

Das Frühjahrmikrobiom der südlichen Nordsee: Bacterioplankton-Sukzessionen und bakterielle Polysaccharidverwertung in einem Küstenmeer

Rudolf Amann

Zusammenfassung

Mikroorganismen sind im Meer als zentrale Katalysatoren wichtiger biogeochemischer Kreisläufe unverzichtbar. So wird ein Großteil des durch Photosynthese in Mikroalgen fixierten Kohlendioxids bei deren Absterben durch heterotrophe Bakterien wieder freigesetzt. Die Wechselwirkungen von Phytoplankton und Bacterioplankton sind dabei komplex. Wir untersuchen seit vielen Jahren mit Kultivierung und kultivierungsunabhängigen Methoden das Mikrobiom der Deutschen Bucht in der südlichen Nordsee. Die vergleichende Sequenzierung phylogenetischer Marker, wie der 16S-rRNA-Gene, detektiert Tausende von Bakterienarten. Durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und Metagenomsequenzierung konnten wir im Mikrobiom eine substratgetriebene Sukzession von Bakterien aus den Gruppen der Bacteroidetes und Gammaproteobacteria zeigen, die jedes Jahr vom Zusammenbruch der Frühjahrsalgenblüte induziert wird und sehr schnell die vor allem aus Polysacchariden bestehende Biomasse abbaut. Bei der Analyse der Bacteroidetes-Genome identifizierten wir polysaccharide utilization loci (PULs), die für die Bindung, den Transport und den Abbau von Polysacchariden, wie dem Laminarin, dem Speicherstoff der Diatomeen, kodieren. Vergleichende Genom- und Metagenomstudien zeigen jetzt, dass es einige wenige Arten von Bacteroidetes mit klar definierten PULs gibt, die sich auf die effiziente Verwertung der häufigen Algenpolysaccharide spezialisiert haben und deren Auftreten deterministischen Mustern folgt, wie wir sie auch aus Darmmikrobiomen kennen.

Summary

The microbiome of the southern North Sea in spring: succession of bacterioplankton and bacterial polysaccharide utilization in coastal waters

In the oceans, microbes are the central catalysts of important biogeochemical cycles. A major part of the carbon dioxide fixed by the photosynthesis of microalgae upon their decay is mineralized by heterotrophic bacteria, with complex interactions between the phytoplankton and the bacterioplankton. In a long-term project, we are investigating the microbiome of the southern North Sea by both cultivation and cultivation-independent methods. The comparative sequencing of phylogenetic markers, such as the 16S rRNA genes, revealed thousands of bacterial species. By fluorescence *in situ* hybridization and metagenomics, we could identify a substrate-induced annual succession of bacteria from the taxa Bacteroidetes and Gammaproteobacteria that bloom following the collapse of the spring phytoplankton bloom. These taxa rapidly degrade the biomass, which consists mainly of polysaccharides. The comparative analysis of Bacteroidetes genomes revealed polysaccharide utilization loci (PULs) that encode the binding, transport and degradation of polysaccharides such as laminarin, the central storage compound of diatoms. Comparative genome and metagenome studies are now indicating that only a few species of Bacteroidetes with defined PULs have specialized for the efficient utilization of the abundant algal polysaccharides. The occurrence of these species follows deterministic patterns similar to those known from gut microbiomes.

✉ Prof. Dr. Rudolf Amann, Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Abteilung Molekulare Ökologie, Celsiusstraße 1, 28359 Bremen; ramann@mpi-bremen.de

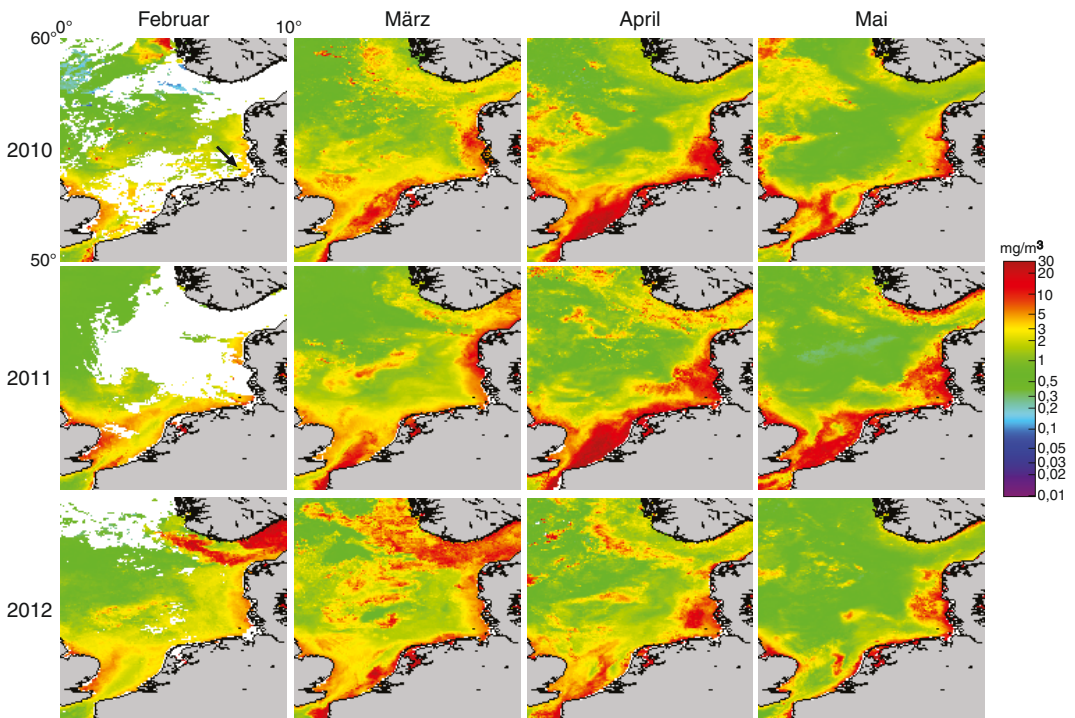
Einführung

Von der südlichen Nordsee habe ich Ihnen heute ein Sandkorn mitgebracht, 0,3 mm im Durchmesser und vor Helgoland in ein paar Metern Wassertiefe entnommen, überzogen von 100 000 Bakterien. Das ist nicht weiter verblüffend, weiß man doch, dass Oberflächen in der Umwelt von Biofilmen bewachsen sind. Aber wir waren komplett verblüfft, als wir auf solch einem Sandkorn fast 10 000 Arten gefunden haben (Probandt et al. 2018). Wenn wir von der taxonomischen Identifizierung auf die biochemischen Prozesse in diesem Sandkorn extrapolieren, so können wir sicher sein, dass alle Prozesse, die wir für das Leben auf der Erde brauchen, auf diesem Sandkorn sind: Photosynthese, Heterotrophie, der gesamte Stickstoffkreislauf, der Phosphor- und der Schwefelkreislauf.

Wenn wir im Frühjahr von Cuxhaven nach Helgoland, unserem Hauptuntersuchungsgebiet, fahren, sind in 1 mL Meerwasser so viele

Bakterien enthalten wie Menschen in München leben, etwa 1,5 Millionen. Im Winter sind es nur 0,5 Millionen pro mL Meerwasser; im Frühjahr ist die Zahl der Archaeen eher gering, im Herbst höher. Im Meeresboden ist die Dichte 1000-mal höher, in 1 cm³ leben 1 Milliarde oder mehr Bakterien und Archaeen. Global betrachtet ist das um Größenordnungen mehr als alles, was im »klassischen« Mikrobiom, der Darmflora, zu finden ist. Das heißt, die großen Prozesse, die die Erde bewohnbar halten, laufen im Boden und im Wasser ab. Allein jedes zweite Sauerstoffmolekül, das wir einatmen, stammt aus der marinen Photosynthese.

