

Abschließender Sachbericht



Abbaubarkeit von arktischem terrigenem Kohlenstoff im Meer

Leibniz-Einrichtung: Leibniz-Institut IOW- Institut für Ostseeforschung Warnemünde, Rostock
(*Projektleiter:* Prof. Dr. Klaus Jürgens)

Aktenzeichen: SAW-2011-IOW-3
Projektlaufzeit: 01.03.2011 - 28.02.2014 (verlängert bis 31.12.2014)

Ansprechpartner: Prof. Dr. Klaus Jürgens, Dr. Daniel Herlemann

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Zusammenfassung.....	3
Zielsetzung des Vorhabens sowie Entwicklung der durchgeführten Arbeiten einschließlich Abweichungen vom ursprünglichen Konzept.....	4
Darstellung der erreichten Ergebnisse und Diskussion im Hinblick auf den relevanten Forschungsstand, mögliche Anwendungsperspektiven und denkbare Folgevorhaben	6
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)	6
E.-M.-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Marine Biotechnologie (EMAU).....	7
Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW) in Kooperation mit der Brückengruppe für Marine Geochemie (ICBM-MPI, Oldenburg)	9
Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW)	10
Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB).....	12
Museum für Naturkunde (MfN)	16
Universität Rostock Institut für Chemie Abteilung Chemie (UniR)	17
Universität Stockholm, Institut für angewandte Umweltforschung (ITM).....	17
Zitierte Literatur	19
Veranstaltungen im Rahmen des ATKiM Projekts	20
Angabe der Beiträge von möglichen Kooperationspartnern im In- und Ausland, die zu den Ergebnissen des Vorhabens beigetragen haben	20
Qualifikationsarbeiten, die im Zusammenhang mit dem Vorhaben entstanden sind	20
Promotionen (kurz vor Fertigstellung)	20
Diplomarbeiten	20
Liste der Publikationen aus dem Vorhaben	21
Darstellung der Maßnahmen zur Sicherung und Verfügbarmachung der im Vorhaben produzierten Forschungsdaten	21
Pressemitteilungen.....	21

Zusammenfassung

Die Menge des gelösten organischen Materials (tDOM), das in Zukunft durch die Flüsse in die Meere getragen wird, steigt mit noch unbekanntem Folgen für das Ökosystem und den globalen Kohlenstoffkreislauf. Ein Grund für die erhöhte tDOM Fracht ist das klimabedingte Auftauen der arktischen Permafrostgebiete, wodurch ein Transport von zusätzlichem tDOM in das Meer in Gang gesetzt wird. Die zentrale Frage bei ATKiM war, welcher Anteil und welche Komponenten des tDOM mikrobiell verfügbar sind und durch welche Mikroorganismen es abgebaut wird. Als subarktisches Ästuar bietet die Ostsee ideale Bedingungen für diese grundlegenden Untersuchungen, da die Ergebnisse prinzipiell auf den arktischen Ozean übertragen werden können. Um die Rolle von erhöhten tDOM Konzentrationen zu simulieren wurde Wasser aus dem Fluss Kalix (Nord-Schweden) verwendet. Die Experimente umfassten drei Langzeitinkubationen in denen das Kalixwasser mit Ostseewasser von Stationen unterschiedlicher Salinität gemischt wurde, um anschließend Veränderungen im DOM, mikrobiellen Abbau und die Antwort der bakteriellen Gemeinschaft zu untersuchen.

Das erste Experiment wurde mit Küstenwasser, das direkt vor Warnemünde entnommen wurde, durchgeführt. Für einen methodischen Vergleich wurde Kalixwasser unterschiedlichen DOM-Extraktionsverfahren unterzogen, was ergab, dass die verschiedenen Vorbehandlungen von tDOM relativ geringen Einfluss auf die biologischen Parameter im Experiment hatten. Es zeigte sich aber, dass die Salinität sowie Fraßaktivität von Protozoen die bestimmenden Faktoren für die bakterielle Aktivität im Experiment waren. Der Einfluss der Salinität wurde bei zwei schiffsgestützten Experimenten während der Meteor-Expeditionen im November 2011 und Mai 2012 in den Mittelpunkt gestellt. Ostseewasser wurde in drei repräsentativen Salinitätszonen der Ostsee gewonnen und mit Kalix Wasser gemischt. Die Experimente umfassten ein Protozoen-reduziertes Inokulum und ein Zooplankton-reduziertes Inokulum. Da Saisonalität einen starken Einfluss auf die chemischen und biologischen Parameter in der Ostsee hat, wurden die Experimente im Winter (November) und Sommer (Juni) an den gleichen Stationen durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss von UV-Einstrahlung, welche die Bioverfügbarkeit von DOM verändert, durch künstliche UV-Bestrahlung des Kalixwassers vor Zugabe simuliert.

Die bakteriellen Gemeinschaften ändern sich bekanntermaßen stark entlang des Salzgradienten in der Ostsee. Dies war auch bei diesem Experiment von Bedeutung. Überraschenderweise ergaben die Untersuchungen, dass die Zugabe von tDOM bei unterschiedlichen Salinitäten weder zu einer Veränderung der bakteriellen Aktivität, noch zu einer signifikanten Stimulation des DOC-Abbaus führte. Eine erhöhte bakterielle Aktivität und verstärkter DOC-Abbau konnten jedoch gemessen werden, wenn das tDOM mit UV-Licht vorbehandelt wurde. Die Anwendung von UV-Licht führt zu einer Fragmentierung der komplexen organischen Moleküle und erhöht dadurch die Bioverfügbarkeit. Da das unbehandelte tDOM keine signifikante Erhöhung der mikrobiellen Aktivität hervorgerufen hat, ist davon auszugehen, dass tDOM nur in relativ geringem Ausmaß von Mikroorganismen im Salzgradient der Ostsee abgebaut wird. Im Gegensatz zur bakteriellen Aktivität wurde jedoch ein signifikanter Effekt auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft bei der Zugabe von tDOM festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass bestimmte Bakterientaxa auf die Zugabe von tDOM reagieren.

Das Vorhandensein von spezifischen Bakteriengemeinschaften hat jedoch nicht zu einer deutlich erhöhten Bakterienaktivität oder dem Abbau von DOC geführt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das zugegebene tDOM nur langsam abgebaut werden kann und daher wahrscheinlich auf kurzen Zeitskalen nur einen geringen Einfluss auf den aquatischen Kohlenstoffkreislauf hat. Ein ähnliches Ergebnis lieferten die Ergebnisse im November, wo die Reaktion der Bakteriengemeinschaften auf tDOM-Zugabe noch geringer ausfiel. Da aber mittels stabiler Isotopenanalysen des organischen Materials gezeigt wurde, dass der terrestrische Anteil des DOM auf dem Weg in die Nordsee deutlich abnimmt, müssen andere Verlustprozesse des tDOM, wie Photolyse sowie Flokkulation und anschließende Sedimentation, in Zukunft stärker beachtet werden.

Zielsetzung des Vorhabens sowie Entwicklung der durchgeführten Arbeiten einschließlich Abweichungen vom ursprünglichen Konzept

Um die Rolle von erhöhten tDOM Konzentrationen zu simulieren, wurde Wasser aus dem Fluss Kalix während des Frühjahrshochwassers im Mai 2011 entnommen. Das Einzugsgebiet des Kalix umfasst ein dünn besiedeltes Permafrostgebiet in Nordschweden. Das Kalixwasser wurde vor Ort 0.2 μm filtriert und in 1000 l Tanks an das Institut für Ostseeforschung (IOW) transportiert. Dort wurde das Wasser in 25 l Kanister umgefüllt und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Verwendung gelagert. Die Experimente umfassten drei Langzeitinkubationen in der das Kalixwasser mit Ostseewasser unterschiedlicher Salinität gemischt wurde.

