die am massivsten betroffenen Gebiete, wie die Lange Lacke ("Todesstrand") ein BoNt C1 Giftbildungspotenzial von 100 % der Proben aufweisen. Diese werden gefolgt von anderen betroffenen Standorten im Bereich des Lange Lacke – Wörtenlacke Komplexes, und zwar "Sau-spitz" (Lange Lacke) mit rund 91 % und die Wörtenlacke selbst mit 85 %. Auch die Zicklacke, die vor allem in der längeren Vergangenheit (1982/1983) von schweren Epidemien betroffen war, weist nach wie vor bei einem erhöhten Prozentsatz der Proben (80 %) ein Giftbildungspotenzial auf. Es ist bekannt, dass Sporen toxischer BoNt C1 Clostridien lange Zeit überleben können,

und so stehen die Resultate der Zicklacke in Übereinstimmung mit der Geschichte des Epidemiegeschehens im Seewinkel. So kann etwa die mittlere Überlebenszeit dieser Sporen mehr als 30 Jahre im flüssigem Medium betragen (Westphal 1991). Die Überlebenszeit im Freiland hängt jedoch mutmaßlicherweise vom Vorhandensein einer ganzen Reihe unterschiedlichster Eliminierungsfaktoren ab (z.B. Fraß, chemophysikalische Abtötung, etc.). Betrachtet man das zeitliche Verteilungsmuster der Toxinbildungspotenziale (Abb. 8), konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Jahren gefunden werden, allerdings scheint es in „Low risk“ Gebieten, wo toxische BoNt C1 Sporen geringe Konzentrationen besitzen, während des Jahres zu einer Anreicherung zu kommen. So eine Anreicherung kann, wenn keine effektiven Kadaver - Maden - Zyklen bestehen, durch die Übertragung von Vogelfäkalien stattfinden, die zu einem durchaus hohen Prozentsatz BoNt C1 Genfragmente aufwiesen (siehe Punkt 4.6).

Verglichen mit LL/WL/ZL erbrachten die Gebiete Oberstinker und Unterstinker geringere Häufigkeiten an positiven BoNt C1 Giftbildungspotenzialen, jedoch weisen diese Gebiete verglichen mit Gebieten ohne Epidemieverlauf (siehe unten) durchaus erhöhte Häufigkeiten (OS: 14 %; US: 65 %) auf. Dies könnte durch das vereinzelt Überschwappen der Epidemie 1997 vom Epizentrum im LL/WL Komplex auf OS und OS erklärbar sein. Da im Mittel 20 % - 30 % des Vogelkotes im Untersuchungsgebiet BoNt C1 toxische Sporen/Zellen beinhalten (Abb. 9), kann davon ausgegangen werden, dass es auch ohne Epidemie bzw. Maden-assoziierte Sporenvermehrung zu einer gewissen Kontamination in Gebieten ohne Botulismuvorfälle durch Vogelkot kommen kann. Darüber hinaus erscheint es möglich, dass von anderen Gebieten durch Zugvögel zumindest in qualitativer Hinsicht toxische BoNt C1 Sporen/Zellen eingetragen werden, die unter günstigen Umständen (Epidemieverlauf) im Habitat amplifiziert werden können (vgl. Punkt 4.6). Eine mögliche habitatspezifische Hintergrundbelastung wird dabei einerseits durch den Eintrag an Sporen und andererseits durch Eliminierungsmechanismen bestimmt. Aufgrund der hohen Häufigkeiten der Giftbildungspotenziale der Habitate LL/WL/ZL sowie US ist von einer direkten "autochthonen" epidemiebasierenden Kontamination auszugehen. Betrachtet man den Epidemieverlauf in Europa (Eklund & Dowell 1987), ist es jedoch naheliegend, dass toxische BoNt C1 Sporen/Zellen ursprünglich ins Habitat des Seewinkels eingetragen wurden und im System ihre Vermehrung und Ausbreitung gefunden haben. Über das qualitative Vorhandensein und die Dynamik verschiedener toxischer BoNt C1 Varianten im Nationalparkgebiet kann zurzeit aufgrund der Datenlage keine Auskunft gegeben werden. Interessanterweise hebt sich der Referenzstandort bei der Biologischen Station (BS) mit einer Häufigkeit von 50 % deutlich von der OS ab. Verglichen mit der Lackensituation sind möglicherweise Unterschiede der Limnologie/Hydrologie, die zu anderen Kontaminations-/Eliminationsmechanismen an BoNt C1 Sporen führen können.

Verglichen mit anderen aquatischen Habitaten weisen alle Untersuchungsflächen der Lacken des Nationalparks einen generell hohen Durchseuchungsgrad mit BoNt C1 Sporen/Zellen auf. So wird für niederländische Sedimente aus Gebieten mit und ohne Wasservogelbotulismus eine Häufigkeit von ca. 72 % bzw. 4 % für das BoNt C1 Giftpotenzial angegeben (Westphal 1991). Im Gebiet der Norfolk Broads, U.K., wiesen Sedimente mit Botulismusepidemien eine Häufigkeit von BoNt Toxinbildungspotenzialen von ca. 98% auf, wobei 62%, 51% und 60% BoNt B, BoNt C1, sowie BoNt E bildeten (Borland et al. 1977). Sandler et al. (1993) konnte in nordkalifornischen Feuchtgebieten mit unmittelbar oder länger zurückliegenden Epidemien in 52% der 2200 untersuchten Sedimentproben BoNt C1 Toxinbildungspotenzial nachweisen. Dabei zeigte sich, dass Austrocknen der Sedimente einen minimierenden Effekt auf die BoNt C1 toxischen Sporen/Zellen ausübte (Sandler et al. 1993). Für Feuchtbiotope in denen keine unmittelbar zurückliegenden Epidemien angegeben wurden, sind Häufigkeiten an BoNt C1 Giftpotenzialen von ca. 6% und 2% bekannt (Marion et al. 1983; Contreras de Vera et al. 1991). Aufgrund der hohen Prozentsätze an BoNt C1 Toxinbildungspotenzialen im Nationalpark Neusiedler See bzw. vorhandener toxischer BoNt C1 Sporen/Zellkonzentrationen, kann derzeit davon ausgegangen werden, dass "funktionelle BoNt C1 Toxinexpressionseinheiten" nicht den limitierenden Faktor darstellen. Vielmehr erscheint der Ort der Toxinvermehrung und des Transfers eine kritische bzw. steuernde Komponente darzustellen (siehe vorhergehende Punkte). Darüber hinaus ist es naheliegend, dass Vogelpopulationen, die mit höheren Expositionskonzentrationen an BoNt C1 Sporen/Zellen im Sediment in Kontakt stehen, höhergradig kontaminiert sind und so bei einem etwaigen Kadaveranfall unter günstigen Umständen zu einer rapiden Toxigenese beitragen (siehe Maden - Kadaver Zyklus und probabilistische Betrachtungsweise). Aufgrund der vorliegenden Daten ist es nicht möglich, habitatspezifische Überlebenszeiten von BoNt C1 Sporen im Nationalparkgelände abzuschätzen. Für langfristige Managementmaßnahmen wäre die Klärung diese Frage von vorrangigem Interesse. Neben der auf dem Kadaver-Maden Zyklus basierenden Vermehrung toxischer BoNt C1 Sporen/Zellen und dem Eintrag aus anderen Gebieten steht noch die Möglichkeit der Vermehrung im Sediment bzw. assoziierten Mikrozoen zur Diskussion. Für die Lackensituation 2000/2001 konnten jedoch keine Belege für diesen postulierten Mechanismus gefunden werden. Zukünftige Aktivitäten sollten diese Möglichkeit jedoch im Auge behalten.

4.6 Verteilung von BoNt C1 Genen in den Sedimenten und Vogelfäkalien

Parallel zur Bestimmung des BoNt C1 Toxinbildungspotenzials wurden auch die Verteilung und das Vorhandensein von korrespondierenden BoNt C1 Genen im Sediment analysiert (siehe Punkt 3.3, 3.4). Dabei wurden BoNt C1 Genfragmente mit Hil-

fe eines Nested-PCR Verfahrens sowohl direkt im Sediment als auch nach Bestimmung des Toxinbildungspotenzials im Anreicherungsmedium analysiert. Im Gegensatz zum Toxinbildungspotenzial indizierten die Prozentsätze der Genfragmentnachweise keine Unterschiede in der Verteilung von BoNt C1 Genen zwischen den verschiedenen Habitaten (Abb. 10, 12). Ein Vergleich mit dem Toxinbildungspotenzial (Abb. 8) ergibt, dass bei 121 durchgeführten Tests im Jahr 2000 aus allen Lackenbereichen 54 % der Proben bei Nachweis von BoNt C1 Genen auch Toxinbildungspotenzial besaßen, jedoch in rund 40 % der Proben kein Toxinbildungspotenzial nachgewiesen werden konnte, obwohl BoNt C1 Gene vorhanden waren (Zechmeister & Kirschner et al., 2002). Nur in rund 6 % der Proben konnte weder das Gen noch ein Toxinbildungspotenzial nachgewiesen werden. Betrachtet man diese Ergebnisse aufgeschlüsselt in die Habitate LL/WL/ZL versus OS/US, so kommt darüber hinaus ein deutlicher Gradient, analog zur oben erwähnten Verteilung des Toxinbildungspotenzials, zum Vorschein. Waren in 71 % bzw. 29 % der Fälle in LL/WL/ZL bzw. OS/US Arealen bei BoNt C1 Gennachweis auch ein Toxinbildungspotenzial detektierbar, so war vice versa in 24 % und 61 % trotz positiver BoNt C1 Gendetektion kein Toxinbildungspotenzial nachzuweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BoNt C1 Gene in der Umwelt in viel höherem Maße vorhanden sind, als sie in einer "funktionellen Expressionseinheit" vorliegen. Dabei können viele Möglichkeiten, wie etwa das freie Vorliegen von tox+ - Phagen, frei vorliegende BoNt C1 DNA, in der Zelle vorliegende jedoch nicht zur Toxinexpression nutzbare BoNt C1 DNA, gegeben sein (Zechmeister & Kirschner et al. 2002). Bei Betrachtung der zeitlichen Verteilungsmuster vor allem der in situ Genfragmentnachweise (Abb. 10), scheinen deutliche Unterschiede zwischen den Jahren 2000 und 2001 auf. Im Jahr 2001 wurde in signifikant weniger Proben das BoNt C1 Genfragment nachgewiesen als im Jahr 2000. Geringere aber dennoch signifikante Unterschiede zwischen den Jahren 2000 und 2001 wurden für die in vitro Genfragment Nachweise gefunden (Abb. 12). Es ist davon auszugehen, dass nach der Anreicherung der BoNt C1 Gene durch die Epidemien in den Jahren 1997 und 1998 (vgl. Abb. 1) ein langsamer Rückgang der Konzentrationen erfolgt (durch Abbauvorgänge der DNA und/oder natürliche Eliminierung der Toxigenen enthaltenden Zellen) und die Genfragmente somit mit der verwendeten PCR- Methode in situ nicht mehr detektiert werden können.