Als Taxonomen sind wir in einem Dilemma: Wir haben in der Umwelt bereits Millionen verschiedener rRNA-Gensequenzen (»Fingerabdrücke«) gefunden, wobei diese Zahl inzwischen nicht mehr exponentiell zunimmt (Yarza et al. 2014). Die aktuellen Schätzungen, die ich für realistisch halte, gehen von 10⁷ bis 10⁸ Spezies von Bakterien und Archaeen aus. Aber wir haben erst



GlobColour Europe: extended Europe area at full resolution (1 km) – merged products using weighted average of the following sensors: MERIS, MODIS AQUA, SeaWiFS and VIIRS; shown are monthly averages; See GlobColour website for details (<http://hermes.acri.fr>).

Abb. 1. Satellitenaufnahmen der Frühlingsblüten (Chlorophyll a: mg/m³) in der südlichen Nordsee, 2009–2012, Monatsmittelwerte Februar bis Mai; weiße Punkte: in 1 Monat kein Überflug, der ein Bild der Meeresoberfläche geliefert hat; blauer Punkt (Pfeil): Helgoland. – © Teeling et al. (2016), CC BY 4.0.

14 000 Arten valide mit Art- und Gattungsnamen beschrieben, was in meinen Augen inakzeptabel ist. Wir können nicht nur mit Zahlen leben, wir können nicht Millionen von Mikroorganismenarten nur mit Buchstaben oder Zahlen belegen – wir brauchen als Menschen für die wichtigen Dinge Namen, Beschreibungen und Tiefe.

Erforschung der Mikrobiome

Wie heute bereits geschildert worden ist (vgl. Beitrag Wagner [2019] in diesem Band), wird Mikrobiomforschung auf zwei Ebenen durchgeführt: Zum einen über das Gen für die 16S-rRNA, einem ausgezeichneten phylogenetischen Marker, der sehr gut für Gattungen und höhere taxonomische Ebenen anwendbar ist. Wir haben durch die Sequenzierung der 16S-rRNA-Gene gelernt, dass wir nur einen Bruchteil, weniger als 1 %, von dem kennen, was in der Umwelt vorhanden ist. Aber letztlich betreiben wir damit Mikrobiomforschung mit nur einem Gen. Das heißt, von den jährlich etwa 6000 Veröffentlichungen über Mikrobiome beziehen sich vermutlich 5900 auf nur ein Gen, nämlich das der 16S-rRNA. Der Rest bezieht sich auf Genome. Wir können in der Definition nach Lederberg (2004; vgl. S. 18, Beitrag Wagner [2019] in diesem Band) durchaus in einem Mikrobiom die Summe der Genome – also das Metagenom – sehen. Das eröffnet uns die gesamte Bandbreite.

Wir sind heute in einer Phase, in der zumindest die großen Arbeitsgruppen über die Metagenomik nicht nur die Artenvielfalt beschreiben, sondern auch Funktionsvorhersagen machen können, und daher sollten wir nicht steckenbleiben im ewigen Wiederholen der 16S-rRNA-Genanalysen, so unübertroffen die 16S-rRNA als Molekül bei der taxonomischen Vorhersage auch ist. Wir dürfen jedoch nicht vergessen, dass wir dabei Umweltmetagenome mit Genomen von Reinkulturen auf Basis einer Datenbank vergleichen. Sehr viel von unserem Wissen, worauf wir annotieren, stammt von der Reinkultur. Das heißt, obwohl heute über große Sequenziermaschinen kultivierungsunabhängig sehr viel sehr schnell beschrieben werden kann, basiert das Wissen und die Prognosefähigkeit auf der »echten« Mikrobiologie der letzten hundert Jahre.

Mariner Kohlenstoffkreislauf

Kommen wir zurück zur südlichen Nordsee. Abbildung 1 zeigt integrierte Satellitenüberflüge mit Chlorophyll-a-Messungen in Falschfarben: Rot bedeutet viel, Grün wenig Chlorophyll a; Weiß bedeutet, dass es in einem Monat wegen Wolken kein Bild gab (Teeling et al. 2016). Man erkennt deutlich einen jahreszeitlichen Rhythmus bei den Algenblüten, der sowohl räumlich als auch vom Ablauf her unterschiedlich verläuft. Diese Blüten sind wichtig. Ich habe bereits erwähnt, dass die Hälfte des Sauerstoffs aus dem Meer stammt. Jährlich werden etwa 50 Gt (10^9 t) an Photosyntheseprodukten im Meer gebildet, von denen der weit überwiegende Teil wieder veratmet wird.

Wenn wir stark vereinfachend davon ausgehen, dass alles, was die Algen herstellen, Polysaccharide sind (Glucoseverbindungen und ähnliche Polysaccharide), und wenn davon ein bestimmter Teil in die Sedimente absinken würde, hätten wir keinerlei Problem mit der globalen Erwärmung, da dies die biologische Pumpe ist, die das CO_2 aus der Atmosphäre saugt und in den Meeresboden einbringt. Aber wenn das Meer tief ist, werden 99 %, wenn es flach ist, etwa 90 % der gelösten Polysaccharide schon in der Wassersäule von heterotrophen Bakterien wieder zu CO_2 zurückverwandelt. Die Nahrungskette von den Mikroalgen bis zu den Fischen und zum Fischfang sei in dieser Betrachtung ebenfalls ausgeblendet. Wir konzentrieren uns im Folgenden sozusagen auf eine Welt, die aus Algen besteht, die zuckerhaltiges Futter für Bakterien sind, weil darüber der große Teil des marinen Kohlenstoffkreislaufs abläuft.

Marine Polysaccharide unterscheiden sich von denen der Landpflanzen. Etwa 40 % bis 70 % der organischen Algentrockenmasse bestehen aus Polysacchariden, der Rest sind vor allem Proteine, Lipide und Nukleinsäuren. Die Zuckerfraktion ist strukturell extrem divers, ihre Zusammensetzung ist noch wenig verstanden. Als Speicherstoff dient nicht Stärke (α -1,4- und α -1,6-Glucan), sondern v. a. Laminarin, ein β -1,3- und β -1,6-Glucan. Als strukturelle Komponenten in den Zellwänden treten v. a. Mannan und z. T. Chitin auf, eher selten Cellulose. Auch geben Algen über ihr gesamtes aktives Leben Exsudate ab, die ihre Oberfläche von Bakterien freihalten,