In einem Basisexperiment ("Pilot") wurde das Kalixwasser mit Wasser das vor Warnemünde entnommen wurde gemischt. In diesem Experiment sollten unterschiedliche DOM-Extraktionsverfahren verglichen werden (Ultrafiltration, Festphasenextraktion, Lyophilization). Die Kontrollen umfassten unbehandeltes Ostseewasser, sowie Kalixwasser das nicht 0.2 μm filtriert wurde. Die Ergebnisse zeigten das die Zugabe von tDOM, unabhängig von der vorangegangenen Modifikation, relativ geringen Einfluss auf die chemischen und biologischen Parameter hatte. Der Ansatz, der ausschließlich aus Kalixwasser bestand, entwickelte die höchste mikrobielle Aktivität. Das Experiment impliziert, dass die Salinität (Flusswasser vs Ostseewasser) sowie Fraßaktivität von Protozoen die bestimmenden Faktoren für die bakterielle Aktivität im Experiment waren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das im Antrag vorgeschlagene Szenario "Temperatur" durch Größenfraktionierung ersetzt um dem Einfluss von bakterivoren Protozoen gerecht zu werden. Die schiffsgestützten Experimente wurden während der Meteor –Expeditionen im November 2011 und Mai 2012 an drei repräsentativen Stationen der Ostsee mit unterschiedlichen Salinitäten (Abb. 1: Salzwasser, mesohaline und oligohaline) durchgeführt. Sie umfassten ein Protozoen reduziertes Inokulum (1 μm -Vorfiltration) und ein Zooplankton-reduziertes Inokulum (100 μm -Vorfiltration). Da Saisonalität einen starken Einfluss auf die chemischen und biologischen Parameter in der Ostsee hat, wurden die Experimente zu unterschiedlichen Jahreszeiten (November, Juni) an den gleichen Stationen durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss von Lichteinstrahlung, was die Bioverfügbarkeit von DOM verändert (Herndl *et al.*, 1997), durch UV-Bestrahlung des Kalixwasser simuliert.

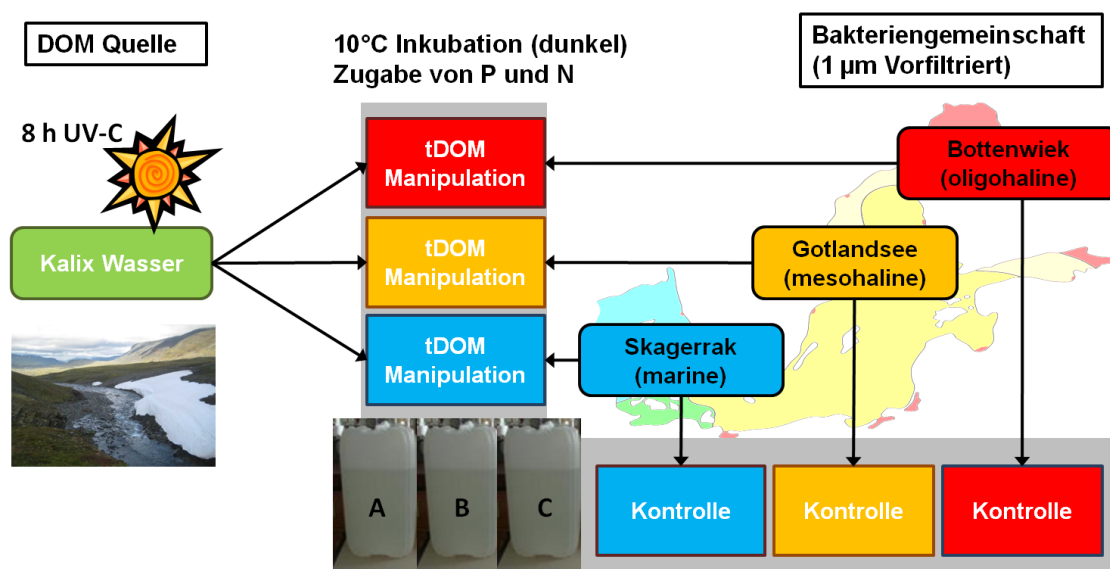


Abbildung 1: Als Inokula für die Experimente diente Ostseewasser aus drei unterschiedlichen Salzregionen der Ostsee. Das Wasser wurde 100 μm - und 1 μm -filtriert. Wasser des Kalix wurde 0.22 μm -filtriert. Ein weiterer Ansatz wurde UV-behandelt bevor Ostseewasser zugemischt wurde.

Die Experimente waren so konzipiert, dass jeder Kooperationspartner ausreichend Probenmaterial aus einem Mesokosmos erhielt um die geplanten Analysen durchzuführen. Das IOW (AG Jürgens) hat sich dabei vor allem auf die bakterielle Produktion und prokaryontische Zellabundanz konzentriert, sowie hochaufgelöste Bakteriendiversitäts- und Funktionsanalysen durchgeführt (16S rRNA Gen und Metagenome). Das IGB (AG Grossart) hat vor allem die Rolle partikel-assoziiierter Bakterien ($>5 \mu\text{m}$) in den Hauptexperimenten untersucht sowie auch die Pilze mittels 18S rRNA-ITS erfasst. Zusätzlich wurden noch Rollertankexperimente durchgeführt die eine Partikelbildung indizieren sollen. Die Diversitätsanalysen von IOW und IGB dienten der DSMZ zur Evaluierung der bakteriellen Isolate. Ziel der DSMZ war, aus den Experimenten die für den Abbau organischer Substanz relevanten Bakterienarten zu isolieren und kultivieren (DSMZ AG Overmann). Für die bioinformatische Analyse der Diversitäts-Daten und deren standardisierte Speicherung wurden Programme verwendet, die vom MPI/Jacobs University (AG Glöckner) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Metagenome, die aus den Experimenten generiert wurden, dienten als funktionelle Marker und wurden mit proteomischen Daten von Universität Greifswald (AG Schweder) vergleichend ausgewertet. Ebenso wurden die bakteriellen Daten mit den chemischen Daten von M. Manecki (IOW: AG Schulz-Bull, Univ. Oldenburg: AG Dittmar) vergleichend ausgewertet. Diese umfassen physiko-chemische Parameter (NH_4 , O_2 , PO_4 , Salinität) und die in Zusammenarbeit mit T. Dittmar erhobenen ultrahochauflösende Massenspektrometrie (15 Tesla Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie, FT-ICR-MS) Analysen. Während die FT-ICR-MS Analyse ein umfassendes Bild über chemische Summenformeln zwischen M/Z 180-1800 abgibt lag der Fokus an der Universität Rostock (AG Zimmermann) auf den komplexeren Verbindungen höherer Molekülgröße (Huminstoffe, Gelbstoffe etc.), die mit Hilfe multidimensionaler chromatographischer Trennsysteme (GCxGC) sowie Thermodesorptionstechniken analysiert wurden.