Betrachtet man die Häufigkeiten, mit denen BoNt C1 Genfragmente in den Vogelfäkalproben nachgewiesen werden konnten (Abb. 11, 13), so zeigte sich, dass nach Kultivierung ein ähnlich hoher Anteil (73 %) der Proben einen positiven Nachweis erbrachte wie die Sedimentproben (77 %) und kein signifikanter Unterschied zwischen den Lacken aus „High-risk“ und „Low-risk“ Gebieten bestand. Keinen Unterschied zwischen den Arealen zeigten auch die Ergebnisse der in-situ Detektion des BoNt C1 Genfragments. Die Werte lagen allerdings mit ca. 40 % deutlich unter den Ergebnissen nach Kul-

tivierung, was durch eine geringere Extraktionseffizienz der Genfragmente aus den Fäkalproben erklärt werden kann bzw. durch eine wahrscheinlich geringere Zahl an Genfragmentkopien (nahe der Auflösungsgrenze der Methode) in den Fäkalien. Die fehlenden Unterschiede zwischen den „High-risk“ und „Low-risk“ Gebieten deuten darauf hin, dass Vögel als Übertragungsvektoren von toxischen BoNT C1 Sporen/Zellen, Phagen oder freien BoNT C1 Genen fungieren (vgl. Punkt 4.5). Diese Übertragung findet sowohl innerhalb des untersuchten Gebietes statt aber auch zwischen Gebieten im überregionalen Maßstab, sodass die Einschleppung von toxischen BoNT C1 Sporen/Zellen, Phagen oder freien BoNT C1 Genen aus anderen Gebieten in den Nationalpark Neusiedler See - Seewinkel nicht ausgeschlossen werden kann. Vergleiche der im Nationalpark gefundenen Gensequenzen mit Sequenzen aus anderen Regionen der Erde sollten darüber Auskunft geben können.

4.7 Limnologische Charakteristik der Lacken und ihr Bezug zur BoNT C1 Toxigenese

Freiwasser: Betrachtet man die Freiwasserkonzentrationen an Chlorophyll a und Totalphosphor der Lacken des Nationalparks Neusiedler See – Seewinkel (Abb. 19), so sind diese eindeutig hypertrophen Systemen zuzuordnen. Der Median aller Lacken lag bei $1547 \mu\text{g P L}^{-1}$ und $65 \mu\text{g Chl a L}^{-1}$, mit Spitzenwerten von $1720 \mu\text{g Chl a L}^{-1}$. Anhand dieser Untersuchungsdaten wird deutlich, dass die Lacken des Nationalparks Biotope höchster biologischer Aktivität darstellen. Neben der autotrophen Komponente (d.h. Chlorophyll a), erreichten die bakteriellen Zellzahlen und die heterotrophe bakterielle Sekundärproduktion in den Lacken Mediane von 30×10^9 Zellen L^{-1} und $10^3 \mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$, mit Spitzenwerten bis zu 464×10^9 Zellen L^{-1} sowie $924 \mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Kirschner, Eiler, & Zechmeister et al. 2002). Diese Daten stellen die bis dato höchsten für natürliche aquatische Ökosysteme erhobenen Aktivitäten dar. Aufgrund der teilweise hohen windbedingten wie auch chemisch stabilisierten Sedimentresuspension bzw. Trübe und ihrer immens hohen mikrobiellen Abundanz und Aktivität wurde das Freiwasser einiger Lacken kürzlich auch als „flüssiges Sediment“ bezeichnet (Eiler, Farnleitner, Zechmeister et al. 2002). Eine durchgeführte Hauptkomponentenanalyse ergab, dass im wesentlichen 3 Komponenten die Lackenökologie charakterisieren. Der erste Faktor („turbidity factor“) umfasste die mit der Trübe assoziierten Parameter wie organische und anorganische Schwebstoffe, Cyanobakterien, Bakterien und Chlorophyll a. Der zweite Faktor („concentration factor“) beinhaltete die mit gelösten Inhaltstoffen assoziierten Parameter wie Salinität, Leitfähigkeit und DOC. Der dritte Faktor war von der Temperatur bestimmt. Diese drei Faktoren erklärten dabei 63% der Gesamtvariabilität aller erhobenen Parameter in den Lacken. Um die Lacken in einem ökologischen Kontext verstehen zu können und mögliche Veränderungen einschätzen zu können, muss vor allem ihre zeitliche und räumliche Variabilität und Dynamik betrachtet werden (Eiler, Farnleitner, Zechmeister et

al. 2002; Kirschner, Eiler, & Zechmeister et al. 2002).

In der Literatur wird immer wieder der mögliche Zusammenhang des trophischen Zustandes von aquatischen Systemen mit dem Risiko von Botulismusepidemien angeführt (Übersicht in Westphal 1991). Dabei werden Habitate hoher Trophie sowie Eutrophierungserscheinungen mit erhöhten bzw. zunehmenden Ausbruchswahrscheinlichkeiten in Beziehung gesetzt. Dies wird einerseits mit dem erhöhten Angebot an Vertebratenkadavern (entscheidend für Kadaver – Maden – Zyklus), andererseits mit besseren Nährstoffverfügbarkeiten und erhöhtem Sauerstoffverbrauch im Sediment (entscheidend für „Sludgebed“ Theorie) zu erklären versucht (Übersicht in Westphal 1991).

Vergleicht man nun die trophischen Komponenten des Freiwassers der verschiedenen Lacken mit den Orten historischer Botulismusepidemien (d.h. LL/WL/ZL), so ist für LL/WL/ZL/OS/US kein eindeutiger Zusammenhang mit früheren Epidemieereignissen erkennbar (Abb. 26, 27). Obwohl die höchsten Chlorophyll a-Werte an der LL erreicht wurden, erreichten am OS (Ort ohne signifikante Epidemieereignisse) in den Jahren 2000/2001 die Totalphosphorkonzentrationen, bakteriellen Zellzahlen, Cyanobakterienzellzahlen sowie heterotrophe bakterielle Sekundärproduktionsraten von allen Lacken die höchsten Konzentrationen bzw. Aktivitäten (Eiler, Farnleitner, Zechmeister et al. 2002). Im Gegensatz dazu besaß/besitzt der Standort ZL von allen Lacken die geringsten Chl a Werte, ein Standort, der in der Vergangenheit von massiven Epidemien betroffen war. Anhand des Datenmaterials von 2000/2001 kann daher kein Zusammenhang von trophischen Freiwasserkomponenten mit epidemifördernden Faktoren erkannt werden.

Neben der trophischen Komponente ist der Ionenhaushalt der Lacken als potenzielle Steuergröße biotischer Aktivitäten in der Wassersäule zu sehen (Kirschner, Eiler & Zechmeister et al. 2002). Die Salinitäten der Lacken im Jahr 2000/2001 betragen im Median ca. $5,5 \text{ g L}^{-1}$ (Hauptkation Na^+ , Hauptanionen HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^-), mit einem Schwankungsbereich von 2 g L^{-1} bis 47 g L^{-1} (Daten nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass mit Verdünnung des Lackenwassers eine signifikante biotische Aktivitätssteigerung des bakteriellen Kompartimentes einhergehen kann (Kirschner, Eiler & Zechmeister et al. 2002; Krachler et al. 2000). Ob dieser aktivitätssteigernde „Aus-süßungseffekt“ von Lackenwasser aufgrund von inhibitorischen Ionenkonzentrationen oder von den „erhöhten Kosten“ durch Bildung osmotisch wirksamer organischer Inhaltstoffe („compatible solutes“) in nativem Lackenwasser abhängt, ist derzeit völlig ungeklärt. Darüber hinaus ist es denkbar, dass eine Verringerung der Salzkonzentrationen eine drastische Veränderung der halophilen mikrobiellen Gemeinschaften verursachen und indirekte Effekte auf höheren trophischen Niveaus verursachen können. In amerikanischen Sodalacken konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Salinitätskonzentrationen und pH - Werte mit unterschiedlichen Ausbruchsrissen assoziiert sein können (Rocke & Samuel 1999). Betrachtet man die untersuchten

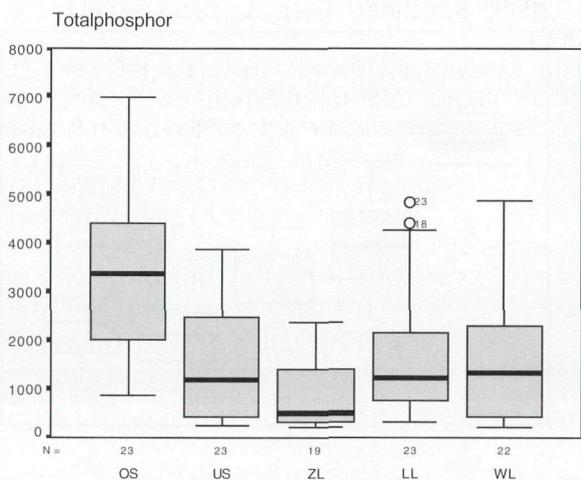


Abb. 26: Box-Whisker Plots der Totalphosphorwerte [µg P L⁻¹] der 5 Lacken (N = Anzahl der analysierten Proben; ein Ausreißer beim OS wurde entfernt); Abkürzungen wie in Abb. 3.