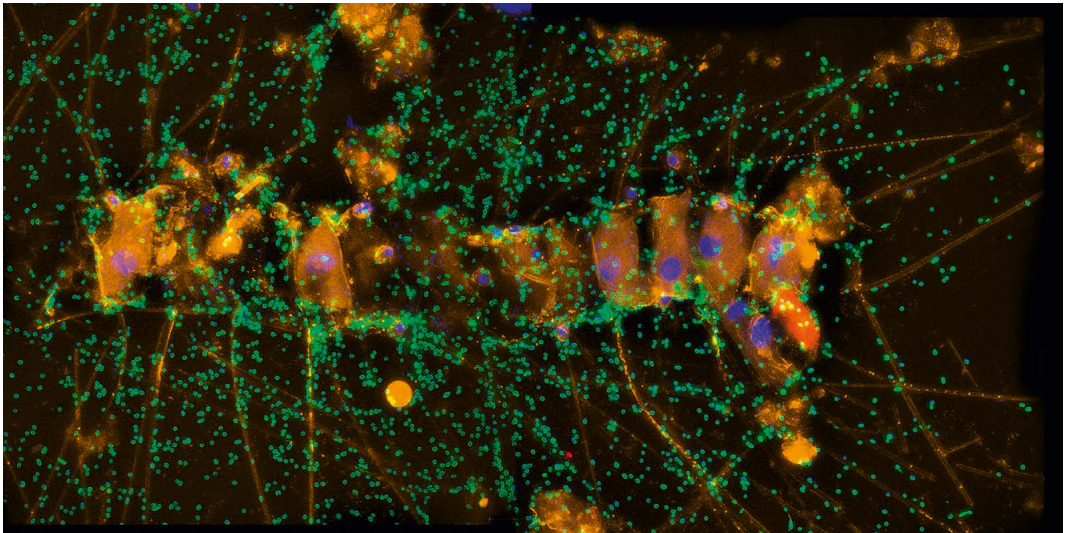


Abb. 2. Absterbende Kieselalgen *Chaetoceros* spec. (gelb: Fucoseeinheiten, durch Lektine angefärbt zur Sichtbarmachung der Zellumrisse; blau: Zellkerne) und sich von ihnen ernärende, Polysaccharid-abbauende Bakterien (Flavobacteriia) (grün, identifiziert über Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung). Kieselalgen: ca. 30 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, Bakterien ca. 1 $\mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$. – Foto: Insa Bakenhus, MPI Bremen.

sog. transparente Exopolymere (TEP): hochkomplexe Zucker, die z. T. mit Seitengruppen sulfatiert (Fucoidane) oder methyliert sind, deren genaue Struktur wir aber im Grunde nicht kennen.

Polysaccharidabbau durch Bacterioplankton: PULs

Wenn eine Algenblüte kommt, wird das sonst braune Wasser grün, bis 30 mg Chlorophyll a pro m^3 , 3–6 Wochen später sind die Algen abgebaut und es ist wieder braun. Abbildung 2 zeigt absterbende, sich mit Setae gegen Fraß schützende, kettenförmig aneinandergelagerte Kieselalgen (*Chaetoceros* spec., Diatomeen) und die sich von ihnen ernärenden, Polysaccharid-abbauenden Bakterien. Interessanterweise handelt es sich bei den identifizierten grün fluoreszierenden Zellen um Vertreter des Phylums Bacteroidetes, also um Bakterien, die man ursprünglich aus dem menschlichen Darm beschrieben hat.

Die aeroben heterotrophen Meeresbakterien lassen sich größtenteils kultivieren, bei den Hauptphyla handelt es sich um Alpha- und Gammaproteobacteria und Bacteroidetes (Hahnke & Harder 2013, Hahnke et al. 2015).

Ein solches marines Bakterium haben wir Ende der 1990er Jahre bei der Langzeitmessstation »Helgoland Kabeltonne«, die in der Helgoländer Reede zwischen Hauptinsel und Düne liegt, aus dem Plankton isoliert (Eilers et al. 2000). *Gramella forsetii* KT0803 gehört zur Klasse der Flavobacteriia im Phylum Bacteroidetes; das 3,8 Mbp große zirkuläre Genom wurde 2006 publiziert (Bauer et al. 2006). Inzwischen ist es ein Modellorganismus für ein Polysaccharid-verwertendes heterotrophes Bakterium. Wir haben im Genom sieben Abschnitte (Loci) gefunden, sog. PULs, die bestimmte, TonB-abhängige Rezeptoren und Transporter in der äußeren Membran sowie Glycosidhydrolasen kodieren (Bjursell et al. 2006).

Ein PUL (polysaccharide utilization locus) ist ein Set ko-lokalisierter Gene mit einem *susCD*-Genpaar und weiteren Genen, welche Proteine für den Abbau und die Aufnahme von Polysacchariden kodieren (CAZymes: carbohydrate-active enzymes) (Reintjes et al. 2017). Polysaccharide werden gebunden und von Glycosidhydrolasen zu kleineren Oligosaccharideinheiten abgebaut. Der Transporter hat eine große Pore in der äußeren Membran (SucC/SusD) mit einer Art Deckel, durch die aktiv, d.h. unter Energieverbrauch, die Oligosaccharide ins Periplasma gelangen. Dort werden sie über weitere Glycosidhydro-

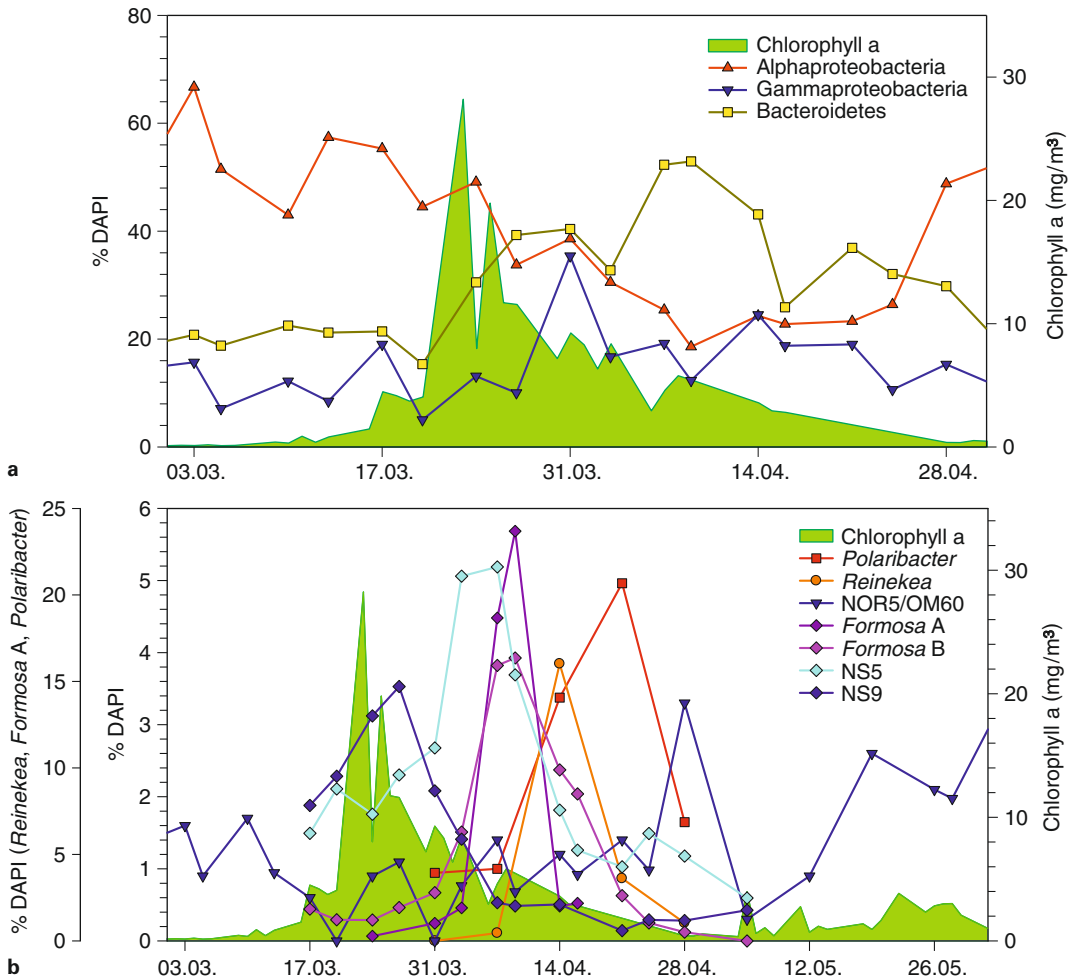


Abb. 3. Algenblüte in der südlichen Nordsee im Frühjahr 2009: Gehalt an Chlorophyll a (mg/m³) und **a**, Anteil verschiedener Bakterienphyla (03.03.–28.04.), **b**, Anteil verschiedener Bakteriengattungen (03.03.–26.05.), jeweils in % nach Anfärbung mit DAPI. – a,b: Teeling et al. (2012).

lasen zu Monosacchariden abgebaut und über ABC-Transporter in das Zytoplasma der Zelle aufgenommen.