Die Herkunft der gelösten organischen und anorganischen Kohlenstoffkomponenten (terrestrisch/marin) wurde durch Isotopenanalysen am MFN (AG Struck) mithilfe der Kohlenstoffisotopensignatur ($\delta^{13}\text{C}$) bestimmt. Die Universität Stockholm (AG Humborg) hat das Vorhaben beratend unterstützt.

Darstellung der erreichten Ergebnisse und Diskussion im Hinblick auf den relevanten Forschungsstand, mögliche Anwendungsperspektiven und denkbare Folgevorbaben

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

J Simon, J Overmann

Innerhalb des ATKiM Projektes hat sich die DSMZ auf die Identifizierung und Isolierung von repräsentativen Bakterien konzentriert, die möglicherweise an dem Abbau von tDOM beteiligt sind. Dazu wurden Langzeit-Mesokosmen im Sommer 2011 und im Winter 2012 etabliert, in denen Wasser des Kalix-Flusses als tDOM-Quelle mit Ostsee-Wasser unterschiedlicher Salinität (2, 7 oder 32) gemischt wurde. Die Mesokosmen wurden zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten (0 bis 56 Tage nach Etablierung) beprobt. Zur Kultivierung tDOM-abbauender Bakterien wurden unter Einsatz einer Hochdurchsatz-Kultivierungs-Technologie (Abb. 2) die Proben in sechs verschiedenen Medien inokuliert und inkubiert. Insgesamt wurden so 240 unterschiedliche Kultivierungsbedingungen getestet. Der Kultivierungserfolg pro Probe wurde mittels der MPN-Methode ("most probable number") auf der Basis der gewachsenen Kulturen pro angeimpfte Kulturen ermittelt. Ein außergewöhnlich hoher Kultivierungserfolg von 39% (typische Werte für marine Proben liegen bei 0,1 - 1 %) wurde mit dem HD-Medium erzielt, welches Spuren verschiedener Kohlenstoffquellen (Glukose, Hefe-Extrakt, Pepton)



Abbildung 2: Hochdurchsatzverfahren zur Kultivierung mittels MultiDrop.

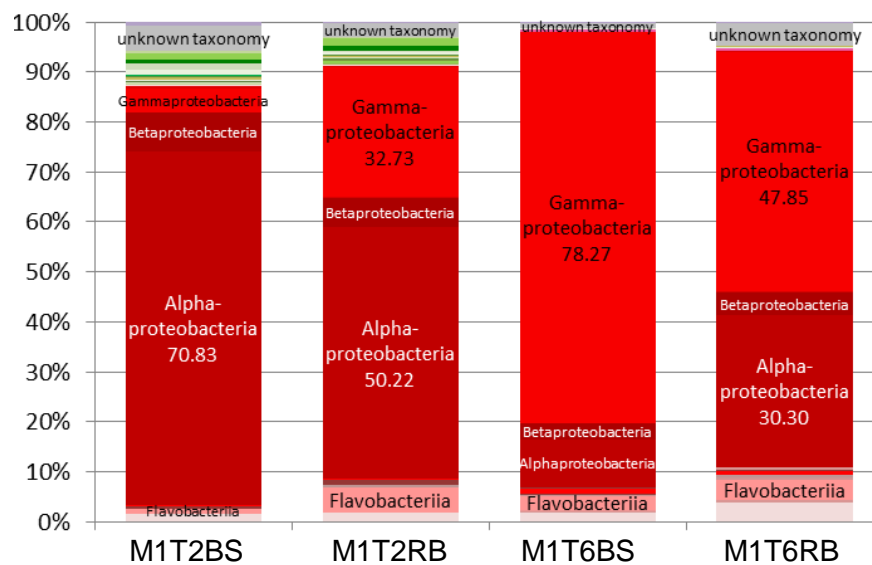
enthielt. Eine Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) der MPN Ergebnisse ergab, dass sowohl die Komplexität der Kohlenstoffquellen-Zusammensetzung, die Beprobungszeitpunkte der Mesokosmen sowie die unterschiedliche Salinität der Ostsee den Kultivierungserfolg beeinflussten. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft wurde zusätzlich durch Denaturierende Gradienten-Gel Elektrophorese von 16S rRNA Amplikons untersucht. Es konnten insgesamt 434 Operative Taxonomische Einheiten (OTUs) unter den gewonnenen Kulturen identifiziert werden. Die kultivierten Bakterien waren vorwiegend *Alphaproteobacteria* (~40%), *Betaproteobacteria* und *Flavobacteria* (je ~15%), *Gammaproteobacteria*, *Sphingobacteria* und *Actinobacteria* (je ~10%). Auf der taxonomischen Ebene der „Klasse“ konnte weder ein quantitativer Unterschied bezüglich der OTU-Zahlen noch ein qualitativer Unterschied bezüglich der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft beobachtet werden. Mit dem HD- Medium konnten die höchsten OTU-Zahlen beobachtet werden, gefolgt von einem Minimal-Medium welches mit Bodenextrakt angereichert worden war (sowohl UV-behandelt wie UV-unbehandelt). Die niedrigsten OTU-Zahlen wurden mit einem Medium, das lösliche Huminstoff-Analoga enthielt, erreicht. Tatsächlich sind gerade die Isolate aus diesem Medium die vielversprechendsten Kandidaten für einen möglichen tDOM-Abbau. Multivariate statistische Analyse zeigte, dass auch die Kohlenstoffzusammensetzung und der Salzgehalt sowie Nitrat- und Phosphat-Gehalt einen messbaren Einfluss auf die Zusammensetzung der kultivierbaren Bakterien zeigte.

Wir konnten erfolgreich 45 Isolate in Reinkultur gewinnen, weitere 37 Isolate befinden sich in entsprechenden Aufreinigungsschritten. Wir gehen davon aus, dass wir bis zu 35 neue Arten sowie 3 neue Gattungen identifizieren werden, die wir intensiv auf ihre Fähigkeit zum Abbau von tDOM und auf weitere neuartige metabolische Aktivitäten testen und dann auch publizieren werden.

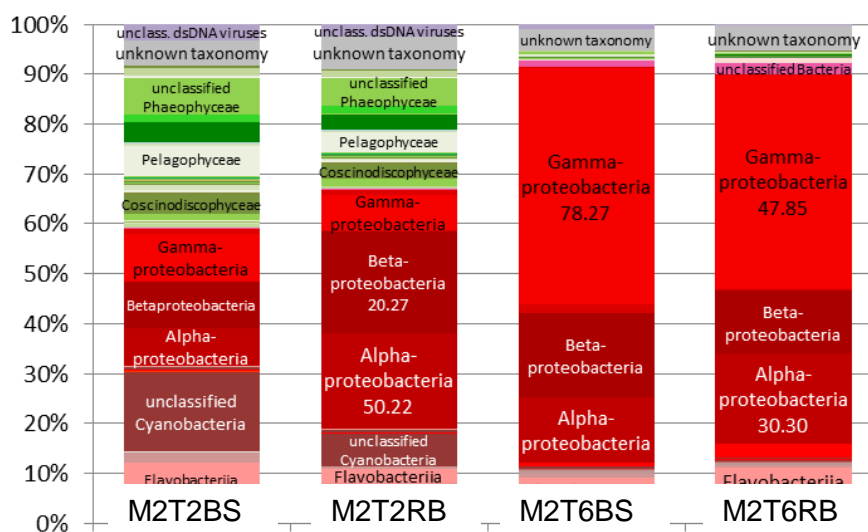
E.-M.-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Marine Biotechnologie (EMAU)
S Markert, T Schweder