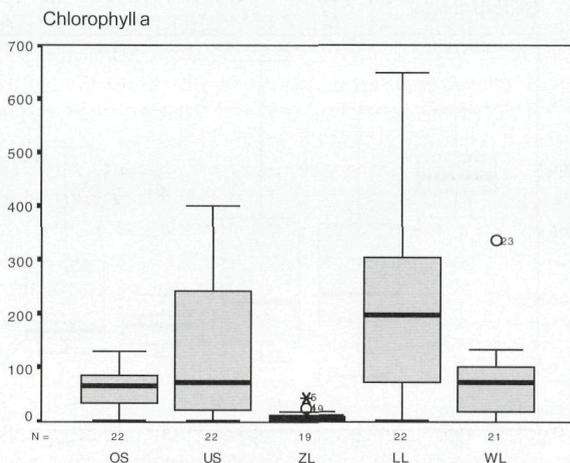


Abb. 27: Box-Whisker Plots der Chlorophyll a Werte [µg L⁻¹] der 5 Lacken (N = Anzahl der analysierten Proben; ein Ausreißer bei der LL wurde entfernt); Abkürzungen wie in Abb. 3.

können und mögliche Implikationen bezüglich Vogelbotulismus langfristig erkennen zu können. **Sedimente:** Die Sedimente der Lacken des Nationalparks Neusiedler See - Seewinkel stehen in mehr oder weniger intensiver Interaktion mit ihren korrespondierenden Freiwasserkörpern (Eiler, Farnleitner, Zechmeister et al. 2002). Historischer Zustand bzw. Veränderungen des Freiwasserkörpers können sich im Zustand der Sedimente widerspiegeln. Im Gegensatz zu den Freiwasserparametern scheinen viele der untersuchten Sedimentparameter eine Assoziation mit den Örtlichkeiten historischer Epidemien aufzuweisen. Aufgrund der limitierten Anzahl der Lackenstandorte wird die Beschreibung der Assoziation jedoch rein deskriptiv vorgenommen. Sowohl in oxischen, aber vor allem in anoxischen Sedimentbereichen besteht tendenziell ein ansteigender Gradient von OS und US über ZL zu WL und LL hinsichtlich biologischer als auch chemophysikalischer Parameter. Orte wie ZL, WL und LL (Orte signifikanter historischer Epidemien) wiesen höhere Mengen an organischem Mate-

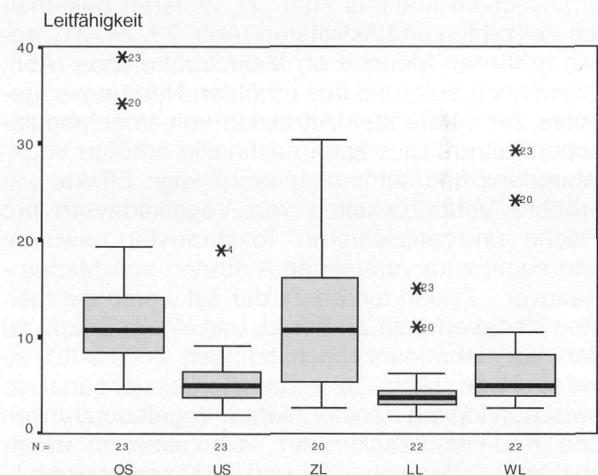


Abb. 28: Box-Whisker Plots der Leitfähigkeitswerte [mS cm⁻¹] der 5 Lacken (N = Anzahl der analysierten Proben); Abkürzungen wie in Abb.3.

Lacken hinsichtlich der Leitfähigkeiten, so kann kein unmittelbarer Zusammenhang zu historischen Epidemien erkannt werden (Abb. 28). Zeigen ZL (betroffenes Gebiet) sowie OS (bis dato nicht betroffen) die höchsten Salinitäten, so sind US (bis dato kaum betroffenes Gebiet), WL (betroffenes Gebiet), sowie LL (betroffenes Gebiet) mit erniedrigten Salinitäten anzutreffen. Ein ähnliches Bild bietet sich für die pH - Werte des Freiwassers (Abb. 18). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die untersuchten Freiwasserparameter während der Untersuchungsperiode 2000/2001 keine unmittelbare Assoziation zu steuernden Faktoren des Ausbruchsrisikos festgestellt werden konnte. Weiterführende ökologische Untersuchungen zur grundlegenden Funktionsweise der Lacken sind aber aufgrund des äußerst geringen Wissensstandes notwendig, nicht zuletzt um eine nachhaltige Sicherung des Lackenstandortes gewährleisten zu

rial (Tab. 2), höhere bakterielle Zellzahlen und Aktivitäten (Tab. 3, 4; Abb. 29, 30, 31), sowie größere Mengen an Makrozoobenthos (Abb. 25) als die Standorte US und OS (kaum bis keine Epidemieverläufe) auf. Geht man davon aus, dass es sich hierbei um keine zufälligen Zusammenhänge handelt, so scheinen zwei Erklärungsszenarien hierfür denkbar.

1) Fördernde Faktoren der in situ Toxigenese im Sediment/Makrozoobenthos: Wie weiter vorne abgehandelt, waren für die Saisonen 2000/2001 keine Beweise einer relevanten in situ BoNT C1 Produktion in Sediment- oder Makrozoobenthoskompartimenten zu finden. Darüber hinaus konnte in Mikrokosmen mit Lackensedimenten (LLTS) nur bei Zugabe hoher Nährstoffe (mikrobiologische Medien) relevante BoNT C1 Toxinbildung erreicht werden (Kirschner & Herzig 2001). Eine Aussage darüber, ob diese fördernden Faktoren der "in situ

BoNT C1 Toxigenese in Sedimenten Makrozoobenthos" jedoch im langjährigen Verlauf von Bedeutung sein könnten, ist aufgrund dieser zweijährigen Untersuchung kaum möglich. Mit Hilfe langfristiger Toxinmonitoring-Programme müsste diese Hypothese überprüft werden. Betrachtet man die pH und Redox Bedingungen in den untersuchten Sedimenten, so kann ebenfalls ein Unterschied zwischen LL/WL/ZL und OS/US erkannt werden. Sowohl OS und US weisen dabei verglichen mit den restlichen untersuchten Lacken höhere pH- und Redoxwerte auf (Abb. 21, 22, 29, 30). Dies kann zu einer geringeren Stabilität potenziell vorliegender BoNT C1 Toxine (Grüll et al. 1987), wie auch zu einer reduzierten Möglichkeit des Wachstums anaerober Bakterien wie Clostridien im Sediment beitragen. Grüll et al. (1987) stellte etwa fest, dass ab einem pH Wert von 8,0 BoNT C1 die biologische Wirkung reduziert und ab pH 10,0 die Wirkung völlig verliert.

2) Fördernde Faktoren der in situ Toxigenese in Vogelkadavern/Maden: Die höheren Mengen an organischem Material (Tab. 2), höheren bakteriellen Zellzahlen und Aktivitäten (Abb. 23, 24, 31), sowie größeren Mengen an Makrozoobenthos (Abb. 25) können aufgrund des erhöhten Nahrungsangebotes zur verstärkten Attraktion von Vogelpopulationen führen. Dies kann nachhaltig erhöhte Vogelabundanz und somit dichteabhängige Effekte wie erhöhte Verfügbarkeiten von Vogelkadavern pro Fläche und effizienteren Toxintransfer bewirken und somit zum verstärkten Auftreten von Maden - Kadaver - Zyklen führen. In der Tat waren die meisten Kadaverfunde an der LL und WL in Bezug zu den Vogelabundanzabschätzungen 2000/2001 zu verzeichnen (Abb. 32). Die Regressionsanalyse zwischen log/log transformierten Vogelabundanz und Kadaveranzahlen der verschiedenen untersuchten Lacken von 2001 und 2002 zeigte einen linearen Zusammenhang ($\log \text{Kadaver} = 1,123 \times \log \text{Vogelabundanz} - 3,15$; $r = 0,62$; $p < 0,05$) mit einer Steigung von 1,123 und ließ somit einen leicht überproportionalen Dichteeffekt der Kadaver in Abhängigkeit von der Vogelabundanz erkennen. Demgemäß verursachten 1000, 5000, und 10.000 Vögel im Mittel 1,7, 10,1 sowie 22 Kadaver, beziehungsweise trat ein Kadaver pro 604, 495 sowie 455 Vögel auf. Diese überproportionalen Effekte könnten etwa durch effizienteren Toxintransfer von Maden zu einem Vogel in Arealen mit hoher Vogelabundanz passiert sein.

Zusammenhang mit meteorologischen und hydrographischen Parametern: Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Botulismosopfer (Vogelkadaver; Abb. 5) und den gezeigten meteorologischen und hydrographischen Parametern (Abb. 16, 17) lässt sich aufgrund des relativ kurzen Beobachtungszeitraumes von 2 Jahren nur schwer herstellen. Um diesbezüglich fundierte Aussagen treffen zu können, bedarf es mehrjähriger Monitoringprogramme, da bekannt ist und auch im Nationalpark Neusiedler See - Seewinkel beobachtet wurde, dass Botulismusepidemien in mehrjährigen Zyklen auftreten (Grüll & Rauer 2000). Die in den Jahren 2000 und 2001 erhobenen Daten widerspre-

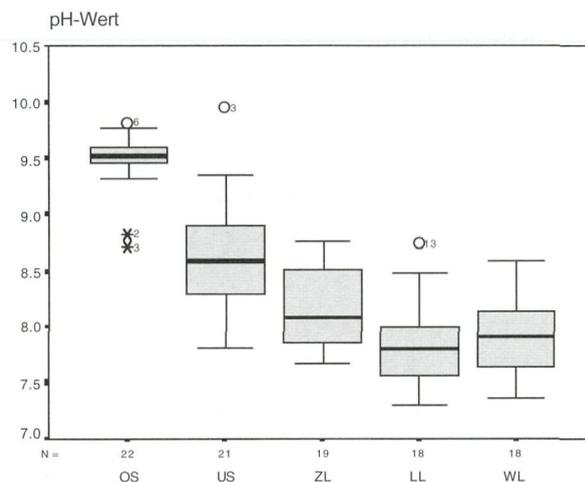


Abb. 29: Box-Whisker Plots der pH-Werte des anoxischen Sedimenthorizontes (unter 1 cm Tiefe) der 5 Lacken (N = Anzahl der analysierten Proben); Abkürzungen wie in Abb. 3.

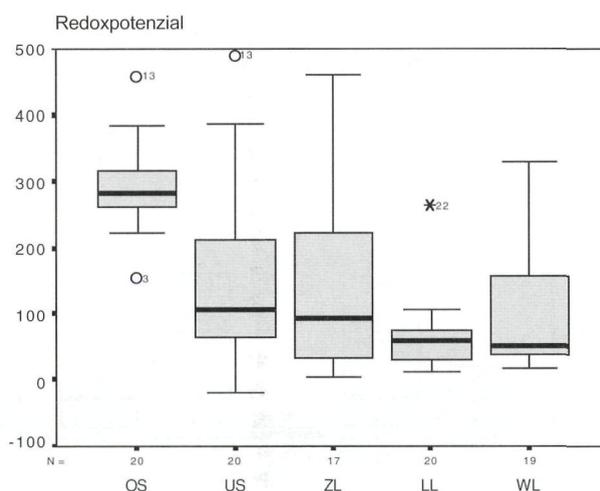


Abb. 30: Box-Whisker Plots der Redoxpotenzialwerte [mV] des anoxischen Sedimenthorizontes (unter 1 cm Tiefe) der 5 Lacken (N = Anzahl der analysierten Proben); Abkürzungen wie in Abb. 3.

chen jedoch nicht den bisher gefundenen Zusammenhängen, wo höhere Temperaturen gepaart mit Schönwetter und geringeren Niederschlägen Botulismusausbrüche fördern (Grüll & Rauer 2000). Wie in Tabelle 1 dargestellt, lagen die Lufttemperaturmittel der Monate Mai - August im Jahr 2000 etwas höher, die Niederschlagssummen etwas niedriger als im Jahr 2001, was mit den gefundenen Kadaverzahlen in den beiden Jahren übereinstimmt (Abb. 5). Weiters ist denkbar, dass die Windgeschwindigkeiten einen Einfluss auf die Flugaktivität der Fliegen und somit die Eiablage auf Vogelkadavern besitzen. Niedrigere Windgeschwindigkeiten, wie sie im Mittel im Jahr 2000 beobachtet wurden (Tab. 1), würden sich möglicherweise fördernd auf die Verbreitung der Fliegen und auf die Entwicklung toxischer Maden auswirken, während bei höheren Windgeschwindigkeiten die Flugaktivität der Fliegen gehemmt wäre.

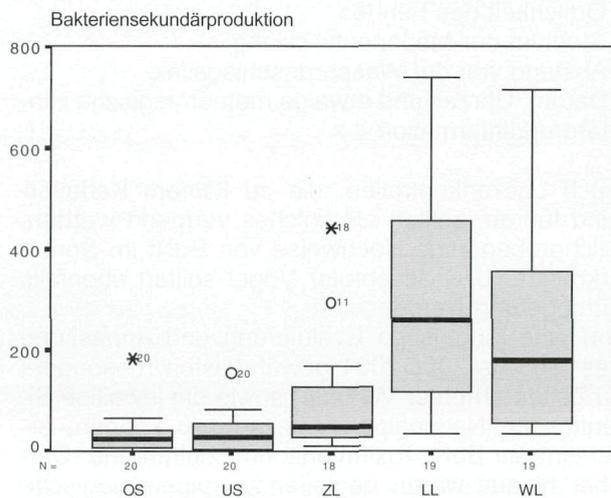


Abb. 31: Box-Whisker Plots der bakteriellen Sekundärproduktionsraten [µgC l⁻¹ h⁻¹] des anoxischen Sedimenthorizontes (unter 1 cm Tiefe) der 5 Lacken (N = Anzahl der analysierten Proben; 1 Ausreißer an der LL wurde entfernt); Abkürzungen wie in Abb. 3.

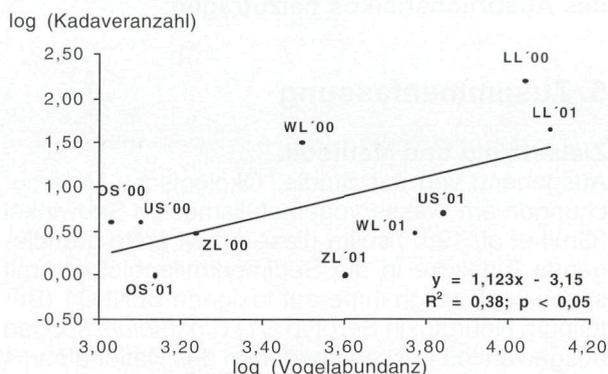


Abb. 32: Regression zwischen Vogelabundanz (pro Jahr aufsummierte, logarithmierte Abundanzen) und Kadaveranzahl (pro Jahr aufsummierte, logarithmierte Kadaverzahlen) an den untersuchten Lacken. Abkürzungen wie in Abb.3.

4.8 Modellvorstellung "BoNt Toxigenese und Vogelbotulismus" für den Untersuchungszeitraum 2000/2001

Aus dem erhobenen Datenmaterial ist es möglich, ein kausales Erklärungsmodell für die Saisonen 2000/2001 zu postulieren: Die Giftbildung von BoNt C1 passiert überwiegend in/auf Vogelkadavern, die mit BoNt C1 toxischen Sporen/Zellen kontaminiert sind. BoNt C1 toxische Sporen/Zellen sind dabei entweder vor dem Tod der Vögel (Alters- oder Katastrophentod) schon im Körper oder werden danach z.B. durch Aasfliegen übertragen. Die Kontaminationswahrscheinlichkeit mit BoNt C1 Sporen/Zellen ist dabei abhängig von der Umgebungskonzentration, d.h. Habitats mit hohem BoNt C1 Toxinbildungspotenzial (Lange Lacke- Wörtenlackekom-

plex) sollten zu häufigeren Kontaminationen der Vögel bzw. einer höheren Anzahl von Kadavern führen. Die Maden von Aasfliegen besitzen in der Toxigenese und der Epidemieentstehung eine maßgebliche Rolle. Durch ihre mechanischen Fressaktivitäten und ihre hydrolytischen Enzyme beschleunigen sie die Toxinproduktion und aktivieren das BoNt C1 Toxin. BoNt Toxin, welches in den Maden angereichert wird, kann durch Verbreitung der Maden (Ausspülen in aquatische Bereiche und zufällige Aufnahme der Maden) oder auch durch Direktfraß vom Kadaver (z.B. Möwen) übertragen werden. Eine epidemieartige Ausbreitung kann bei günstiger Voraussetzung durch den Maden – Kadaverzyklus nachfolgend in Gang gesetzt werden. Darüber hinaus kann es durch die Mobilität der Vögel jedoch durchaus zu einer örtlich entkoppelten Exposition der BoNt C1 Sporen/Zellen und der Toxinproduktion bei Anfall eines Kadavers kommen, so wie es beispielsweise 1997 zu einem Überschwappen der Epidemie vom Epizentrum LL/WL zu US und OS Bereichen gekommen ist.

Dieses für das Jahr 2000/2001 erstellte Erklärungsmodell postuliert, dass das komplexe Zusammenspiel der Verfügbarkeit des Wachstumssubstrates (Vogelkadaver), vorhandene Umweltkonzentration an toxischen BoNt C1 Sporen/Zellen, die Aktivität der Madenentwicklung auf den Kadavern, sowie das Ausmaß des Transfermechanismus zu den Vögeln, und letztendlich die Vogelabundanz eine bestimmende Rolle des Phänomens Vogelbotulismus 2000/2001 im Gebiet der Lacken des Seewinkels hatte. Für die Jahre 2000/2001 konnten keine Belege für die Relevanz von Sedimenten oder damit assoziierte Wirbellose für die unmittelbare Giftbildung gefunden werden. Auch in durchgeführten Mikrokosmenversuchen konnte unter umweltrelevanten Bedingungen keine signifikanten Konzentrationen an Toxin gebildet werden (Kirschner & Herzig 2001). Da Vogelbotulismus in der Regel in mehrjährigen Zyklen in Erscheinung tritt, sind die in einer sehr begrenzten Zeitspanne erhobenen Ergebnisse der Studie aber nur bedingt auf längerfristige Zeiträume extrapolierbar. Das hier dargestellte Modell bedarf daher einer Evaluierung über längere Zeiträume hinweg, um Anpassungen/Modifikationen in geeigneter Form vornehmen zu können.