Phytoplanktonblüten erzeugen Bacterioplanktonblüten

In der südlichen Nordsee kam es im Frühjahr 2009 zu einer sehr starken Algenblüte. Kurz zuvor gab es ein Hochwasser, durch das eine große Menge an Stickstoff und Phosphor über die Flüsse in die Nordsee eingetragen wurde. Aber erst das Zusammenbrechen der Algenblüte gibt den Bakterien die Möglichkeit, sich von 0,5 auf 3

Millionen pro mL zu vermehren. Die Verfügbarkeit der Zucker führt zu einer kompletten Umstellung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften. Im Winter nehmen Alphaproteobacteria auch in der Nordsee bis 60 % Anteil ein, aber sobald die Frühjahrsblüte einsetzt, profitieren Bakterien zunächst schon von den Algenexsudaten, später von den toten Algen, und Flavobacteria (Bacteroidetes) nehmen stark zu (Abb. 3a, Teeling et al. 2012). Diesen »Kipppunkt«, ab dem die Flavobakterien über die Alphaproteobakterien dominieren, sehen wir jedes Jahr. Etwas später folgt ein Anstieg der Gammaproteobacteria, die ebenfalls von den Algen profitieren.

Auf Ebene der Gattungen wird das Bild wesentlich komplexer (Abb. 3b, Teeling et al. 2012). Die Häufigkeit bestimmter Gattungen ändert sich relativ rasch, in allen Fällen handelt es sich um heterotrophe Bakterien, die Zucker und Proteine verwerten können und die regelmäßig jedes Jahr in einer bestimmten Abfolge auftauchen. Wie lässt sich diese Entwicklung verstehen oder vorhersagen? Lassen sich stochastische oder deterministische Faktoren finden?

Wenn wir den Schritt von den 16S-rRNA-Genanalysen zu den Metagenomen gehen, finden wir sehr ähnliche zeitliche Abläufe. Im nächsten Schritt haben wir die Metagenome sequenziert, annotiert und mittels Metatranskriptom- und Metaproteomanalysen die Genexpression verfolgt.

Dabei zeigt sich, dass die Sukzession auf taxonomischer Ebene mit einer Sukzession auf der Ebene der SusCD-Transporterproteine und Polysaccharid-spezifischen CAZymes (Glycosidhydrolasen, Kohlenhydrat-bindende Moleküle, Kohlenhydratesterasen, Polysaccharidlyasen und Glycosyltransferasen) einhergeht (Teeling et al. 2012): Ende März finden wir frühe Glycosidhydrolasen, die z. B. den Hauptspeicherstoff der Algen, Laminarin, abbauen, und gegen Ende der Blüte finden wir Enzyme für den Abbau komplexerer Zucker und Bindeproteine für Peptidoglycan. Das heißt, es gibt eine Kaskade, mit der zunächst die einfachen Speicherstoffe der Algen, später die Algenzellwände und im dritten Schritt die Bakterienzellwände abgebaut werden. Oder anders ausgedrückt: Aus Algen bilden sich Bakterienmassen, die wieder zusammenbrechen und dann von anderen Bakterien abgebaut werden.

Zeitpunkt und Verlauf der Frühjahrsalgenblüten sind in den Jahren von 2009 bis 2012 nicht identisch, aber relativ ähnlich. Nach Zellzahl dominieren die Diatomeen *Chaetoceros debilis*, *C. minimus*, *Mediopyxis helsysia*, *Rhizosolenia styliformis* und *Thalassiosira nordenskioeldii*, ein Silicoflagellat (*Chattonella*), ein Haptophyt (*Phaeocystis*) sowie Dinoflagellaten die Algenbiomasse. Unter den frei lebenden Bakterien dominieren Vertreter der Gattungen *Ulviabacter* (Flavobacteriia), *Formosa* (Flavobacteriia), *Reinekea* (Gammaproteobacteria), *Polaribacter* (Flavobacteriia) und SAR92 (Gammaproteobacteria). Sie treten jedes Jahr auf, wenn auch nicht immer in derselben Reihenfolge.

Es lohnt sich also, diese Bakterien näher zu untersuchen, um zu verstehen, wie Zucker abgebaut werden, und um indirekt zu verstehen, um welche Zucker es sich tatsächlich handelt, die im Verlauf der Algenblüte umgesetzt werden, d. h. wie der Kohlenstoffkreislauf molekular aufgebaut ist. Wir beschäftigen uns daher intensiv mit der vergleichenden (Meta-)genomik und der integrativen funktionellen Analyse mariner Polysaccharid-abbauender Bakterien mit Schwerpunkt auf den Bacteroidetes.

Vergleichende Genomanalyse mariner Flavobacteriia mit Focus auf PULs

Ein klassisches Bakterium aus der im Frühjahr bei der Algenblüte dominierenden Gruppe der Flavobacteriia (Bacteroidetes) hat eine Genomgröße von 2 bis 6 Mbp. Die Zahl der rRNA-Operons liegt zwischen 2 und 7, d. h., die Bakterien können heterotroph schnell wachsen. Die Zahl der PULs liegt zwischen 0 und 30, d. h., manche Vertreter sind nicht auf Zucker spezialisiert und manche sind für diverse Zucker hyperspezialisiert. Die Zahl der annotierten (d. h. vorhergesagten) CAZymes liegt zwischen 47 und 236, im Schnitt 127, wovon im Schnitt 55 zu den abbauenden gehören (Kappelman et al. 2018 early online).

Wie bereits beschrieben, ist ein PUL ein Genomabschnitt eines heterotrophen Bakteriums, der für den Abbau von Polysacchariden kodiert. Ein Bacteroidetes-PUL enthält immer ein *susCD*-Paar, das den Transport von Oligosacchariden ins Periplasma kodiert und um das herum sich die Gene für Glycosidhydrolasen gruppieren. In einem Bakterium finden sich z. T. verschiedene Typen von PULs. Ein einfacher PUL besteht nur aus wenigen Genen, große PULs können aus über 45 Genen bestehen (Kappelman et al. 2018 early online).

Besonders häufig kommen PULs vor, welche den Abbau von Laminarin, den Hauptspeicherstoff vieler Mikroalgen einschließlich der Kieselalgen, ermöglichen. Diese PULs haben wir in verschiedenen Flavobakterien (*Polaribacter* sp., *Gillisia* sp., *Gramella* sp., *Formosa* sp.) in verschiedenen Ausführungen nachgewiesen (Kappelman et al. 2018 early online). Laminarin (Abb. 4) ist ein lösliches Polysaccharid, ein Polymer aus 20–25 Glucoseeinheiten, die in einer

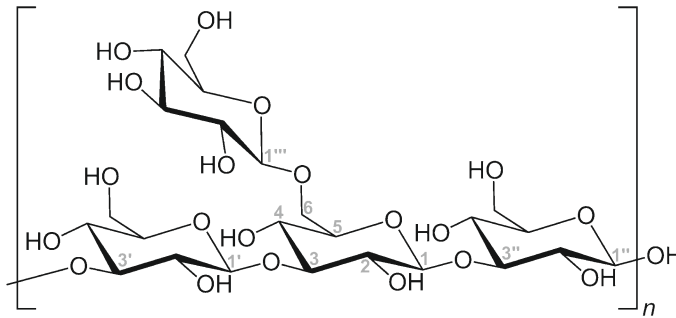


Abb. 4. Strukturformel von Laminarin: Typischer Ausschnitt aus der Polysaccharidkette mit einer Verzweigung. – Gemeinfrei, CC BY-SA 4.0.