Im Fokus dieses Teilprojektes des ATKiM-Verbundes stand die Identifizierung von umwelt-relevanten Markerproteinen, die die physiologische Aktivität sowie spezifische Abbauleistungen der Mikroorganismengemeinschaft widerspiegeln. Dazu wurden auf zwei meereswissenschaftlichen Ausfahrten, im November 2011 und im Mai 2012, Ostsee-Wasserproben genommen. Die Proben von drei Standorten unterschiedlicher Salinität (M1: Salzwasser, M2: Brackwasser und M3: Süßwasser) wurden anschließend mit steril filtriertem tDOM-haltigem Kalix-Wasser inkubiert. Zur Aufklärung der wichtigsten Stoffwechselfunktionen innerhalb der Mikrobengemeinschaft und zur Identifizierung der metabolisch aktivsten, am tDOM-Abbau beteiligten taxonomischen Gruppen wurden Metaproteom-Analysen durchgeführt. Die vorläufigen Ergebnisse dieser vergleichenden Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich Proteinfunktionen und taxonomische Zusammensetzung an den verschiedenen Standorten charakteristisch unterscheiden (Abb. 3).

(A)



(B)



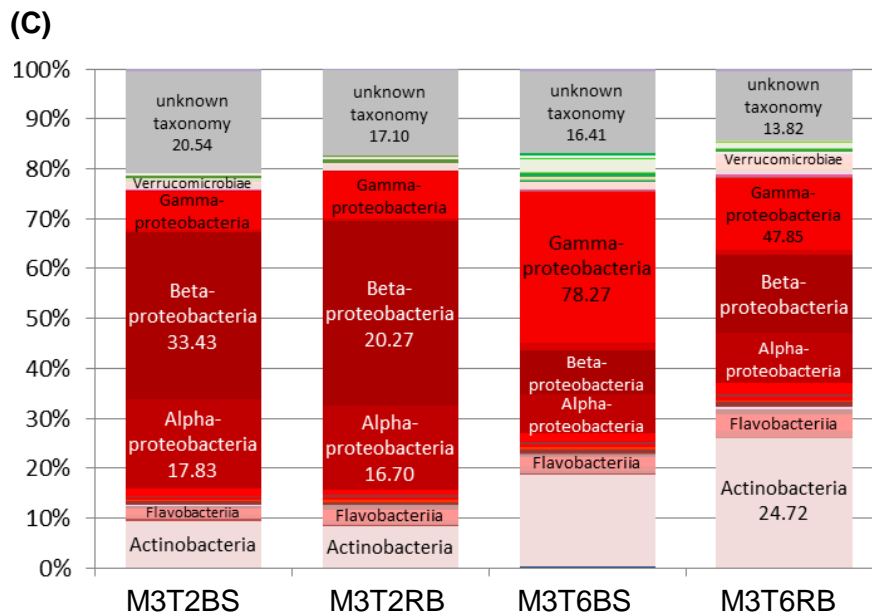


Abbildung 3: Taxonomische Zuordnung der Identifizierten Proteine bei (A) marinen, (B) mesohalinen, und (C) oligohalinen Inkubationsbedingungen.

Die bisherigen Analysen zeigten in allen Proben u.a. eine hohe Abundanz von ATPasen, Elongationsfaktoren, Chaperonen und anderen vegetativen Proteinen. Darüber hinaus konnten jedoch in marinen Proben (M1) verschiedene TRAP- und ABC-Transporter in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden, während in Brackwasserproben (M2) eine signifikant erhöhte Konzentrationen von Phasinen (Strukturproteinen an der Oberfläche von PHB-Speicher-Granulae) und extrazellulären Substratbindungs-Rezeptoren detektiert wurden. Proben vom Süßwasserstandort M3 dagegen enthielten große Mengen spezifische TRAP- und ABC-Transporter, die sich von denen in M1 deutlich unterschieden, sowie ein spezielles RNA-Bindeprotein. TRAP-Transporter sind spezifische Aufnahmesysteme für verschiedenste carboxylierte Substrate (Mulligan *et al.*, 2011), und die weit verbreiteten ABC-Transporter sind am marinen DOC Stoffwechsel maßgeblich beteiligt (Jiao *et al.*, 2010). Die genaue Funktion dieser abundanten Proteine in ihren jeweiligen Umgebungen wird zurzeit im laufenden Auswerteprozess ermittelt.

Die beobachteten standortspezifischen Unterschiede erwiesen sich überraschend als größer, als die Veränderungen, die durch die Zugabe von tDOM hervorgerufen wurden. Dies wurde beim Vergleich der mit tDOM inkubierten Proben mit unbehandelten Proben vom selben Standort deutlich. Aus vorläufigen Ergebnissen geht hervor, dass Alkohol-Dehydrogenasen, welche bei der Ethanolamin-Verwertung eine Rolle spielen (Stojiljkovic *et al.*, 1995), in Anwesenheit von tDOM in den Brackwasser-Proben in höheren Konzentrationen vorliegen, als in den Vergleichsproben ohne tDOM. Darüber hinaus zeigte sich anhand des Vergleichs der beiden verschiedenen Inkubationszeiten – die ersten Proben wurden nach einer Woche Inkubation gefiltert, die zweite Probenahme erfolgte nach vier Wochen Inkubation – eine deutliche Veränderung der Populationszusammensetzung: Während in mesohalinen-Proben, die nach einer Woche Inkubation mit bzw. ohne tDOC geerntet wurden, cyanobakterielle Phycobilisomen- und "carbon dioxide concentrating mechanism"-Proteine, sowie verschiedene Porine von *Beta*- und *Alpha*proteobacteria die dominierenden Proteinfunktionen darstellten, wurden nach vier Wochen Inkubation verstärkt Pilus-Proteine der *Gamma*- und *Betaproteobacteria* und "bacterial nucleotide DNA-binding" Proteine der *Gammaproteobacteria* detektiert. In den nach einer Woche gefilterten Brackwasser-Proben stammten 37% der identifizierten Proteine von *Cyanobacteria*; während der weiteren Inkubation sank dieser Wert jedoch nahezu auf 0%. Im Gegensatz dazu konnten nur durchschnittlich 50% der identifizierten Proteine nach einer Woche Inkubation Proteobakterien zugeordnet werden, ihr Anteil stieg jedoch bis zur Probenahme nach vier Wochen Inkubation auf 90%. Diese suk-

zessive Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung während der Dunkel-Inkubation muss bei der noch ausstehenden abschließenden Auswertung der Ergebnisse aller Proben überprüft und im Detail analysiert werden. Zurzeit werden die massenspektrometrischen Mess-Ergebnisse aller Proben zur Proteinidentifizierung gegen standort-spezifische Metagenom-Datenbanken gesucht. Sobald ein finaler kompletter Datensatz vorliegt, können die oben genannten vorläufigen Ergebnisse überprüft, ausgewertet und diskutiert werden, wodurch Rückschlüsse auf potentielle tDOM-Abbauprozesse durch Ostsee-Mikroorganismen möglich werden. Bisherige Teil-Ergebnisse deuten nicht auf ausgeprägte, auf Abbau von tDOC zurückzuführende Unterschiede in den mikrobiellen Expressionsmustern hin. Jedoch sind kleinere spezifische Funktionsunterschiede im Proteom der mit und ohne tDOC inkubierten Bakterien im Verlauf der abschließenden Daten-Auswertung zu erwarten. Grundsätzlich spiegeln die identifizierten Proteinfunktionen sowie deren Abundanz die taxonomische Zusammensetzung der Bakterienpopulationen in den Versuchsansätzen wieder. Vor allem auf der Basis der vegetativen Proteine kann damit eine Aussage zur physiologischen Aktivität bestimmter Bakteriengruppen unter den untersuchten spezifischen Umweltbedingungen getroffen werden.

Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW) in Kooperation mit der Brückengruppe für Marine Geochemie (ICBM-MPI, Oldenburg)

M Manecki, D Schulz-Bull, T Dittmar

Unsere Hauptforschungsfragen waren (1) die Verteilung und Zusammensetzung des gelösten organischen Materials (DOM) in der Ostsee sowie dessen saisonale Verteilung zu beschreiben und (2) zu klären ob verschiedene mikrobiologische Gemeinschaften aus der Ostsee in der Lage sind, bestimmte Fraktionen davon abzubauen. Die Gesamtmenge an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC) wurde gemessen sowie die molekulare Zusammensetzung des DOM, mittels hochauflösender Massenspektrometrie, bestimmt. Beides erfolgte auf den Ostsee Transekten sowie im Rahmen der Inkubationsexperimente. Die experimentellen Arbeiten wurden am Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW) oder auf dem FS Meteor im November 2011 und Mai 2012 durchgeführt. Die Bestimmung der DOM Zusammensetzung am ultrahoch-auflösenden 15 Tesla-Fourier-Transformationen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) wurde in der ICBM-MPI Brückengruppe für marine Geochemie durchgeführt. Insgesamt wurden über 500 unterschiedliche Proben am FT-ICR-MS gemessen und miteinander verglichen. Hierfür wurden die Proben nach dem Protokoll von (Dittmar *et al.*, 2008) extrahiert. Die Extraktionseffizienz dieses Verfahrens beträgt auf Kohlenstoffbasis etwa 75%.

Durch die erhöhte Zufuhr von Flusswasser im Bereich der nördlichen Ostsee konnte im April-Mai 2012 ein großer Einfluss von terrigenem organischen Materials (tDOM) beobachtet werden (Abb. 4). Ein charakteristischer molekularer Fingerabdruck konnte für diese Wassermassen berechnet werden. Die Verteilung des extrahierbaren gelösten organischen Kohlenstoffs (SPE-DOC) in der Ostsee ist in der Abb. 4a zu sehen. Die erste Achse der Hauptkoordinatenanalyse stellt 45% der Probenvarianz dar und bildet sehr deutlich den Einfluss des tDOM auf die Ostsee ab. Entlang des Salzgehaltes zeigt sich ein deutlicher Trend vom Skagerrak bis zum Bottensee (Abb. 4B).

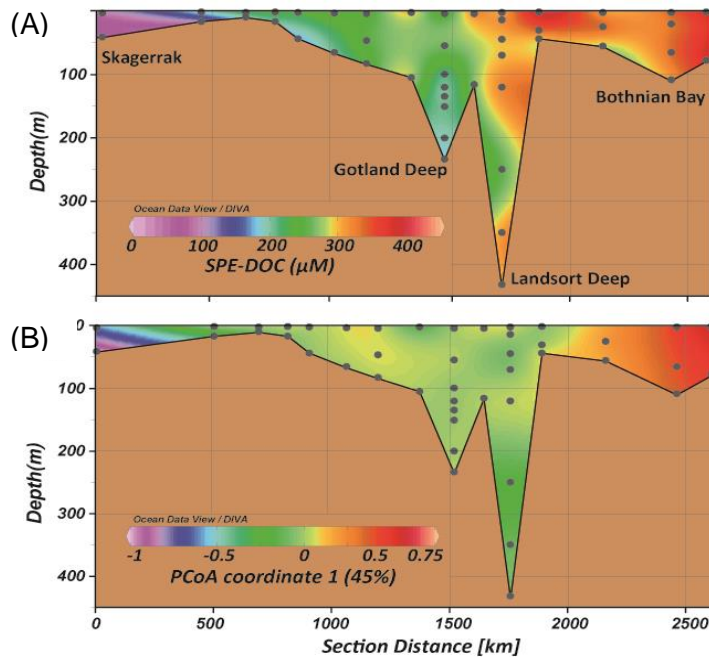


Abbildung 4: April-Mai 2012 Fahrt M87/3 vom Skagerrak (Süden) zur Bottensee (Norden). a) Verteilung des extrahierbaren DOC (SPE-DOC). b) Werte der ersten Koordinate der Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) berechnet mit allen detektieren Summenformeln der Proben innerhalb des Transektes (>5900).

Um unsere zweite Fragestellung zu beantworten, reicherten wir Ostseewasser mit tDOM an und inkubierten dieses über 60 Tage. Die Messungen wurden 2013 abgeschlossen und verschiedene multivariate statistische Methoden verwendet, um Veränderungen in der Zusammensetzung des DOM während der Inkubationszeit zu bestimmen. In keinem der Experimente wurden konstante und signifikante Unterschiede in den DOM-Zusammensetzungen über die Inkubationszeit beobachtet. Dies führt zu dem Schluss, dass die meisten tDOM Moleküle kein geeignetes Substrat für die mikrobiellen Gemeinschaften in der Ostsee, unabhängig von der Jahreszeit und dem Salzgehalt, darstellen. Um hochspezifische Prozesse zu erkennen, haben wir nun begonnen den DOM Datensatz mit den mikrobiologischen Ergebnissen zu verknüpfen.

Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW)

AG Mikrobielle Ökologie

DPR Herlemann, C Meeske, K Jürgens

Die Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften ändert sich entscheidend entlang des Salzgradienten von Ästuaren (Herlemann *et al.*, 2011). Um die Auswirkung der sich veränderten Bakteriengemeinschaften auf den Abbau von tDOM zu untersuchen wurde in diesem Teilprojekt die bakterielle Aktivität, die taxonomische Bakterienzusammensetzung sowie die Präsenz funktioneller Gene (Metagenom) in den Inkubationsexperimenten untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von tDOM weder zu einer Erhöhung der bakteriellen Aktivität, noch zu einer signifikanten Stimulation des DOM-Abbaus geführt hat. Eine erhöhte bakterielle Aktivität und DOM-Abbau konnte gemessen werden, wenn das tDOM mit UV-Licht vorbehandelt wurde (Abb. 5). Die Anwendung von UV-Licht führt zu einer Fragmentierung der komplexen organischen Molekülen und erhöht dadurch die Bioverfügbarkeit (Herndl *et al.*, 1997). Da das unbehandelte tDOM keine Erhöhung der mikrobiellen Aktivität hervorgerufen hat, ist davon auszugehen, dass tDOM nur in sehr geringem Ausmaß von Mikroorganismen im Salzgradient der Ostsee abgebaut wird.

Im Gegensatz zur bakteriellen Aktivität wurde ein signifikanter Effekt auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft bei der Zugabe von tDOM (unbehandeltes sowie UV-vorbehandeltes) unter marinen sowie mesohalinen Bedingungen im Vergleich zu den Kon-

trollansätzen festgestellt (Abb. 6). Ein geringer Effekt wurde bei oligohalinen Bedingungen gemessen. Dies deutet darauf hin, dass bestimmte Bakteriengemeinschaften bei marinen und mesohalinen Bedingungen auf die Zugabe von tDOM reagieren.