4.9 Resultierende Maßnahmen

Aufgrund der erhobenen BoNt C1 Giftbildungspotenziale und der damit verbundenen Konzentration an funktionellen BoNt C1 Sporen/Zellkonzentrationen toxischer Clostridien in fast allen Teilen des Untersuchungsgebietes ist davon auszugehen, dass unter günstigen Umständen (siehe unten), jederzeit innerhalb kürzester Zeit, ausreichend Neurotoxin gebildet und Vogelbotulismusepidemien entstehen können. Neben den vorhandenen BoNt toxischen Clostridien sind für eine Epidemieentstehung dabei besonders kritische Faktoren entscheidend:

- mit toxischen Clostridien kontaminiertes tierisches Wachstumssubstrat (Kadaver)
- Geschwindigkeit der Madenbildung

- Temperatur
- Toxintransfer auf Vogelpopulation
- Größe der Vogelabundanz

Da der manipulierbarste Faktor die Verfügbarkeit an Kadavern darstellt, kommt diesem Parameter für unmittelbare praktische Maßnahmen essenzielle Bedeutung zu. Gemäß dem dargestellten Maden - Kadaver - Zyklus ist für eine effiziente Minimierung von Botulismus auch die Entfernung der primär anfallenden Kadaver (durch irgendeine Todesursache bedingt) von maßgeblicher Bedeutung. Die Kadaver müssen, bevor es zur Madenbildung kommt, vom jeweiligen Habitat entfernt sein. Aufgrund der Ergebnisse 2000/2001 kann davon ausgegangen werden, dass im Schnitt 40 % aller madenhaltigen Kadaver signifikante Mengen an BoNT C1 Toxin enthalten! Ist es bereits zum Transfer von toxinhaltigen Maden in das System gekommen, kann eine Epidemie häufig nicht mehr unterbunden werden, und Sammelaktivitäten dienen vorwiegend dem (wichtigen!) Ziel der Schadensbegrenzung. Eine tägliche und rechtzeitige Kontrolle der Lackengebiete in "potenziellen Botulismuszeiten" und das effiziente Entfernen von Vogelkadavern kann aufgrund dieser Zusammenhänge nicht hoch genug bewertet werden, um ein explosionsartiges Ausbreiten von Epidemien zu verhindern/minimieren.

Besonders zu Zeiten erhöhter Außentemperatur und Madenbildung ist ein sofortiges Entfernen der Kadaver sowie der oft darunter befindlichen Maden (!) von größter Bedeutung. Maden auf Kadavern in unmittelbarer Nähe zur Wasseranschlagslinie oder im Gewässer kann dabei besondere Bedeutung zukommen, da von diesen Kadavern Maden leicht in das Gewässer gelangen und so eine weite Verbreitung erfahren können. Es ist denkbar, dass unterschiedliche Bedingungen bzw. Veränderungen der Wasserstände zu Erhöhung der Wahrscheinlichkeit von Kadavern, die im Wasser oder Nähe zur Wasseranschlagslinie liegen, führen können. So kann etwa eine Überflutung größerer flacher Bereiche aber auch das Austrocknen der Lacken (d.h. höhere Vogelabundanz pro Wasserfläche) zu solchen Erhöhungen führen. Ein gewisses Restrisiko wird bestehen bleiben, da Kadaver in unzugänglichen Schilfbereichen unentdeckt bleiben und somit zur Toxinproduktion beitragen können. Dennoch sind alle Maßnahmen, die zur generellen Reduktion des Anfalls sowie zur effektiven Beseitigung von Vogelkadavern führen zu fördern. Eine konsequente Beseitigung von Kadavern im gesamten Gebiet sollte auch längerfristig zu einer Reduktion der BoNT C1 toxischen Sporen führen und damit das Botulismusrisiko verringern. Neben einem effektiven Kadaver – Management erscheint das **Aufzeichnen von grundlegenden Daten** (wie schon in der Vergangenheit in vorbildlicher Weise von den Gebietsbetreuern des Nationalparks durchgeführt) während der Gebietsüberwachung und Sammelaktionen für ein nachhaltiges Management wesentlich. Folgende Informationen müssen dabei erfasst werden:

- Anzahl der Kadaver
- Zustand der Kadaver
- betroffene Arten

- Örtlichkeit des Fundes
- Stadium der Madenentwicklung
- Abstand von der Wasseranschlagslinie
- Datum, Uhrzeit und etwaige meteorologische Hintergrundinformation

Auch Lackenkontrollen, die zu keinem Kadaverfund führen, sollten als solches vermerkt werden. Stichprobenartige Nachweise von BoNT im Serum erkrankter bzw. frischtoter Vögel sollten ebenfalls durchgeführt werden.

Um eine langfristige Evaluierung und Anpassung des Modells 2000/2001 gewährleisten (besonders zu Zeiten erhöhter Verluste) sowie die jeweilige Situation im Nationalpark erfassen zu können, erscheint ein BoNT Toxinmonitoring zielführend. Darüber hinaus wären begleitende epidemiologische Vogelpopulationsstudien sowie Modellierungen von praktischer Bedeutung.

Überdies ist davon auszugehen, dass Sedimentbedingungen wie hohe pH-Werte direkte oder indirekte minimierende Effekte auf das Ausbruchrisiko darstellen können (z.B. Sporenreduktion, geringere Toxinstabilität). **Eine nachhaltige Sicherung der Lackenstandorte im klassischen Sinne (d.h. "Salzstandort") scheint daher zur Minimierung des Ausbruchrisikos beizutragen.**

5. Zusammenfassung

Zielsetzung und Methodik

Ausgehend von der Studie "Ökologische Untersuchungen am Wasservogelbotulismus im Seewinkel (Grüll et al. 1987) sollte diese Arbeit erste grundlegende Einblicke in die Sedimentmikrobiologie mit spezieller Bezugnahme auf toxische BoNT C1 (Botulinum Neurotoxin Serotyp C1) *Clostridium* spp. an ausgewählten Lackenstandorten des Nationalparks gewähren. Als repräsentative Lackenstandorte wurden die Lange Lacke, die Wörtenlacke, die Zicklacke und der Ober- und Unterstinker ausgewählt. Darüber hinaus wurde eine Stelle im Schilfgürtel des Neusiedler Sees mituntersucht. Nach einer Phase der Methodenadaptierung (1999) wurden chemophysikalische, limnologische sowie mikrobiell-ökologische Basisdaten erhoben, die in einer Charakterisierung der verschiedenen Lacken und ihrer Sedimente resultierten (von Mai 2000 bis September 2001). Parallel dazu wurde ein räumliches und zeitliches Verteilungsmuster von in situ Botulinum Neurotoxin Typ C1 (BoNT C1) Toxinen, BoNT C1 Genen und BoNT C1 Giftpotenzialen erstellt, die eine Zuordnung zu den erhobenen ökologischen Parametern ermöglichte.

Auftreten von BoNT C1 Toxinen und BoNT C1 Giftpotenzialen

Extrakte von Interstitialwasser der Lackensedimente (sowohl submerse als auch trockenfallende), Makrozoobenthosproben (wirbellose Tiere der Lackensedimente) sowie Maden von Vogelkadavern und Fischen wurden auf BoNT C1 Toxingehalte sowie auf ihr BoNT C1 Giftpotenzial hin getestet. Unter einem positiven BoNT C1 Giftpotenzial wird dabei verstanden, dass toxische

ne BoNT C1 Clostridien-Sporen/vegetative Zellen im Probenmaterial enthalten sind und unter geeigneten Laboratoriums-Kultivierungsbedingungen (Fleischextraktmedium), hohen Temperaturen und Sauerstoffausschluss BoNT C1 Toxin bilden können. In Lackenbereichen mit historisch hohem Botulismusrisiko (LL/WL/ZL i.e. Lange Lacke, Wörtenlacke, Zicklacke) konnten während der Probenentnahme 173 Vogelkadaver auf Maden untersucht werden. Dabei wiesen 66 Kadaver Madenbildung auf, wovon ca. 40 % der madenhältigen Kadaver mit BoNT C1 toxinhaltigen Maden angetroffen wurden. Die Toxin positiven Maden enthielten dabei in der Regel große Mengen an BoNT C1 Toxin, sodass unter ungünstigen Umständen nur wenige Maden bei oraler Aufnahme ausgereicht hätten, um signifikante bis fatale Vergiftungen bei Vögeln hervorzurufen. In Lackenbereichen mit historisch geringem Botulismusrisiko (OS/US i.e. Oberstinker, Unterstinker) konnten während der gesamten Probenentnahme nur bei 2 madenhältigen Kadavern (n = 11) keine BoNT C1 toxinhaltigen Maden angetroffen werden. In ca. 90 % (n = 180) der untersuchten Interstitialwasser- und Makrozoobenthosproben konnte kein BoNT C1 Toxin mit dem Maus-Bioassay detektiert werden. In den restlichen ca. 10 % der Proben konnte jedoch ein BoNT C1 Toxingehalt mit dem Maus-Bioassay nicht ausgeschlossen werden. Es wurden schwach positive Reaktionen bei den Mäusen festgestellt, die aufgrund der äußerst geringen Intoxikationserscheinungen jedoch nicht eindeutig interpretierbar und im untersten Bereich der Nachweisgrenze waren. Eine durchgeführte Expositions- und Wirkungsabschätzung zeigte, dass diese möglichen Toxinmengen jedoch für die Situation 2000/2001 ohne ökotoxikologische Relevanz waren. Darüber hinaus konnte weder Toxintransfer vom, noch Biomagnifikation im Makrozoobenthoskompartiment nachgewiesen werden. Es soll dabei erwähnt werden, dass das Interstitialwasser dabei um einen Faktor 10 bis 20 mittels Dialyse eingengt wurde, um so eine Konzentrationssteigerung zu erzielen. Das Makrozoobenthos wurde aus je 2 kg Sediment durch ein Schlammverfahren isoliert. Bei ca. 90 % der Lackensedimente (n = 67) aus LL/WL/ZL Arealen konnte ein BoNT C1 Giftpotenzial detektiert werden. Hingegen besaßen nur ca. 40 % der Lackensedimente (n = 45) aus OS/US Bereichen Giftpotenziale. Vogelfäkalien (n = 86) besaßen zu ca. 30 % und 20 % BoNT C1 Giftpotenziale von LL/WL/ZL bzw. OS/US Arealen. Vergleicht man die Prozentsätze an positiven Nachweisen mit anderen Habitaten so ist von einem hohen Durchseuchungsgrad an BoNT Sporen/Zellen im Nationalparkgebiet auszugehen, sodass es unter günstigen Bedingungen unmittelbar zu einer Toxinbildung kommen kann. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die Saisonen 2000 und 2001 Maden von Kadavern die dominante Toxinquelle in den diversen Lackenbereichen darstellten. Interstitialwasser und Wirbellose aus den Lackensedimenten waren für diesen Zeitraum von untergeordneter Bedeutung, können jedoch als prinzipielle Toxinquelle aufgrund der jetzigen Datenlage nicht ausgeschlossen werden. Interessanterweise zeigten Areale mit hohem histo-

rischem Botulismusrisiko einen deutlich erhöhten Prozentsatz an Giftpotenzialen, was auf eine Anreicherung mit toxischen Clostridien-Sporen/Zellen in diesen Gebieten hindeutet. Erhöhte Sporenkonzentrationen in den diversen Habitaten/Sedimenten erhöhen dabei wiederum das Ausbruchsrisko, da sie unter guten Wachstumsverhältnissen, wie etwa auf Vogelkadavern unter Madenbefall, in kürzester Zeit Toxine produzieren können.