Kette β -1,3-verknüpft sind mit β -1,6-Glucose-Dekorierung.

Ein anderer, großer PUL aus *Polaribacter* sp. besteht aus etwa 40–45 Genen (Kappellmann et al. 2018 early online) und kodiert vermutlich für den Abbau verschiedener sulfatierter α -Mannane. Neben dem Transporter SusCD finden wir verschiedene Familien von Glycosidhydrolasen und acht Sulfatasen, die zusammen komplexe Polysaccharide der Diatomeenzellwand abbauen können.

Metagenomanalysen aus Frühjahrsblüten: taxonomisches Binning

Wir haben versucht, das Mikrobiom zu verstehen, indem wir einzelne Bakterien kultiviert und die Genome annotiert haben. Wenn wir jetzt mit Metagenomik zurück in die Umwelt gehen, finden wir tatsächlich 1 : 1 die PULs wieder, die wir aus den Isolaten kennen. Wir haben dazu während der Frühjahrsalgenblüten von 2010 bis 2012 Komplettssequenzierungen der Bakterienmikrobiome durchgeführt. Das heißt, wir bestimmen in großer Stückzahl (insgesamt 38) und in großer Tiefe (Millionen an Sequenzierläufen) soweit es geht das gesamte bakterielle Mikrobiom der südlichen Nordsee im Frühjahr (Krüger et al., nicht veröff.). Danach folgt die Puzzlearbeit: Wir nehmen den einzelnen Sequenzierlauf und versuchen, ihn durch Überlappung so lang zu machen, dass eine taxonomische Zuordnung möglich wird.

Über ein Klassifizierungsverfahren (»Binning«), lassen sich die bruchstückhaften Genomabschnitte in einzelne Untergruppen (»Bins«)

differenzieren, die zusammengesetzt und gelesen werden können und aus denen somit die einzelnen Genome rekonstruiert werden können. Im Anschluss überprüfen wir über eine Binningstatistik, wie komplett ein Bin in Bezug auf ein Bakteriengenom ist. Ein Bin ist sozusagen eine »Schachtel«, in die wir die Teile des großen Metagenom-Puzzles sortieren, die mit großer Wahrscheinlichkeit aus einer Bakterienart stammen.

Die Metagenomik wird ganz seltene Organismen nicht abdecken, aber in über 38 Metagenomen finden wir insgesamt annähernd 1300 »Flavobakterien-Bins«, von denen über 500 zu über 90 % komplett sind. Wir finden in ihnen in großer Zahl Gene für Glycosidhydrolasen und in jedem der Bins im Durchschnitt etwa 4 SusCD-Transporter-Genpaare (Krüger et al., nicht veröff.).

Für uns war es wichtig, mit diesen Informationen zurück zum phylogenetischen Baum zu kommen, in unserem Fall ein genomischer, nicht ein 16S-rRNA-basierter Baum. Dieser Baum zeigt uns z.B. für die Bacteroidetes, dass die Welt, die wir über die Kultivierung sehen, sich von der unterscheidet, die wir über die Bins bekommen (Abb. 5; Krüger et al., nicht veröff.). Dies ist ein wiederkehrendes Thema in der Mikrobiologie: Wir haben Modellorganismen, die zwar nahe an dem sind, was draußen in der Umwelt dominiert, aber eben nur »nahe«. Für einige Gruppen oder Gattungen liegen sowohl metagenomische als auch Isolierungsanzeichen vor, aber die meisten sehen wir bisher nur in den Bins, aber noch nicht in den Isolaten. Es lohnt sich also, weiter zu isolieren.

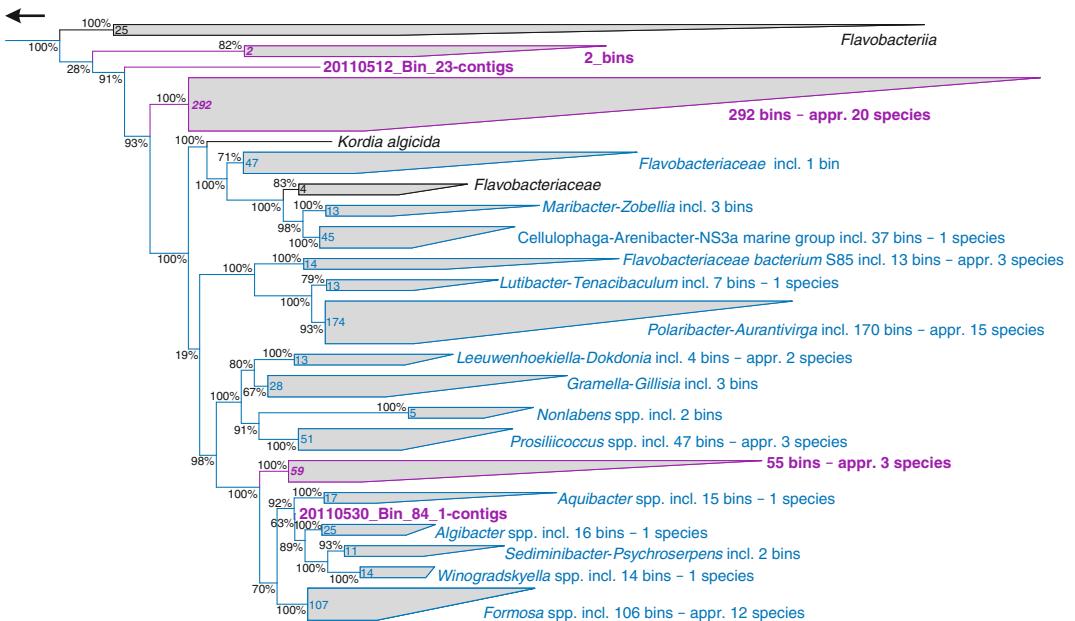


Abb. 5. Einberechnung der aus den Metagenomen (38 Bakterienmetagenome der Frühjahrsalgenblüten 2010–2012) stammenden Bins in einen phylogenetischen Baum, bestehend aus Genomen von größtenteils kultivierten Isolaten. Blau gefärbte Gruppen enthalten sowohl Metagenom-Bins als auch nah verwandte Referenzgenome, lila gefärbte Gruppen hingegen enthalten nur Metagenom-Bins, für die keine nah verwandten Isolate und deren Genome vorhanden sind. Schwarz gefärbte Gruppen enthalten nur Genominformationen von Isolaten. – Krüger et al. (nicht veröff.).

Vergleich aller Metagenome

Wir können einen Schritt weitergehen und die Metagenome der Jahre 2010, 2011 und 2012, die wir während der Frühjahrsalgenblüten entnommen und analysiert haben, untereinander vergleichen (Abb. 6). 1167 der 1287 der von uns gefundenen Bins haben mindestens einen eng verwandten Bin. Wenn wir die Bins nach ihrer Sequenzähnlichkeit anordnen, ergeben sich Überlappungen, und diese Cluster trennen sich von den jeweils nächst verwandten Clustern. Ein solches Cluster besteht vermutlich aus Stämmen (strains) einer Art, die untereinander Gene austauschen. Auf diese Weise entstehen etwa 30–40 dominierende Cluster, die aus Bins bestehen. Diese 30–40 Arten an heterotrophen Bakterien kommen in allen drei Jahren vor, andere Bakteriengruppen kommen dagegen nur in einem Jahr vor. Wir können also die große Komplexität der Meeresmikrobiome sinnvoll gliedern und anfangen, sie zu beschreiben.

Wenn wir ein solches Cluster, das aus mehreren Bins besteht, genauer ansehen und in die Sequenzen eines Bins (einer »Schachtel«, z. B. Bin_85 vom 16. Mai 2011) hineinsehen, finden wir eine zusammenhängende Region, die einem PUL entspricht (Krüger et al., nicht veröff.). Der PUL enthält in diesem Fall mehrere Sulfatasen, was auf den Abbau komplexer sulfatierter Zellwandzucker hinweist. Dieses Bin kommt in der südlichen Nordsee in den drei Jahren jeweils spät im Frühjahr vor, was in der Phase des Zusammenbrechens von Diatomeenblüten plausibel ist (vgl. oben: Einfache Speicherstoffe werden als erstes, Zellwände werden später abgebaut).

Visualisierung der Polysaccharidaufnahme und Einzelzellidentifizierung durch FISH

Bisher haben wir uns auf der Ebene der Vorhersage aufgehalten. Können wir das Ganze auch sichtbar machen? Wir markieren dazu Laminarin mit Fluorescein und geben es in ein Reaktionsge-

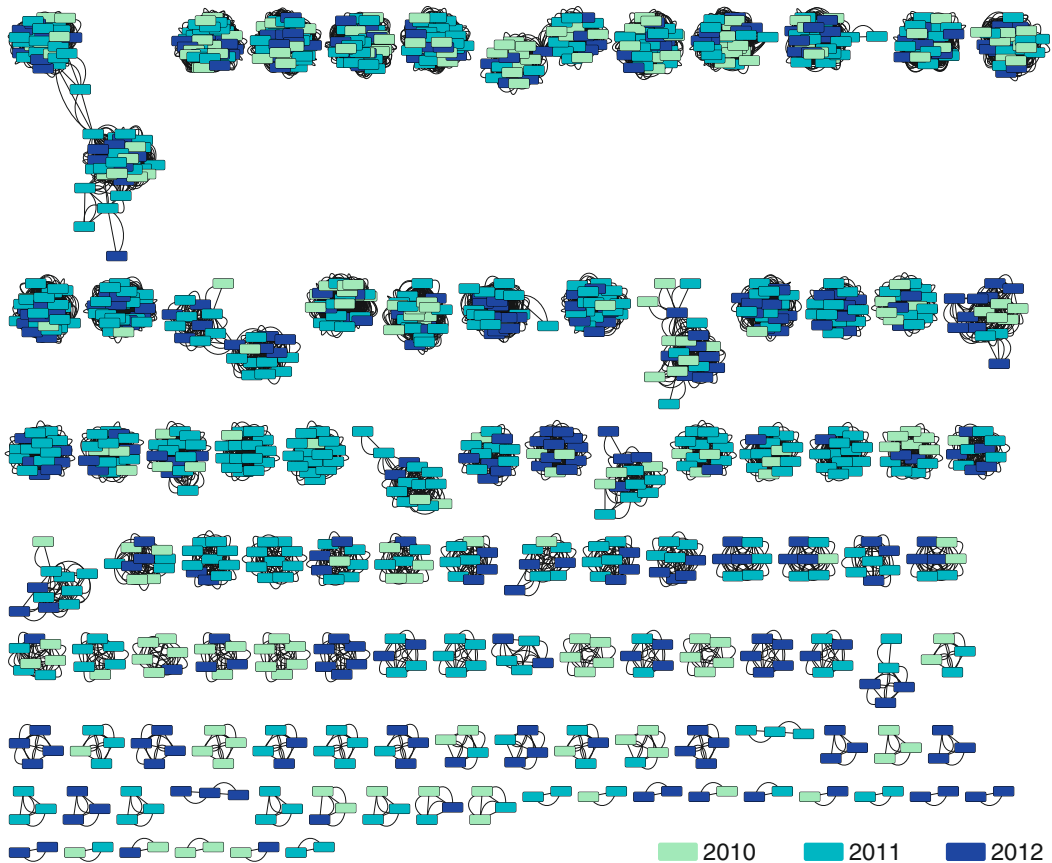


Abb. 6. Bins können anhand ihrer Sequenzidentität in Cluster eingeordnet werden. Jeder Bin ist durch ein Rechteck dargestellt und Bins eines Clusters sind durch Linien verbunden. Cluster, deren Bins alle drei Farben aufweisen, repräsentieren Bacteroidetes-Arten, die in allen drei analysierten Jahren vorkommen. – Krüger et al. (nicht veröff.).

fäß mit Meerwasser (Arnosti 2003). Nach einigen Minuten können wir unter dem Mikroskop sehen, dass das Laminarin von Bakterien aufgenommen worden ist. Diese Bakterien können wir über Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) als Vertreter der Flavobacteriia und über DAPI als Zellen identifizieren (Reintjes et al. 2017). Mithilfe einer hochauflösenden Mikroskopie, die eine Bakterienzelle zum ersten Mal in der Lichtmikroskopie nicht mehr als Punkt darstellt, sondern mit der Peri- und Zytoplasma auflösbar sind, sehen wir, dass die grüne Fluoreszenzfärbung nur in der Peripherie lokalisiert ist (Abb. 7; Reintjes et al. 2017). Das macht natürlich Sinn, da die Aufnahme von Laminarin über die äußere Membran über SusCD in das Periplasma erfolgt, wo der weitere Abbau stattfindet.

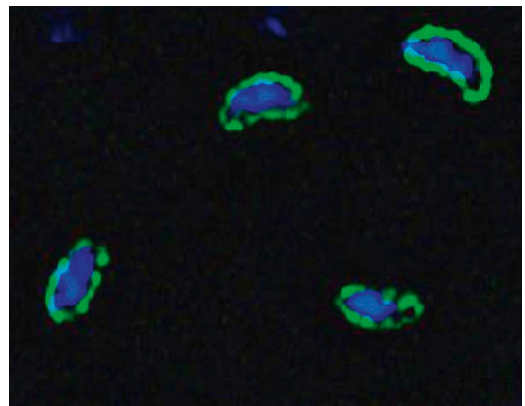


Abb. 7. Mit DAPI (blau) angefärbte Zellen nach Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Laminarin (grün). – Foto: Greta Reintjes, MPI Bremen.

Interessanterweise ist dieser Mechanismus der marinen Flavobacteriia homolog zu dem der dominanten Bakteriengattung im Darm, der *Bacteroides*, für die vor kurzem die Aufnahme von großen Zuckerketten bis 16 Einheiten gezeigt werden konnte (Cuskin et al. 2015). Die Autoren postulieren einen »selfish mechanism«, einen Wettkampf zwischen Bakterien im Darm um die mit der Nahrung aufgenommenen Zucker: Keines dieser Bakterien gibt Enzyme ins Lumen ab, sondern alle tragen die Enzyme auf der Oberfläche und versuchen, die Oligosaccharide ins Periplasma zu ziehen, um sie sozusagen für sich allein nutzen zu können. Deshalb evolvieren sie so komplexe äußere Membranen.

Meiner Meinung nach wird die Darmflora daher durch den jeweiligen Zucker bestimmt, ähnlich wie es bei der Mikrobenezusammensetzung in der südlichen Nordsee während der Algenblüte der Fall ist. Wenn wir die Zucker in der südlichen Nordsee kennen, wissen wir auch, was dort vor sich geht und welche Bakterien vorhanden sind. Die oben gestellte Frage nach stochastischen oder deterministischen Faktoren lässt sich also in Richtung Determinismus beantworten.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Mikrobiomstudien profitieren zum einen von der vertieften funktionellen Analyse genomsequenzierter Isolate und zum anderen von neuen Methoden der Metagenomsequenzierung und der Bioinformatik, z.B. für Assembly & taxonomisches Binning. Hypothesen aus Mikrobiomstudien wie die Funktionsvorhersagen für PULs sind jedoch nur Annotationen. Sie müssen getestet werden, z.B. durch Aufnahmetests mit Laminarin. Dies wird notwendigerweise immer »echte Mikrobiologie« bleiben und es wird notwendigerweise immer lange dauern. Wir müssen auch quantitative Mikrobiomstudien durchführen, die uns helfen, die Diversität und Funktion von Umweltmikroorganismen in den globalen Stoffkreisläufen besser zu verstehen.

Nach allem, was wir bisher wissen, ist die Welt der heterotrophen Meeresbakterien wohl mehr eine deterministische als eine stochastische. Die Algenblüte und ihre Zusammensetzung können wir nicht exakt vorhersagen, aber wenn wir die freigesetzten Zucker in ihrer strukturellen Diversität kennen, können wir vorhersagen, wel-

che Bakterien zu welcher Zeit in der südlichen Nordsee dominieren und welche Arbeit sie in den Stoffkreisläufen verrichten werden.

Letztendlich wird man dadurch hoffentlich eines Tages verstehen können, wie heterotrophe Bakterien funktionieren, und irgendwann vielleicht eine Möglichkeit finden, wie CO₂ aus der Atmosphäre in Algenbiomasse festgelegt werden kann, ohne dass Bakterien diese Zucker sofort wieder abbauen und das CO₂ wieder freisetzen können.

Danksagung

Mein Dank gilt meinen ehemaligen und aktuellen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern und den zahlreichen Kollaborationspartnerinnen und -partnern. Unsere Forschung wurde und wird von der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Schwerpunktprojekt POMPU), dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (Projekt MIMAS) und dem Joint Genome Institute (CSP COGITO) finanziert.

Literatur

- Arnosti, C. 2003. Fluorescent derivatization of polysaccharides and carbohydrate-containing biopolymers for measurement of enzyme activities in complex media. – *Journal of Chromatography B*, 793(1): 181–191.
- Bauer, M., M. Kube, H. Teeling, M. Richter, T. Lombardot, E. Allers, C. A. Würdemann, C. Quast, H. Kuhl, F. Knaust, D. Woebken, K. Bischof, M. Mussmann, J. V. Choudhuri, F. Meyer, R. Reinhardt, R. I. Amann & F. O. Glöckner. 2006. Whole genome analysis of the marine Bacteroidetes '*Gramella forsetii*' reveals adaptations to degradation of polymeric organic matter. – *Environmental Microbiology*, 8(12): 2201–2213.
- Bjursell, M. K., E. C. Martens & J. I. Gordon. 2006. Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. – *Journal of Biological Chemistry*, 281(47): 36269–36279.
- Cuskin, F., E. C. Lowe, M. J. Temple, Y. Zhu, E. A. Cameron, N. A. Pudlo, N. T. Porter, K. Urs, A. J. Thompson, A. Cartmell, A. Rogowski, B. S. Hamilton, R. Chen, T. J. Tolbert, K. Piens, D. Bracke, W. Vervecken, Z. Hakki, G. Speciale, J. L. Muñoz-Munoz, A. Day, M. J. Peña, R. McLean, M. D. Suits, A. B. Boraston, T. Atherly, C. J. Ziemer, S. J. Williams, G. J. Davies, D. W. Abbott, E. C. Martens & H. J. Gilbert. 2015. Human gut Bacteroidetes can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. – *Nature*, 517(7533): 165–169.

- Eilers, H., J. Pernthaler, F. O. Glöckner & R. Amann. 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. – *Applied Environmental Microbiology*, 66(7): 3044–3051.
- Hahnke, R. L. & J. Harder. 2013. Phylogenetic diversity of *Flavobacteria* isolated from the North Sea on solid media. – *Systematic and Applied Microbiology*, 36(7): 497–504.
- Hahnke, R. L., C. M. Bennke, B. M. Fuchs, A. J. Mann, E. Rhiel, H. Teeling, R. Amann & J. Harder. 2015. Dilution cultivation of marine heterotrophic bacteria abundant after a spring phytoplankton bloom in the North Sea. – *Environmental Microbiology*, 17(10): 3515–3526.
- Kappelmann, L., K. Krüger, J.-H. Hehemann, J. Harder, S. Markert, F. Unfried, D. Becher, N. Shapiro, T. Schweder, R. I. Amann & H. Teeling. 2018 early online. Polysaccharide utilization loci of North Sea *Flavobacteriia* as basis for using SusC/D-protein expression for predicting major phytoplankton glycans. – *The ISME Journal*, doi: 10.1038/s41396-018-0242-6.
- Lederberg, J. 2004. Of men and microbes. – *New Perspectives Quarterly*, 20(3): 52–55.
- Probandt, D., T. Eickhorst, A. Ellrott, R. Amann & K. Knittel. 2018. Microbial life on a sand grain: from bulk sediment to single grains. – *The ISME Journal*, 12: 623–633.
- Reintjes, G., C. Arnosti, B. M. Fuchs & R. Amann. 2017. An alternative polysaccharide uptake mechanism of marine bacteria. – *The ISME Journal*, 11(7): 1640–1650.
- Teeling, H., B. M. Fuchs, D. Becher, C. Klockow, A. Gardebrecht, C. M. Bennke, M. Kassabgy, S. Huang, A. J. Mann, J. Waldmann, M. Weber, A. Klindworth, A. Otto, J. Lange, J. Bernhardt, C. Reinsch, M. Hecker, J. Peplies, F. D. Bockelmann, U. Callies, G. Gerdt, A. Wichels, K. H. Wiltshire, F. O. Glöckner, T. Schweder & R. Amann. 2012. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. – *Science*, 336(6081): 608–611.
- Teeling, H., B. M. Fuchs, C. M. Bennke, K. Krüger, M. Chafee, L. Kappelmann, G. Reintjes, J. Waldmann, C. Quast, F. O. Glöckner, J. Lucas, A. Wichels, G. Gerdt, K. H. Wiltshire & R. I. Amann. 2016. Recurring patterns in bacterioplankton dynamics during coastal spring algae blooms. – *eLife*, 5: e11888, doi: 10.7554/eLife.11888.
- Wagner, M. 2019. Mikrobiome – Wissensstand und Perspektiven. – In: Bayer. Akademie der Wissenschaften (Hrsg.): *Die unbekannte Welt der Mikrobiome*. Pfeil, München: 17–27.
- Yarza, P., P. Yilmaz, E. Pruesse, F. O. Glöckner, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, W. B. Whitman, J. Euzéby, R. Amann & R. Rosselló-Móra. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. – *Nature Reviews Microbiology*, 12(9): 635–645.

Diskussion

E. von Mutius: Die Systeme, die Sie beschrieben haben, zeigen eine große Redundanz z. B. beim Aufbau und Vorkommen der PULs. Im Mikrobiom ist immer die Frage, warum es diese Redundanz überhaupt gibt und warum sie am Ende so komplex ist. Gibt es dafür Spielregeln, die man verstehen könnte? Der Zucker ist natürlich der »Futterstoff«, auf dem die bakterielle Vielfalt basiert, aber wie kommt die hohe Redundanz zustande und wie werden die Systeme von der ökologischen Seite her reguliert?

R. Amann: Wenn man das Meer ansieht, denkt jeder, es handelt sich um ein riesiges, in sich verbundenes Ökosystem. Aber wenn man genau hinsieht, hat es Struktur. Wenn ich über Zucker spreche, so entsteht dieser Zucker in einem Partikel und diffundiert von diesem Partikel heraus. Das heißt, wir haben hier schon zwei verschiedene Nischen: auf der Oberfläche und in Lösung. Das nächste, was den Nischenraum erhöht, ist die Komplexität der Zucker. Eine weitere Eigenschaft wäre die Vermischung, das heißt, ein Bakterium braucht nicht nur diesen Zucker, sondern dieser muss auch in einer bestimmten Konzentration vorliegen. Für einen Stoff braucht man also eine ganze Bandbreite an verschiedenen Bakterien, um ihn abzubauen. Dazu kommt, dass zu den Bottom-up-Faktoren, wie Substrat und Energie, die definieren, was wächst, Mortalitätsfaktoren kommen: Sobald ein Bakterium gewinnt und eine bestimmte Dichte erreicht, kommt es zum virusinduzierten Zelltod, weil die Dichte erlaubt, dass eine Virusinfektion greift. Auf diese Weise bricht ganz schnell eine Gemeinschaft zusammen. Damit eröffnet die Virussensitivität bzw. -resistenz einen weiteren Nischenraum. Das alles führt letztlich zu einer großen Komplexität. Aber in dieser Komplexität gibt es Regeln und die können wir verstehen. Für mich eine ganz faszinierende Regel ist folgende: Wenn Sie in ein System Protein geben, wird es abgebaut zu Aminosäuren. Aber wenn Sie in das System einen komplexen Zucker hineingeben, wird dieser in Teilen zwar ebenfalls abgebaut, er ist aber nicht nur ein Energiesubstrat, sondern aufgrund seiner Komplexität ein Signalstoff. Das heißt, die Bakterien sehen auf einmal Laminarin

und werfen Laminarin-, Protein-, Nukleinsäure- und Lipidtransporter an, weil sie wissen, dass Laminarin nicht, wie ein Peptid, bedeutet, dass irgendetwas zum Abbauen da ist, sondern dass eine Algenblüte zusammenbricht und damit die Hungerzeit zu Ende ist. Diese Regeln zu verstehen, hilft uns unglaublich weiter im Verständnis der komplexen Lebensgemeinschaften.

W. Tanner: β -1,3-Glucane sind eigentlich typisch für Pilze. Wie verbreitet sind sie in Algen?

R. Amann: Es handelt sich durchweg um Mikroalgen. Die Diatomeen sind phylogenetisch Abkömmlinge der Oomyceten, daher haben sie als Speicherstoff β -1,3-Glucane und in der Zellwand unter anderem Chitin.

W. Tanner: Spielen Pilze in dem ganzen Nordseebiotop überhaupt keine Rolle?

R. Amann: Zumindest nicht in der Größenfraktion, die wir untersucht haben. Unser Fenster zur Welt besteht sozusagen aus einem Filter, der alles, was größer als 3 Mikrometer ist, abtrennt, und alles, was größer als 0,2 Mikrometer ist, sammelt. In dieser Welt spielen die Pilze keine Rolle.

K. Freier: Sie haben am Ende von einer quantitativen Metagenomik gesprochen. Ich bin beeindruckt von dieser Biodiversität, die damit sichtbar wird. Aber wenn ich es mit einem Wald vergleiche, dann ist es deutlich etwas Anderes, ob ich einen Fichtenwald mit ein paar eingestreuten Buchen betrachte oder einen Buchenwald mit ein paar Fichten darin. Kann die quantitative Metagenomik wirklich erfassen, wie viel von einer Art vorhanden ist, oder gibt sie einfach alles wieder, was vorhanden ist?

R. Amann: Jede molekulare Methode ist nur ein Fenster zur Realität, und die Realität ist dabei so gut abgebildet, wie jedes Fenster offen ist. Wir haben bisher die Welt häufig durch die PCR-Methode betrachtet, durch einen Primersatz für ein Gen, das die 16S-rRNA kodiert. Das hat uns die Welt ein Stück weit geöffnet, weil das Fenster der Isolierung – also alles, was auf einer Platte

wächst – sehr eng ist. Das Fenster, das Primer (die universell heißen, es aber nicht sind) uns öffnen, ist größer. Die Welt der Metagenomik ist so groß wie es die Tiefe der Sequenzierung – die immer besser wird, weil wir immer mehr sequenzieren können – und die Qualität der DNA-Isolierung erlauben, das heißt, ob wir es schaffen, wirklich alle Zellen, die in der Umwelt vorkommen, so zu öffnen, dass wir an die DNA herankommen. Dazu kommen noch andere Faktoren. Wenn zum Beispiel die DNA in einem Organismus hochgradig verändert wäre, sodass sie nicht klassisch über unsere Sequenzierungen zu sehen wäre, würden wir sie auch nicht sehen. Als Biologe weiß man, dass man im Bereich des Unsichtbaren abhängig ist von der Methode. Ich würde aber im Moment sagen, dass »quantitativ« bedeutet, mehrere Methoden zu verwenden, wirklich mit Überlegung heranzugehen und nicht nur auf eine hohe Zahl an Sequenzen zu setzen. Prinzipiell kann Metagenomik aber quantitativ sein, das heißt, wenn in einem Bin, einer »Schachtel«, viele Sequenzen liegen, heißt das, dass dieser Organismus in einer hohen Abundanz in der untersuchten Probe vorliegt.

K.-H. Schleifer: Weiß man etwas über die Phagen, die am Abbau der Polysaccharide beteiligt sind? Wird auch das Virom untersucht?

R. Amann: Wir haben im Moment auf Helgoland eine Doktorarbeit, die anfängt, mit dem Virom zu arbeiten. Man weiß zum Beispiel, dass Viren die Bakterien so modulieren, dass möglichst viel an Stoffwechselprodukten für die Virussynthese übrig bleibt. Ich würde mich nicht wundern, wenn auch CAZymes oder die SusCD-Transporter irgendwann im Virusgenom gefunden werden. Wirklich zu zeigen, dass die Viren dann ein Bakterium damit noch länger am Leben erhalten und es noch kompetitiver machen, damit es weitere Viren produziert, wird eine schwierige Aufgabe sein, von der wir noch weit weg sind. Man kann aber jetzt schon sagen, dass etwa um den Faktor 10 mehr Viren im Meerwasser vorkommen als Bakterien und dass die Komplexität des Viroms größer ist als die des Bakterienmikrobioms. Man kann auch sicher sagen, dass alles, was Bakterien im Genom haben, irgendwann einmal über Viren transportiert wird. Aber zusätzlich gibt es ein komplettes »unknown-ORF (open reading frame)-Universum«: offene Leserahmen von unbekannter Funktion, über die wir noch nichts sagen können. Unser Ansatz zur Viromforschung ist im Moment lediglich, dass wir mit den Isolaten versuchen, die richtigen Viren zu bekommen, aber nicht, das Virusmetagenom aufzukonzentrieren. Von dessen Komplexität in der Umwelt würden wir schlicht erschlagen werden.