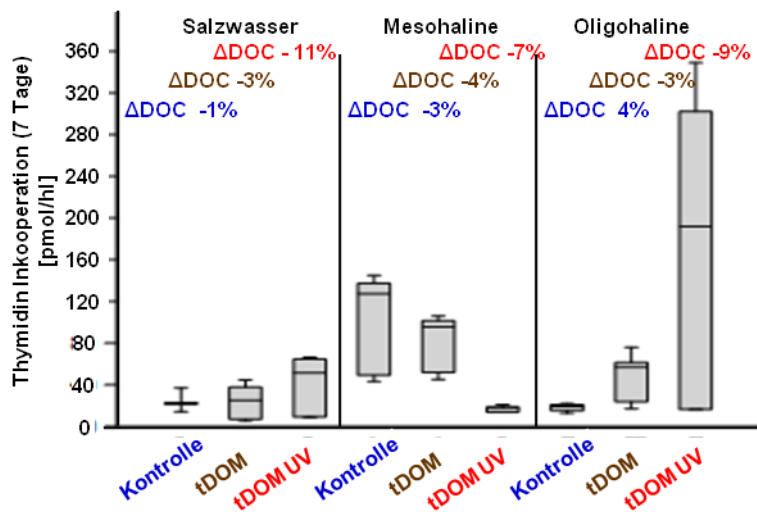


Abbildung 5: Änderung in der Konzentration von gelöstem organischen Kohlenstoff (ΔDOC) und Boxplots der bakteriellen Produktion in den Mesokosmen gemittelt zwischen Tag 0-7. Dargestellt sind die unterschiedlichen Salzregimes (Salzwasser, (Salinität 34), Mesohalin: (Salinität 7), Oligohalin: (Salinität 3) und Manipulationen (Kontrolle, tDOM- Zugabe, UV Behandlung).

Die Bakteriengemeinschaft bei oligohalinen Bedingungen scheint an die Anwesenheit von tDOM angepasst zu sein, da nur die Manipulation durch UV- Licht eine signifikante Veränderung der Bakterienzusammensetzung hervorgerufen hat. Das Vorhandensein von spezifischen Bakteriengemeinschaften hat jedoch nicht zu einer deutlich erhöhten Bakterienaktivität oder Abbau von tDOM in den Mesokosmen geführt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das zugegebene tDOM als im Wesentlichen schwer-abbaubar eingeordnet werden muss und daher einen geringen Einfluss auf den aquatischen Kohlenstoffkreislauf hat. Ein ähnliches Ergebnis lieferten die Ergebnisse im November, wo die Reaktion der Bakteriengemeinschaften noch geringer ausfiel. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen haben mehrere vorangegangene Studien ebenfalls einen geringen oder keinen Abbau von subarktischen tDOM dokumentiert (Köhler *et al.*, 2003).

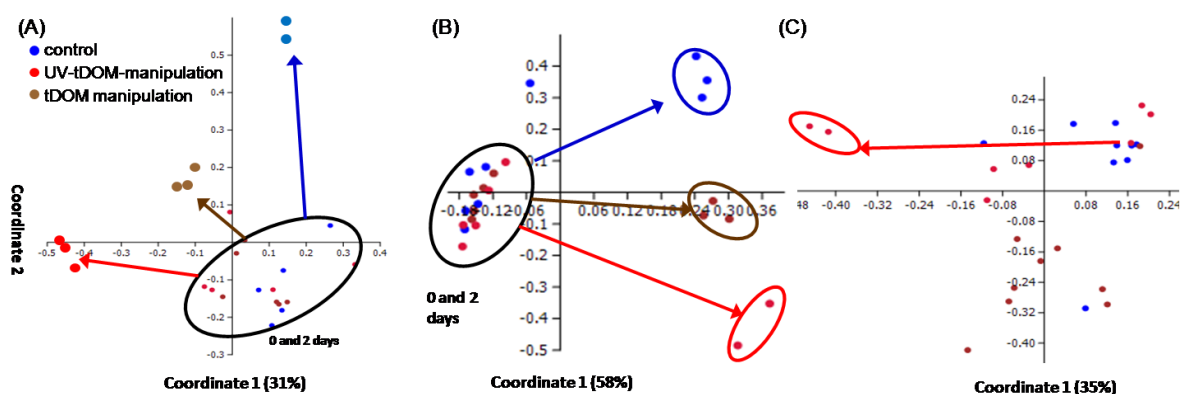


Abbildung 6: Hauptkoordinatenanalyse (PCoA), welche die Reaktion der Bakteriengemeinschaft auf die Zugabe von terrigenen Kohlenstoffverbindungen bei (A) Salzwasser, (B) mesohalinen und (C) oligohalinen Bedingungen zeigt.

Zusammenfassend haben wir festgestellt, dass die Bakteriengemeinschaft bei oligohalinen Bedingungen am besten an tDOM angepasst ist. Dies legt nahe, dass ein Großteil des tDOM-Abbaus bereits bei Süßwasserbedingungen in der nördlichen Ostsee bzw. in den Flüssen stattfindet. Frühere Studien haben gezeigt, dass tDOM in den Binnengewässern sequestriert

und abgebaut werden kann (Battin *et al.*, 2009). Dies führt zu einer Änderung der Quantität und Qualität des dem Meer zugeführten tDOM. Im Gegensatz dazu haben Studien in Flussmündungen gezeigt das tDOM abnimmt (van Dongen *et al.*, 2008). Weitere Prozesse, wie Saisonalität (UV-Strahlung, Phytoplanktonblüten), Flokkulation und mikrobieller Abbau im Sediment könnten daher eine Rolle bei dem Abbau von tDOM spielen.

Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB)

Abteilung: Experimentelle Limnologie

A Rieck, HP Grossart

Im Teilprojekt des IGB wurde die Verfügbarkeit und Besiedlung von terrigenem Kohlenstoff durch partikel-assoziierte (PA) Bakterien ($> 5\mu\text{m}$) und Pilze entlang des Salinitätsgradienten über die gesamte Ostsee hin untersucht. Im Gegensatz zu den Bakterien wurden die Pilze mittels 18S rRNA-Genmarkern, quantitativer PCR und Kultivierung auf spezifischen Selektivmedien für die Polymer-abbauenden Laccasen und Peroxidasen bestimmt. Sowohl Bakterien und Pilze wurden am „Berlin Genome Centre“ der FU-Berlin (BeGeDiv) amplikonsequenziert und die Sequenzen mit Hilfe von SilvaNGS ausgewertet.

Ausgehend von der Tatsache, dass Jørgensen & Stepanauskas (2009) die Verbreitung von Pilzen in der Ostsee mittels Ergosterol-Messung nachgewiesen haben, formulierten wir die Hypothese, dass aquatische Pilze eine besondere Rolle bei dem Abbau von terrigenem Kohlenstoff in der Ostsee einnehmen, vor allem im oligohalinen Teil. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass sie nur höhere Pilze detektiert, insbesondere Hyphomyceten. Das bedeutet, dass bislang noch keine Daten bezüglich der Verteilung von Pilzen in der oxischen Zone entlang des Salinitätsgradienten der Ostsee mittels Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung vorliegen.

Neben der Teilnahme an den Hauptexperimenten (Batch-Inkubation, Abb. 1) wurde ein zusätzliches Rollertank-Experiment durchgeführt, um die Rolle der erhöhten Aggregation auf die Dynamik von PA-Bakterien und Pilzen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft (mittels Biomasseproduktion und Respiration) und deren Abundanz (mittels Epifluoreszenzmikroskopie (SybrGold)), analysiert. Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft wurden mit denselben Methoden wie im Hauptexperiment bestimmt. Zusätzlich wurde eine Reihe von quantitativen und qualitativen chemischen Analysen, hauptsächlich von den ATKiM-Projektpartnern, durchgeführt, z.B. die DOC- und POC-Messungen, die FT-ICR-MS, die Flüssigkeitschromatographie mit Kohlenstoffdetektor (LC_OCD) und die Messung der stabilen Isotope.

Die Ergebnisse der LC_OCD Messung zeigten eine starke Veränderung der chemischen Qualität des Kalix-Flusswassers nach UV-Bestrahlung (61% Chromatophore DOC Abnahme), was darauf hindeutet, dass das DOC einen hohen Anteil an chromophoren Gruppen enthält. Die Ergebnisse des Rollertankexperimentes zeigten eine geringere Veränderung des terrigenen organischen Materials durch die Bestrahlung mit UV (21% Abnahme), was sich durch einen Verdünnungseffekt der Probe erklären lässt. Darüber hinaus zeigte sich eine deutliche DOC-Abnahme in den Rollertanks (ca. 15%) nach 56 Tagen. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil des POCs proportional zu, was auf eine zunehmende bakterielle Aggregation hindeutete. Wie aus den Literaturangaben zu erwarten war, stieg die POC-Konzentration proportional zur Abnahme des DOC an (Dinasquet *et al.*, 2013). Dabei zeigte der oligohaline Versuchsansatz die höchsten ΔDOC -Werte im gesamten Sommerexperiment. Der Effekt der Aggregation (Biofilmbildung) auf den DOC-Abbau (gemessen im Rollertankexperiment) entsprach dem Effekt der UV-Bestrahlung im Hauptexperiment. Die POC-Konzentration stieg um mehr als 100% im Sommerexperiment an. Zusätzlich hatte der Kontrollansatz durchgehend geringere POC Konzentrationen als die Ansätze mit Kalix-Flusswasser. Darüber hinaus zeigten die stabilen Isotopenmessungen ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), welche von unseren Projektpartnern zur Verfügung gestellt wurden, ein stärkeres terrigenes Signal nach 56 Tagen Inkubation. Man sollte dabei allerdings beachten, dass der Versuch über einen relativ geringen Zeitraum von

nur 56 Tagen durchgeführt wurde, was wahrscheinlich nicht ausreichend ist, um den mikrobiellen Abbau des semi-refraktären Materials vollständig zu gewährleisten.

Im Rollertank-Experiment zeigte sich auch ein Anstieg der bakteriellen Proteinproduktion (BPP), besonders der an Partikel assoziierten (PA) Bakterien, welcher durch die UV Bestrahlung noch verstärkt wurde. Die zellspezifische BPP lag in der Partikelfraktion durchgehend höher als in der Fraktion der freilebenden (FL) Bakterien, was darauf hindeutet, dass durch die Aggregation die gesamte bakterielle Produktion verstärkt wird. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls im Hauptexperiment. Zwar haben die PA-Bakterien durchgehend eine geringere Abundanz als die FL-Bakterien (weniger als 10%), wobei ihre zellspezifische Aktivität jedoch bis um den Faktor 10 höher lag. ANOSIM-Untersuchungen des Rollertankexperiments zeigten, dass sich die bakterielle Gemeinschaft signifikant ($p < 0.001$) im Inkubationszeitraum (0 und 56 Tage), in den Fraktionen (PA/FL), im POC-Gehalt und in der zellspezifischen BPP unterscheiden. Eine signifikante Änderung in der bakteriellen Gemeinschaftsstruktur aufgrund der Zugabe von terrigenem Kohlenstoff konnte jedoch nicht festgestellt werden.

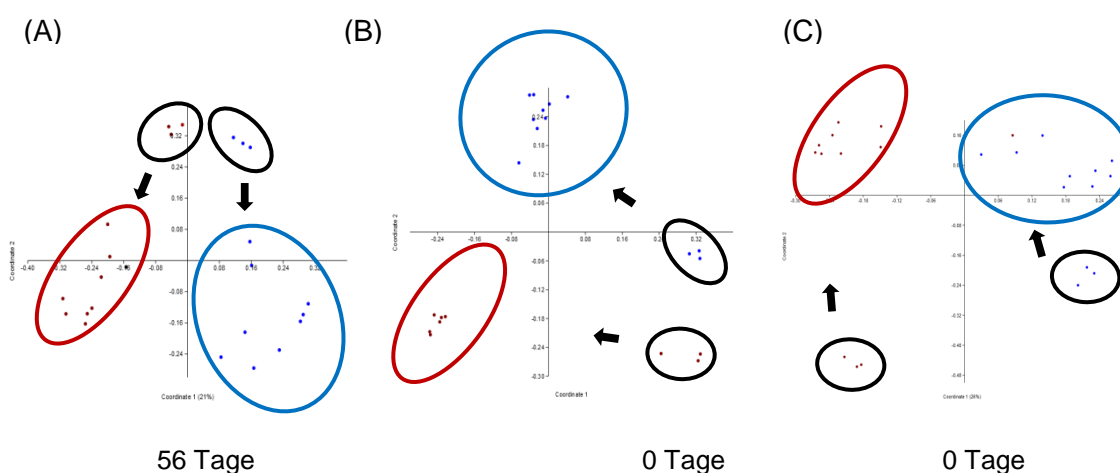


Abbildung 7: Hauptkomponentenanalyse (PCoA) der bakteriellen Gemeinschaftszusammensetzung zu Beginn und am Ende der Inkubation (0 und 56 Tage) sowie die Veränderung der an Partikeln assoziierten Bakteriengemeinschaft (Rote Punkte) und der freilebenden Bakterien (Blaue Punkte) im Rollertank Experiment. A) marine Bedingungen, B) mesohaline Bedingungen, C) oligohaline Bedingungen.

Abbildung 7 zeigt die Änderung der bakteriellen Gemeinschaftsstruktur am Anfang vs. Ende der Inkubation (0 und 56 Tage) und darüber hinaus den Unterschied zwischen PA (rote Punkte) - und FL-Bakterien (blaue Punkte) mittels Hauptkomponentenanalyse (PCoA) unter marinen (A), mesohalinen (B) und oligohalinen Bedingungen (C). Es zeigte sich eine klare Veränderung in der bakteriellen Gemeinschaft über die Inkubationszeit hinweg und eine, vor allem am Ende der Inkubationszeit, klare Auftrennung der Bakteriengemeinschaft entsprechend der PA und FL Fraktionen.

Ein Vergleich der Ausgangsgemeinschaften zwischen Sommer- und Winterexperiment (Abb. 8 A, B) zeigt, dass die Bakterien-Diversität im Winter höher lag als im Sommer. Ausgehend von einer Summe von 350 OTUs im Sommer waren 177 OTUs in der marinen, 148 OTUs in der mesohalinen und 227 OTUs in der oligohalinen Station vertreten. Somit wies die oligohaline Station die höchste und die mesohaline Station die geringste Diversität auf. Im Winter betrug die Summe unterschiedlicher OTUs 541, von denen 322 OTUs in der marinen, 257 OTUs in der mesohalinen und 286 OTUs in der oligohalinen Station vertreten waren. Somit zeigte auch hier die mesohaline Station die geringste Diversität. Darüber hinaus gab es einen Wechsel der höchsten Diversität von der oligohalinen zur marinen Station. Die Mehrheit der mesohalinen OTUs ist ebenfalls an den beiden anderen Stationen zu finden, wobei der

exklusive Anteil im Winter höher liegt. Es ist generell ein hoher Anteil an OTUs zu finden, den alle drei Stationen teilen. Der Vergleich der fraktionierten Proben zeigt, dass ein Großteil der OTUs, besonders in der Schnittmenge, wo alle Stationen vertreten sind, in beiden Fraktionen vorkommt. Der Anteil der ausschließlich in der Partikelfraktion vorkommenden OTUs ist zudem sehr hoch, besonders in der marinen Station. Somit haben PA-Bakterien einen substantiellen Anteil an der Diversität der mikrobiellen Gesamtgemeinschaft.

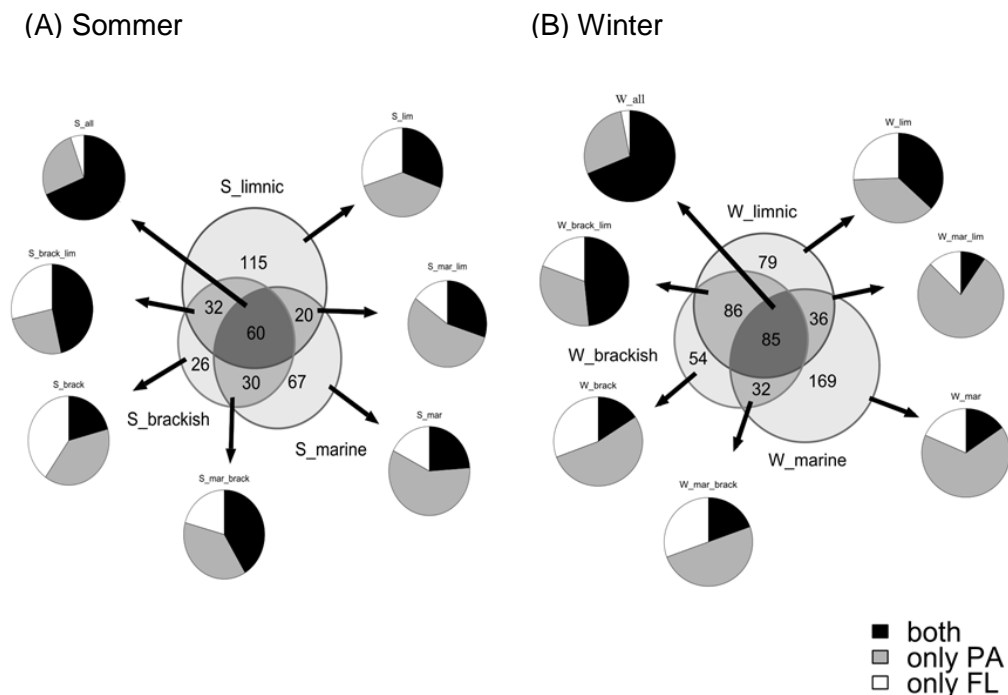


Abbildung 8: Venn Diagramm der OTU Verteilung des normalisierten Datensatzes (430 reads) der Ausgangsbakteriengesellschaft der marinen, mesohalinen und oligohalinen Station in Sommer (A) und Winter (B). Flächen der Kreise zeigen den proportionalen Anteil der OTUs. Zusätzlich ist eine Übersicht über ausschließlich partikelassoziierte (only PA) und freilebende (only FL), als auch der in beiden Fraktionen vorkommenden (both) OTUs gegeben.

Während des Experiments kam es zu einer Veränderung in der PA-Gemeinschaft in Richtung *Gammaproteobacteria* zwischen Tag 7 und 13 in allen Experimenten. *Alphaproteobacteria* und *Bacteroidetes* dominierten zu Beginn des Experiments den marinen Ansatz. Die mesohalinen Proben wurden durch *Bacteroidetes* und *Actinobacteria* dominiert und die oligohalinen Proben durch *Betaproteobacteria*. Vorausgehende Studien haben gezeigt, dass erhöhte Zugaben von terrigenem Kohlenstoff zu einer starken Veränderung in der bakteriellen Gemeinschaft führen (Crump *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde auch eine Verschiebung zu den *Gammaproteobacteria* hin gezeigt (Dinasquet *et al.*, 2013). Jedoch werden die Taxa-spezifischen Änderungen erst auf den niederen phylogenetischen Ebenen deutlich. Die Gemeinschaft am Ende der Experimente zeigte im Rollertankexperiment eine geringere Dominanz der *Gammaproteobacteria* gegenüber dem Hauptexperiment, was ebenfalls auf die Aggregatbildung zurückgeführt werden kann. *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* und *Planctomycetes* nahmen am Ende der Experimente deutlich an Bedeutung zu. Vergleichbar mit der Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft fand nach ca. 7-10 Tagen eine Änderung der Kohlenstoffqualität von ungesättigten Kohlenwasserstoffen in Richtung zu mehr aromatischen und sauerstoffhaltigen Molekülen statt (FT-ICR-MS-Daten). Das deutet darauf hin, dass die dominierenden Mikroorganismen gut angepasst sind, um verschiedene Kohlenstoffquellen zu nutzen. Generell kann man erwarten, dass aquatische Bakterien bevorzugt proteinreiche Substanzen abbauen, bevor sie zu kohlenhydratreichem DOC wechseln (Berggren *et al.*, 2009).

Bedingt durch den hohen experimentellen Aufwand und der hohen Probenanzahl, sowie der Komplexität der Analysen, ist die statistische Auswertung der Ergebnisse noch nicht abgeschlossen. Manuskripte über die Diversität von partikelassoziierten Bakterien in der Ostsee sowie über die Rolle von Aggregation beim terrigenen Kohlenstoffabbau sind in Arbeit.

Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen & Jacobs University gGmbH Bremen

FO Glöckner

Das MPI/Jacobs hat beratend an der Datenanalyse und Standardisierung von Kontextdaten (Metadaten) im ATKiM Projekt teilgenommen. Die studentische Hilfskraft hat an der Entwicklung der SILVANGS Pipeline mitgewirkt, die auch bei ATKiM eingesetzt wurde.

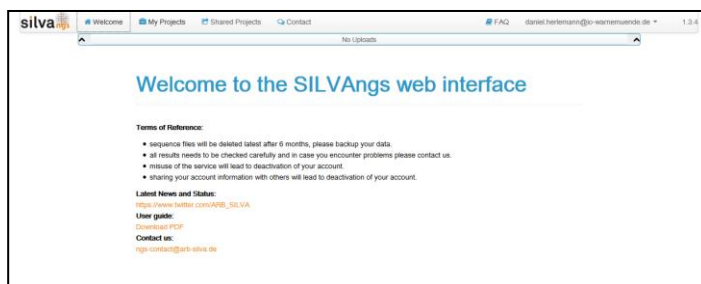


Abbildung 9: Benutzeroberfläche der SILVA NGS Webseite die für die Analyse der 16S rRNA Gen Daten genutzt wurde.

SILVA NGS ist ein Datenanalyse-Service für ribosomale RNA- Gen Amplikons aus der Hochdurchsatz- