

## Abschlussbericht

(gemäß BNBest-BMBF 98 Nr. 3.2)

Zuwendungsempfänger:  Leibniz Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW), 18119 Rostock	Förderkennzeichen:  03F0480E
Vorhabenbezeichnung:  MIMAS - Mikrobielle Interaktionen in marinen Systemen	
Berichtszeitraum und Laufzeit des Vorhabens:  1.10.2008 – 31.12.2011	

### I. 1. Aufgabenstellung

Die zentralen Bereiche der Ostsee sind gekennzeichnet durch lang anhaltende Phasen der Sauerstoffverarmung im Tiefenwasser, unterbrochen durch Einstromereignisse mit Nordseewasser. Die Ostsee dient als gut untersuchtes Modellsystem für Küsten- und Randmeere mit periodischer Anoxie - ein Phänomen, dessen Intensität und Dauer in direktem Zusammenhang mit Hydrographie, klimatischen Faktoren sowie anthropogen bedingter Eutrophierung steht.

In den oxisch-anoxischen Übergangsbereichen (Redoxkline) finden eine Reihe mikrobiell katalysierter biogeochemischer Umsätze statt, welche die Nährstoffkreisläufe (u.a. N, S, Spurenmetalle) ökosystemweit beeinflussen. Für mehrere wichtige Prozesse existierten Ratenmessungen, die zugrundeliegenden regulierenden Mechanismen und die dafür verantwortlichen Organismen waren aber, bis auf den Schlüsselorganismus der chemoautotrophen Denitrifikation „*Sulfurimonas gotlandica*“ str. GD1, größtenteils noch unbekannt.

Der Standort Redoxkline Gotlandtief war daher ideal geeignet, um mit Hilfe der Metagenomik, Metatranskriptomik und Metaproteomik die Funktionsweise der mikrobiellen Biozönose besser zu verstehen. Ziel war, funktionelle und phylogenetische Markergene und damit verantwortliche Schlüsselorganismen zuzuordnen sowie bisher nicht verstandene Stoffwechselwege zu identifizieren. Ökophysiologische Untersuchungen an „*Sulfurimonas gotlandica*“ sollten in diesem Zusammenhang der Evaluierung der Expressionsanalysen sowie der Identifizierung von Markergenen und -proteinen, welche auch für *in situ* Analysen

benutzt werden können, dienen. In Zusammenführung etablierter sowie neuer Techniken erhoffen wir uns, sowohl die Funktionsweise dieser mikrobiellen Biozönose besser zu verstehen, als auch ein zukünftiges sensitives Umweltmonitoring zu ermöglichen.

## 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das IOW besitzt eine lange Tradition im Monitoring und Studium chemischer, geologischer und physikalischer Prozesse in der Ostsee. Diese Daten werden soweit als möglich mit der ebenfalls am IOW etablierten Ökosystemmodellierung verknüpft. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen liegt bereits seit etwa 10 Jahren im Gotlandtief, der zentralen Station in der Gotlandsee, für die lange Messreihen verschiedener Parameter existieren.

Grundlegende Erkenntnisse zur potenziellen Bedeutung von Mikroorganismen als Katalysatoren des Stickstoff-, Schwefel-, und Kohlenstoffkreislaufs der zentralen Ostsee konnten daher bereits über Stimulationsexperimente, Ratenmessungen, Diversitätsstudien und molekulare Analysen gewonnen werden. In Bezug auf autotrophe Denitrifikation wurde dabei deutlich dass primär ein Epsilonproteobakterium, phylogenetisch am nächsten verwandt mit *Sulfurimonas* (früher *Thiomicrospira*) *denitrificans*, dafür verantwortlich ist. Aus dem Gotlandtief konnte der entsprechende Organismus isoliert werden (Stamm GD1, „*Sulfurimonas gotlandica*“). Die Genomsequenzierung von GD1 wurde von der *Gordon & Betty Moore Foundation* eingeworben, die Daten in Zusammenarbeit mit dem MPI Bremen ausgewertet.