Ökologische Lackencharakterisierung

Unterschiede zwischen den Lacken mit hohem und geringem historischem Botulismusrisiko zeigten sich nicht nur beim Giftpotenzial sondern auch bei einigen ökologischen Parametern. Die pH-Werte und Redoxpotenziale im anoxischen Bereich der Sedimente waren im Oberstinker und Unterstinker signifikant höher als in LL/WL/ZL, während die organischen Gehalte deutlich niedriger waren. Damit in Zusammenhang stehend waren in OS und US die Zellzahlen heterotropher von organischem Material lebenden Bakterien im oxischen und im anoxischen Bereich der Sedimente deutlich niedriger als in LL/WL/ZL. Ebenfalls lagen die Wachstums- und Produktionsraten der heterotrophen Bakterien in OS und US vor allem im anoxischen Bereich deutlich unter jenen der anderen Lacken. Obwohl kein Beleg für das Wachstum von BoNT C1 toxischen Clostridien in "low risk" (OS/US) als auch "high risk" (LL/WL/ZL) Arealen während 2000/2001 gefunden werden konnte, erscheint die Möglichkeit des Wachstums von BoNT C1 toxischen Clostridien in "low risk" Arealen als noch unwahrscheinlicher. Sollte Wachstum und Giftproduktion von toxischen Clostridien dennoch vorkommen (was in 10 % der untersuchten Sedimentproben nicht völlig ausgeschlossen werden konnte: siehe oben), sind zudem in den anoxischen Sedimentschichten des OS/US hohen pH-Werte > 9 der Stabilität potenziell auftretenden freigelösten Botulismus-Neurotoxins abträglich. Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den Lacken mit historisch hohem und niedrigem Botulismusrisiko sind die Anzahl der im Sediment vorkommenden Makrozoobentosorganismen, die bei OS/US signifikant geringer waren als bei LL/WL/ZL. Dies kann in Bezug auf das Ausbruchsrisko von Botulismus von Bedeutung sein, da ein steigendes Nahrungsangebot zu einer erhöhten Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Vögel führt.

Modellvorstellung und Management

Aufgrund der erhobenen Daten konnte für die Saison 2000 und 2001 erstmals ein kausales Erklärungsmodell des Vogelbotulismus an den Lacken des Seewinkels postuliert werden (siehe Langfassung). In dieser Periode wurde der Maden-Kadaver-Zyklus als der dominante Mechanismus erkannt. Aufgrund des kurzen Untersuchungszeitraumes verglichen mit den Zyklen der Vogelbotulismus-Epidemien ist jedoch eine Anpassung dieser Modellvorstellung auf einen längeren Zeitraum notwendig. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die in der Untersuchungsperiode 2000/2001 betroffenen Vogelarten sich von denen in den Jahren mit den massiven Ausbrüchen unter-

schieden. 2000/2001 waren hauptsächlich Möwen, 1982/83 und 1997 vor allem Entenarten betroffen; zudem waren die absoluten Verlustzahlen wesentlich geringer. Dieser Unterschied sollte zukünftig in Hinblick auf die Gültigkeit des postulierten Modells evaluiert werden (z.B. epidemiologische Populationsstudien).

Zwei wesentliche Ansätze für ein Management zur Reduktion des Botulismusrisikos ergeben sich aus dem Modell 2001/2002.

Kurzfristige Aktivitäten: Eine tägliche und rechtzeitige Kontrolle der Lackengebiete und das effiziente Entfernen von Vogelkadavern kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht hoch genug bewertet werden. Besonders zu Zeiten erhöhter Außentemperatur und Madenbildung ist ein sofortiges Entfernen der Kadaver und der oft darunter befindlichen Maden von größter Bedeutung. Maden auf Kadavern in unmittelbarer Nähe zur Wasseranschlagslinie können leicht in das Gewässer gelangen und so eine weitere Verbreitung erfahren.

Beteiligte Mitarbeiter und Institutionen

ENVIRO - Farnleitner, Kirschner & Zechmeister
OEG; Esterhazystr. 35; A-7000 Eisenstadt

Nationalparkverwaltung Neusiedler See-Seewinkel
Apetlonerhof; A-7143 Apetlon
Direktor: Kurt Kirchberger
Finanzielle Abwicklung: Franz Haider
Gebietsbetreuer: Vinzenz Waba, Dieter Hämmerle,
Walter Tschida, Richard Haider, Alois Gangl, Jo-
hann Groß, Anton Bleich.

Biologische Station Illmitz; A-7143 Illmitz
Leiter: Univ. Prof. Dr. Alois Herzig
Wissenschaftl. MitarbeiterIn: Ing. Franz Rauchwar-
ter, Dr. Alfred Grüll, Ing. Jutta Prückler, Ing. Peter
Gisch, Ing. Maria Roisz.

Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene,
Vet.-med. Universität Wien; Veterinärplatz 1;
A-1210 Wien
Leiterin: Univ. Prof. Dr. Renate Rosengarten
Wissenschaftl. MitarbeiterInnen: Mag. Martina
Fuchshuber, Sabine Gruber, Mag. Dr. Peter Much,
Mag. Dr. Joachim Spergser.

Institut für Medizinische Biologie, AG Mikrobiologie,
Universität Wien; Währingerstr. 10, A-1090 Wien
AG-Leiter: Univ. Prof. Dr. Branko Velimirov
Wissenschaftl. Mitarbeiter: Mag. Alexander Eiler.

Bundesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, Abt.
Virologie, Mödling; Robert Kochweg 17; A-2340
Mödling
Abt.-Leiterin: Doz. Dr. Silvia Kölbl
Wissenschaftl. Mitarbeiter: Dr. Flatscher.

Langfristige Maßnahmen: Aufgrund der angetroffenen ökologischen Unterschiede in den Sedimenten der verschiedenen Lackenstandorte und der differierenden Ausbruchswahrscheinlichkeiten, kann zur Zeit davon ausgegangen werden, dass Sediment-Bedingungen wie hohe pH-Werte direkte oder indirekte minimierende Effekte auf das Ausbruchrisiko darstellen. Eine nachhaltige Sicherung der Lackenstandorte im klassischen Sinne (d.h. "Salzstandort") scheint daher zur Minimierung des Ausbruchrisikos beizutragen.

Danksagung

Die Autoren danken allen beteiligten Personen und Institutionen für ihre engagierte Mitarbeit, ohne die die Durchführung des Projektes nicht möglich gewesen wäre.

Institut für Wassergüte der Bundesanstalt für Was-
sergüte, Wien, Schiffmühlenstr. 1, A-1220 Wien
Leiter: HR. Dr. Gerhard Kavka
Wissenschaftl. MitarbeiterIn: Christian Beiwl, Erich
Bötsch, Elfriede Müller.

Institut für Verfahrens-, Umwelttechnik und Techn.
Biowissenschaften; AG Molekulare Ökologie und
Umweltmikrobiologie, TU Wien
Getreidemarkt 9; A-1060 Wien
AG-Leiter: Univ. Prof. Dr. Robert Mach
Wissenschaftl. Mitarbeiter: DI Georg Reischer.

Institut für anorganische Chemie, AG Umwelt-
chemie; Universität Wien
AG-Leiterin: Univ. Prof. Dr. Regina Krachler;
wissenschaftl. Mitarbeit: Mag. Claudia Hurban, DI
Mag. Wolfgang Wesner; Dr. Rudolf Krachler.

National Wildlife Health Center, Madison, USA
Leiterin: Univ. Prof. Dr. Tonie Rocke
wissenschaftl. Mitarbeiterin: Dr. Judy Williamson.

MMag. Angelika Schellander
Marokkanergasse 3; A-1030 Wien.

Dr. Contreras-Lichtenberg
Naturhistorisches Museum, A-1010 Wien

Projekte

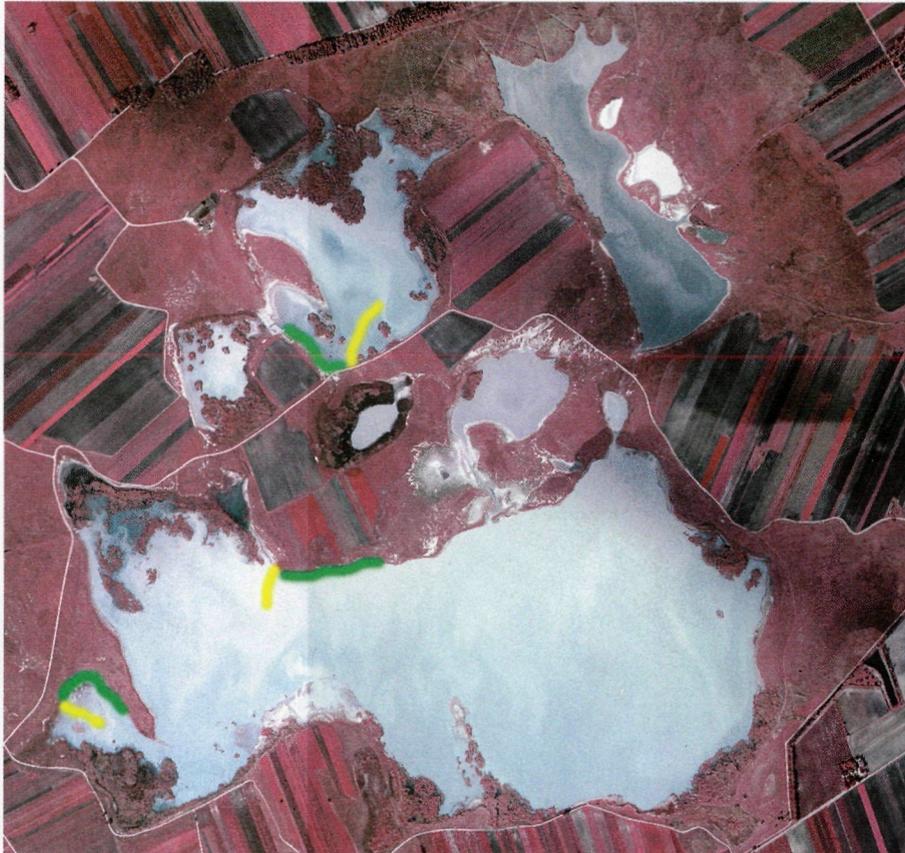
Nationalparkprojekt NP-24
FWF Projekt Nr. GZ 30.792/1-III/A/4/99

6. Literatur

- Azuma, R. & T. Itoh, 1987. Botulism in Waterfowl and Distribution of Botulinum Type C in Japan. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Borland, E.D., C.J. Moryson & Smith, 1977. Avian Botulism and the high prevalence of Clostridium botulinum in the Norfolk Broads. Vet. Rec. 100:106-109.
- Clark, W.E., 1987. Avian Botulism. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Contreras de Vera, A. Garzia-Fernandez, M.J. Cubero Pablo & L. Leon-Vizcaino, 1991. Low prevalence of C. botulinum in spanish wetlands with tidal regime. Vet. Rec. 128:187-188.
- Duncan, R.M. & I.W. Jensen, 1976. A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootology of avian botulism. J. Wildl. Dis. 12:116-127.
- Eiler, A., A.H. Farnleitner, T.C. Zechmeister, A. Herzig, C. Hurban, W. Wesner, R. Krachler, B. Velimirov & A.K.T. Kirschner, 2003. Factors controlling extremely productive heterotrophic bacterial communities in shallow soda pools. Microb. Ecol. 4: 546-555.
- Eklund MW & Dowell VR (1987) Avian botulism. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 405 pp.
- Eklund, M., F. Poysky, K. Oguma, H. Iida & K. Inoue, 1987. Relationship of Bacteriophages to Toxin and Haemagglutinin Production by Clostridium Botulinum Types C and D and its Significance in Avian Botulism Outbreaks. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Fent, K., 1998. Ökotoxikologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 288 pp.
- Foreyt, W.J. & F.R. Abinanti, 1980. Maggot-associated type C botulism in game farm pheasants. Javma 177:827-828.
- Gimanez, D.F. & A.S. Ciccirelli, 1987. Avian Botulism in South America. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield.
- Gossow, H., 1999. Wildökologie: Begriffe, Methoden, Ergebnisse, Konsequenzen. Eigenverlag Dr. N. Knessel, Remagen- Oberwinter, BRD, 269 S.
- Grüll, A., 1983. Erstes gesichertes Auftreten von Wasservogel-Botulismus im Seewinkel-Burgenland. Egretta 26:51-65.
- Grüll, A., G. Rauer & H. Sagmeister, 1987. Ökologische Untersuchung am Wasservogel-Botulismus im Seewinkel (Neusiedler See-Gebiet). Arbeitsgemeinschaft Gesamtkonzept Neusiedler See Forschungsprojekt BC 7a "Botulismus": Endbericht 1984 - 1986.
- Grüll, A. & G. Rauer, 2000. Auftreten von Wasservogel-Botulismus an den Salzlacken des Seewinkels, Burgenland. Egretta 43: 119 - 128.
- Haagsma, J., 1987a. Laboratory Investigation of Botulism in Wild Birds. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Haagsma, J., 1987b. Avian Botulism in the Netherlands. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield.
- Haagsma, J., H.J. Over, T.J. Smith & Hoekstra, 1972. Botulism in waterfowl in the Netherlands in 1970. Netherl. J. Vet. Sci. 5:11-23
- Harrigan, K.E., 1987. Avian Botulism in Australia and New Zealand. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Hatheway, C.L., 1988. Botulism in: A Balows, WJ Hausler, JM Ohashi, A Turano (eds) Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principle and Practice (Volume I). Springer, New York, pp278.
- Hatheway, C.L., 1990. Toxigenic Bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 3:66-98.
- Hatheway, C.L., 1995. Botulism: The Present Status of the Disease. in: C. Montecucco (ed) Clostridial Neurotoxins. Springer, Berlin-Heidelberg, pp 278.
- Hubalek, Z. & J. Halouzka, 1991. Persistence of Clostridium type C toxin in blow fly (Calliphoridae) larvae as possible cause of avian botulism in spring. J. Wildl. Dis. 27: 81-85.
- Hunter, B.F., 1970. Ecology of waterfowl botulism toxin production. Trans. N. Amer. Wildl. Nat. Res. Conf.: 64-72.
- Kaji, R. & G. Sakaguchi, 1980. Chicken botulism. Bull. Res. Soc. Avian Dis. 16: 37-49.
- Kirschner, A.K.T. & B. Velimirov, 1999. Benthic bacterial secondary production measured via simultaneous 3H-thymidine and 14C-leucine incorporation, and its implication for the carbon cycle of a shallow macrophyte-dominated backwater system. Limnol. Oceanogr. 44: 1871-1881.
- Kirschner, A.K.T. & A. Herzig, 2001. Erfassung der relevanten Umweltfaktoren für die Toxinproduktion von BoNT C1 (Botulinum Neurotoxin C1) anhand von Untersuchungen in Mikrokosmen als repräsentative Modellsysteme. Projektendbericht des FWF Projektes Nr. GZ 30.792/1-III/A/4/99.
- Kirschner, A.K.T., A. Eiler, T.C. Zechmeister, B. Velimirov, A. Herzig, R. Mach & A.H. Farnleitner, 2002. Extremely productive microbial communities in shallow saline pools respond immediately to changing meteorological conditions. Environm. Microbiol. 4, 546-555.
- Krachler, Ru., Re. Krachler, E. Milleret & W. Wesner, 2000. Limnochemische Untersuchungen zur aktuellen Situation der Salzlacken im burgenländischen Seewinkel. Burgenländische Heimatblätter 62:3-49.
- Kurazono, H., K. Shimosawa & G. Sakaguchi, 1987. Experimental botulism in pheasants. In: Eklund & Dowell (eds): Avian Botulism, pp 267-281; Thomas, Springfield, Illinois.
- Lee, V.H., S. Valamudi & R.P. Hansson, 1962. Blow fly larvae as a source of botulinum toxin for game farm pheasants. J. Wildl. Man. 26:411-413.

- Jansen, B.C., 1987. Clostridium Botulinum Type C, its Isolation, Identification and Taxonomic Position. in: W. Eklund & V.R. Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Jensen, W.I. & J.I. Price, 1987. The Global Importance of Type C Botulism in Wild Birds. in: WM Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Marion, W.R., T.E. O'Meara, G.D. Riddle & H.A. Berkhoff, 1983. Prevalence of Clostridium botulinum type C in substrates of phosphate-mine settling ponds and implications for epizootics of avian botulism. J. Wildl. Dis. 19: 302-307
- Minton, N.P., 1995. Molecular Genetics of Clostridial Neurotoxins. in: C Montecucco (ed) Clostridial Neurotoxins. Springer, Berlin-Heidelberg, pp 278.
- Mitchell, W.R. & S. Rosendal, 1987. Type C Botulism: The Agent, Host Susceptibility and Predisposing Factors. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Moriishi, K., M. Koura, N. Fujii, Y. Fujinnga, K. Inoue, B. Syuto & K. Oguma, 1996. Molecular Cloning of the Gene Encoding the Mosaic Neurotoxin, composed of Parts of Botulinum Neurotoxin Types C1 and D, and PCR Detection of This Gene from Clostridium botulinum Type C. Appl. Environ. Microbiol. 62:662-667.
- Norland, S. 1993. The relationship between biomass and volume of bacteria, p. 303-307. In Kemp PF, Sherr BF, Sher EB and Cole JJ (Hrsg): Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publ. Boca Raton, USA.
- Quortrup, E.R. & A.L. Holt, 1941. Detection of potential botulinus toxin producing areas in Western duck marshes with suggestions for control. J. Bacteriol. 41: 363-372.
- Quortrup, E.R. & R.L. Kudheimer, 1949. Detektion of botulinum toxin in the bloodstream of wild ducks. J. Am. Vet. Med. Ass. 102, 264 – 266.
- Popoff, M.R., 1995. Ecology of Neurotoxicogenic Strains of Clostridia. in: C Montecucco (ed) Clostridial Neurotoxins. Springer, Berlin-Heidelberg, pp 278.
- Reed, T.M. & T.E. Rocke, 1992. The role of avian carcasses in botulism epizootics. Wildl. Soc. Bull. 20: 175-182.
- Richardson, J.H., G.L. Brewer & L.V. Holdeman, 1965. Type C Clostridium botulinum intoxication in domestic ducks in Georgia. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 146:737.
- Rocke, T.E. & M.D. Samuel, 1999. Water and sediment characteristics associated with avian botulism outbreaks in wetlands. J. Wildl. Managem. 63: 1249-1260.
- Rocke, T.E. & M. Friend, 2000. Avian botulism. in: Filed Manual of Wildlife Diseases: Birds; pp 271-281.
- Ruckdeschel, G., 1992. Gattung Clostridium. in: F Burkhardt (Hrsg) Mikrobiologische Diagnostik. Thieme, Stuttgart.
- Sandler, R.J., T.E. Rocke, M.D. Samuel & T.M. Yuill, 1993. Seasonal prevalence of Clostridium botulinum type C in sediments of a northern California wetland. J. Wildl. Dis. 29: 533-539.
- Schantz, E.J. & E.A. Johnson, 1992. Properties and Use of Botulinum Toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicin. Microbiol. Rev. 56:80-99.
- Simon, M. & F. Azam, 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. Mar.Ecol.Prog.Ser.51: 201-213.
- Smart, J.L., T.A. Roberts & L. Underwood, 1987. Avian Botulism in the British Isles. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Smith, L.D.S., 1975. The pathogenic anaerobic bacteria. Thomas, Springfield, pp 331.
- Smith, L.D.S., 1977. Botulism - The organism, its toxins, the disease. American Lecture Series, Publ. No 997, Springfield, Illinois; 235 pp.
- Westphal, U., 1991. Botulismus bei Vögeln. Aula Verlag Wiesbaden, 100 pp.
- Williamson, J.L., T.E. Rocke & J.M. Aiken, 1999. In-situ detection of the clostridium botulinum type C1 toxin gene in wetland sediment with a nested PCR assay. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3240-3243.
- Wobeser, G.A., 1987. Control of Botulism in Wild Birds. in: MW Eklund & VR Dowell (eds) Avian Botulism: An International Perspective. Thomas, Springfield. 405pp.
- Wobeser, G.A., 1988. Effects of botulism on ducks drinking saline water. J. Wildl. Dis 24: 240-245.
- Wobeser, G.A., 1997. Avian botulism - another perspective. J. Wildl. Dis. 33: 181-186.
- Zechmeister, T.C., A.H. Farnleitner, T.E. Rocke, F. Pittner, R. Rosengarten, R.L. Mach, A. Herzig & A.K.T. Kirschner, 2002. PCR and ELISA - in vitro alternatives to the mouse bioassay for assessing the botulinum neurotoxin C1 production potential in environmental samples. ALTEX 19, Suppl. 1: 49-54.
- Zechmeister, T.C., A.K.T. Kirschner, M. Fuchsberger, S.G. Gruber, R. Rosengarten, F. Pittner, A. Herzig, T.E. Rocke, R.L. Mach & A.H. Farnleitner, 2002. Relationship between Botulinum Neurotoxin C1 Gene, Protein and Corresponding Mouse Toxicity in Environmental Samples from Low and High Risk Botulism Areas. Appl. Environ. Microbiol., submitted.

7. Anhang



Anhang I: Luftbild von westlicher Wörthenlacke (oben) und Lange Lacke (unten) mit den eingezeichneten Bereichen für die Fäkalientaxierung (grüne Linie) und für den Verlauf der Wasseranschlagslinie (gelbe Linie) während des Untersuchungszeitraumes 2000 - 2001. Lange Lacke - nördlicher Bereich: Todesstrand (LLTS); Lange Lacke - westlicher Bereich: Sauspitz (LLSS); Luftbild oben nach Norden orientiert.



Anhang II: Luftbild der Zicklacke mit den eingezeichneten Bereichen für die Fäkalientaxierung (grüne Linie) und für den Verlauf der Wasseranschlagslinie (gelbe Linie) während des Untersuchungszeitraumes 2000 - 2001. Luftbild oben nach Norden orientiert.



Anhang III: Luftbild des Unteren Stinkers mit den eingezeichneten Bereichen für die Fäkalientaxierung (grüne Linie) und für den Verlauf der Wasseranschlagslinie (gelbe Linie) während des Untersuchungszeitraumes 2000 - 2001. Luftbild oben nach Norden orientiert.



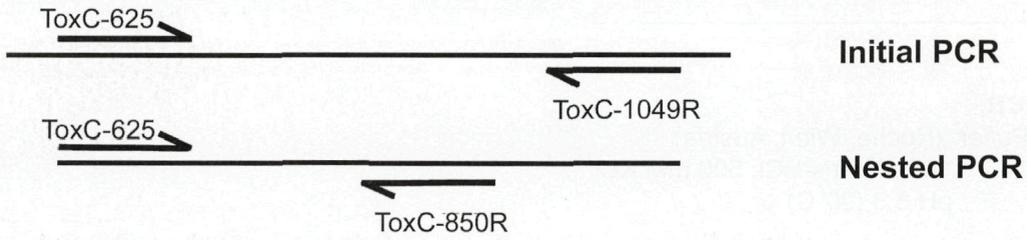
Anhang IV: Luftbild des Oberen Stinkers mit den eingezeichneten Bereichen für die Fäkalientaxierung (grüne Linie) und für den Verlauf der Wasseranschlagslinie (gelbe Linie) während des Untersuchungszeitraumes 2000 - 2001. Luftbild oben nach Norden orientiert.



Anhang V: Luftbild des Schilfgürtels nahe der Biologischen Station mit den eingezeichneten Bereichen für die Fäkalientaxierung (grüne Linie) und für den Probenahmeort (gelb) während des Untersuchungszeitraumes 2000 - 2001. Luftbild oben nach Norden orientiert.

Richtung	Primer	Sequenz
Sense	ToxC-625	5'625CTAGACAAGGTAACAACACTGGGTTA6483'
Antisense	ToxC-850R	5'850GAAAATCTACCCTCTCCTACATCA8273'
	ToxC-1049R	5'1049AATAAGGTCTATAGTTGGACCTCC10263'

Anhang VI: Oligonukleotid-Primer für PCR Analyse des *C. botulinum* C1 Toxin Genfragments. Die Position der Primer ist durch den Namen festgelegt, die Numerierung erfolgte nach dem publizierten Stamm 468 C (GenBank, no X53751) (nach: WILLIAMSON ET AL., 1999)



Anhang VII : Ablauf der Initial PCR und der Nested PCR

Initial PCR - Mastermix

Mix 1:	8 µl 10x PCR-Puffer	Mix 2:	2,0 µl 10x PCR-Puffer
	12 µl 25mM MgCl ₂		0,5 µl Polymerase
	2 µl 10mM dNTPs		17,5 µl dd H ₂ O
	12 µl 5µM Primer ToxC-625		
	12 µl 5µM Primer ToxC-1049R		
	2 µl BSA (20 mg/ml)		
	22 µl dd H ₂ O		
	10 µl DNA-template		
	<hr/>		
	80 µl Mix		20,0 µl Mix

Nested PCR - Mastermix

Mix 1:	8 µl 10x PCR-Puffer	Mix 2:	2,0 µl 10x PCR-Puffer
	12 µl 25mM MgCl ₂		0,5 µl Polymerase
	2 µl 10mM dNTPs		17,5 µl dd H ₂ O
	12 µl 5µM Primer ToxC-625		
	12 µl 5µM Primer ToxC-850R		
	34 µl dd H ₂ O		
	3 µl DNA-template (initial PCR)		
	<hr/>		
	80 µl Mix		20,0 µl Mix

Reagenzien für PCR

10x PCR-Puffer: (Roche, Wien, Austria)
100mM Tris-HCl, 500 mM KCl
pH 8,3 (20°C)

MgCl₂-Puffer: 25mM MgCl₂ (Roche, Wien, Austria)

PCR Nucleotid Mix (dNTPs): (Roche, Wien, Austria)
10mM von jedem Nukleotid; pH 8.3

BSA: 20 mg/ml (Roche, Wien, Austria)

Polymerase: 3,5 x 10³ units/ml (Expand High Fidelity PCR-System from Roche, Wien, Austria)

Primer: ToxC-625 (VBC Genomics, Wien, Austria)
ToxC-850R (VBC Genomics, Wien, Austria)
ToxC-1049R (VBC Genomics, Wien, Austria)

Amplifikationsprofil

Initial PCR:

Hot Start: 95°C - 3 min (Denaturation)
80°C - 8 min (Hinzufügen von Mix 2 inkl. Polymerase)
30 Amplifikationszyklen
Denaturation: 95°C - 30 sec
Annealing: 56°C - 30 sec
Elongation: 72°C - 1min 30 sec

Nach dem letzten Zyklus

72°C - 10 min
4°C - bis Entnahme

Bei jedem Zyklus wurde die Annealing-Temperatur um 0,1 °C reduziert (Touch-Down-Approach).

Nested PCR:

Hot Start: 80°C - 8 min (Zusatz von Mix 2 inkl. Polymerase)
15 Amplifikationszyklen
Denaturation: 95°C - 30 sec
Annealing: 56°C - 30 sec
Elongation: 72°C - 1min 30 sec

Nach dem letzten Zyklus:

72°C - 10 min
4°C - bis Entnahme

Bei jedem Zyklus wurde die Annealing – Temperatur um 0,2 °C reduziert (Touch-Down-Approach).

Anhang VIII - Teil 2: Reaktionscocktails und Thermocycler-Prozesse



Anhang IX: Adulte Lachmöwe *Larus ridibundus* mit beginnender Lähmung. Der Vogel kann nicht mehr stehen, stützt sich aber noch mit den Flügeln ab.



Anhang X: Spießente *Anas acuta* (Erpel im Schlichtkleid) mit fortgeschrittener Lähmung der Füße und Flügel. Der Hals kann noch aufrecht gehalten werden, die Augen sind noch geöffnet.



Anhang XI: Sterbende juvenile Lachmöwe *Larus ridibundus*. Die Augen sind halb geschlossen.



Anhang XII: Frisch verstorbene juvenile Lachmöwe *Larus ridibundus*. Der Kopf ist nach vorne gefallen, die Augen sind geschlossen



Anhang XIII: Nach Lähmung des Halses folgt der Tod oft durch Ertrinken (juvenile Graugans *Anser anser*).



Anhang XIV: Während eines Ausbruches werden die anfallenden Vogelkadaver regelmäßig aufgesammelt und entsorgt.