Durch die Kooperation mit den anderen MIMAS-Partnern in Bremen und Greifswald war die Expertise für Proteom- und Genomanalysen an dem Modellorganismus „*S. gotlandica*“ GD1 wie auch für den Modellstandort Gotlandtief (Metaproteom, Metagenom) gegeben, was auch die Analyse von „next generation sequencing“ Daten umfasst.

Dies konnte als Rahmen zur Untersuchung mikrobieller Diversität und Funktionen in verschiedenen Redoxklinen der zentralen Ostsee genutzt werden.

## 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

**Personal:** Die Postdocstelle konnte ab Februar 2009 mit Dr. Bruckner besetzt werden.

**Ablauf:** Zum Erreichen der Projektziele mussten zunächst geeignete Techniken der Extraktion, Aufbereitung und Konservierung mikrobieller DNA/Proteine an Reinkulturen etabliert und validiert werden. Weitere Versuche an marinen Modellkulturen des Epsilonproteobakteriums „*Sulfurimonas gotlandica*“ dienten der Erstellung detaillierter Proteomprofile für wechselnde Stoffwechselsubstrate. Auf dieser Basis wurden schließlich

die Metagenom- und Expressionsprofile des Gotland-Tiefs aufgenommen in Beziehung zu Kulturexperimenten gesetzt, und grundlegende Aussagen zur ökologischen Rolle mikrobieller Gemeinschaften in pelagischen Redoxklinien ermöglicht.

#### **4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Untersuchungen der letzten Jahre durch die Gruppe mikrobielle und molekulare Ökologie am IOW haben einen sehr guten Wissensstand bezüglich der chemischen, physikalischen und biologischen Daten der pelagischen Redoxklinien der zentralen Ostsee geschaffen. Außerdem sind uns die wichtigsten prokaryontischen Schlüsselorganismen bekannt, für welche spezifische Sonden (CARD-FISH) zur Detektion und Quantifizierung entwickelt wurden. Andere Methoden, wie RNA-Stable Isotope Probing und die Kombination aus Mikroautoradiographie und CARD-FISH haben Einblicke in funktionale Zusammenhänge ermöglicht. Damit war zu Beginn des MIMAS-Projektes bekannt, welche Tiefen im pelagischen Sauerstoffgradienten beprobt werden mussten, und welche Abundanzen der verschiedenen Bakterien- und Archeengruppen zu erwarten waren.

Ein breites Spektrum von molekularen Techniken, welche zur Diversitätsanalyse mariner Mikroorganismen benutzt werden, stand dem Projekt über die molekularbiologischen Labore des IOW zur Verfügung. Dazu gehört beispielsweise die Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung, verschiedene RNA- und DNA Fingerprinttechniken und Protokolle zur Extraktion und Amplifizierung von mRNA. Im Rahmen des WGL-Pakt-Projektes „RNA – Expression aquatischer Lebensgemeinschaften (REAL)“ wurde ein *in situ*-Fixiersystem entwickelt, welches die Genexpressionsmuster pelagischer Proben stabilisiert und erhält. Auf dieses bei den Forschungsfahrten eingesetzte System, mit dem sich insbesondere die oxisch-anoxischen Übergangszonen beproben ließen, besaß MIMAS Zugriff. Dennoch wurde für den Modellstandort Gotlandtief die Technik zur reproduzierbaren Probenahme und Konservierung von Nukleinsäuren und Proteinen vor Ort weiter optimiert bzw. erst etabliert.

Insgesamt sind waren damit sowohl der wissenschaftliche Kenntnisstand bezüglich des Untersuchungsgebiets als auch die methodisch-technischen Voraussetzungen gegeben, um eine erfolgreiche Arbeit im MIMAS-Projekt zu ermöglichen und mit der Anwendung der verschiedenen „omics“-Techniken einen Schritt weiter zu gehen in unserem Verständnis der Funktionsweise mikrobieller Gemeinschaft in pelagischen Redoxgradienten.

#### **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

National

- Pharmazeutische Biotechnologie, Institut für Pharmazie, Universität Greifswald (Schweder, proteomics)
- MPI Bremen (Teeling, Glöckner, bioinformatics)
- Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) Braunschweig (Overmann, genomics)

International

- Universität Wien (Herndl, Winter, marine microbial ecology)
- Institut de Ciències del Mar-CMIMA, CSIC, Barcelona (Massana, marine microbial eukaryotes)

**II. 1. Erzielte Ergebnisse, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele**

Ziele und Meilensteinplan

Ziele und Meilensteinplan (aus dem Antrag)

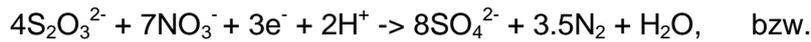
Meilensteine	Förderhalbjahre					
	1	2	3	4	5	6
<b>Probenahme Redoxkline Gotlandtief</b>						
Etablierung einer Technik zur reproduzierbaren Probenahme und -konservierung						
Probenahme Redoxkline Gotlandtief						
Bestimmung biogeochemische Umsatzraten						
Quantifizierung funktioneller Transkripte						
<b>Schlüsselorganismus GD1</b>						
Ökophysiologische Untersuchungen im Chemostat						
Auswertung der Transkriptomikdaten						
Probenahme Gotlandtief: Funktioneller Grunddatensatz <i>in situ</i> (biogeochemisch, qPCR)						
<b>Metagenomik</b>						
Erstellung und Analyse der Metagenombibliotheken der Umweltproben (in Zusammenarbeit mit TP 3)						
<b>Metatranskriptomik</b>						
Analyse der Metatranskriptomikdaten zu GD1 (in Zusammenarbeit mit TP 2)						
<b>Metaproteomik</b>						
Analyse der Metaproteomdaten zu GD1 (in Zusammenarbeit mit TP 1)						
<b>Klimarelevante Simulationsexperimente mit Standortwasser</b>						
Bestimmung biogeochemische Umsatzraten						
Quantifizierung funktioneller Transkripte						
<b>Allgemeine Arbeiten</b>						
Publikation der Ergebnisse						

**1) Probenahme Redoxkline Gotlandtief**

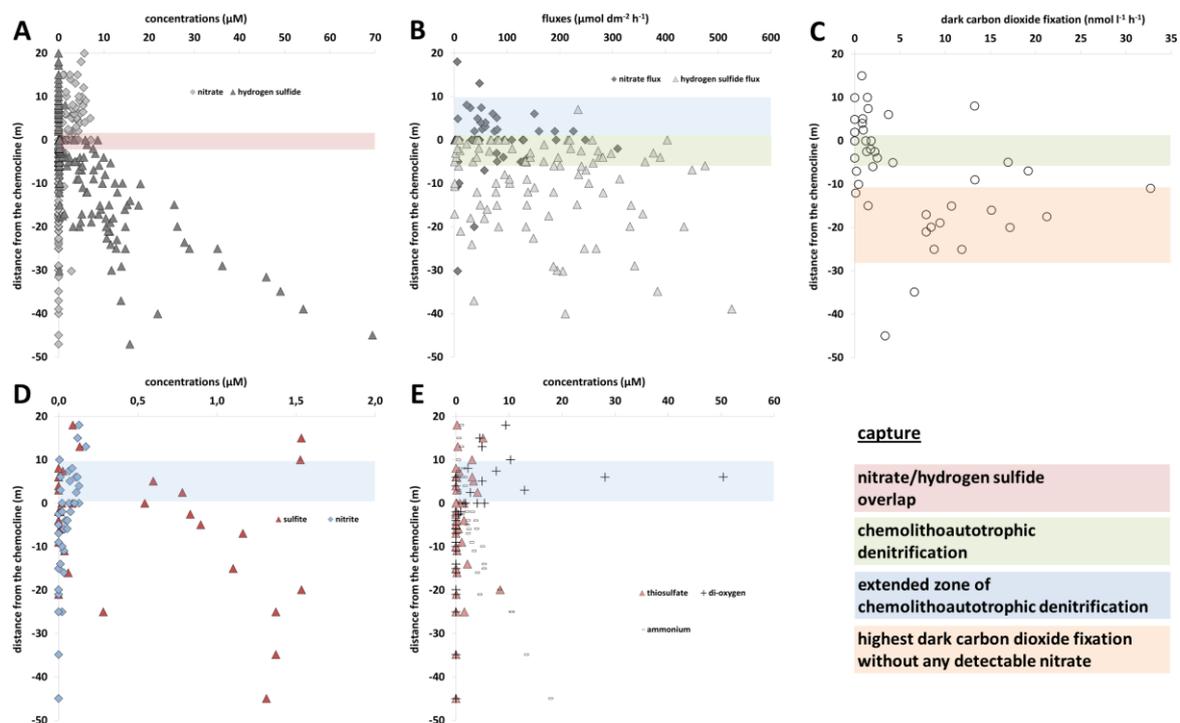
Probenahmen, Optimierung von Probenahmetechniken sowie Konservierung von Proben aus dem Gotland-Becken wurden wie geplant auf den Forschungsfahrten des FS Poseidon (P370, 2008) und des FS Maria S. Merian (MSM12/4b, 2009), durchgeführt. Dabei konnten relevante funktionelle Transkripte, wie z.B. *amoA* als Indikator für mikrobiell katalysierte Ammoniumoxidation, quantifiziert werden (Feike et al., 2012). Stickstoff-, Kohlenstoff-, und Schwefelumsatzraten wurden bestimmt und die Rolle chemolithoautotropher Denitrifikation in pelagischen Redoxklinen der zentralen Ostsee evaluiert (Bruckner et al., in Revision).

## 2) Schlüsselorganismus GD1

In diesem Projektabschnitt konnte das wichtige Modellbakterium pelagischer chemosynthetischer Epsilonproteobakterien, „*Sulfurimonas gotlandica*“ GD1, genomisch und physiologisch weiter charakterisiert werden. Resultate aus Laborexperimenten mit Reinkulturen ergaben, dass pro fixiertem CO<sub>2</sub>-Molekül folgende Umsätze während der chemolithotrophen Denitrifikation stattfanden:



Im Vergleich mit dem genomischen Potential dieses Organismus konnten wir schlussfolgern, dass maximal 13% der über Denitrifikation gewonnenen Energie für CO<sub>2</sub>-Fixierung (zu PEP) verwendet wurde. Mittels der *in vitro* gefundenen Stöchiometrie zwischen CO<sub>2</sub>-Fixierung und Substratumsatz während der Denitrifikation konnten wir damit die Rolle der chemolithoautotrophen Denitrifikation im Freiland durch *Sulfurimonas* über die *in situ* CO<sub>2</sub>-Fixierung quantitativ abschätzen (Abb. 1).



**Abbildung 1:** *In situ* Schwefelwasserstoff und Nitrat Konzentrationen (A), Schwefelwasserstoff und Nitrat Flüsse (B), Kohlendioxid Dunkel-Fixierung (C), Sulfid und Nitrit Konzentrationen (D) und Thiosulfat, Sauerstoff und Ammonium Konzentrationen (E) in Ostsee Redoxgradienten im Bezug zu ihrer Entfernung zur Chemokline (erstmaligen Auftreten von Sulfid). Theoretisch konnte chemolithotrophe Denitrifikation nur in der Überlappungszone von Nitrat und Schwefelwasserstoff stattfinden (A), hier in Rot markiert. Kohlendioxidfixierung (C) in der gestrichelten Zone wurde von überlappenden Nitrat und Schwefelwasserstoffflüssen begleitet (B), hier in grün markiert (B,C). Schwefelwasserstoff wurde hier nur teilweise neutralisiert, folglich sollte chemolithotrophe Denitrifikation auch außerhalb dieser Zone stattfinden, eventuell in suboxischen Bereichen (blau markiert (B,D,E)), wo Sulfid (D) und Thiosulfat (E) als alternative Elektronen-Donoren genutzt werden konnten. Geringe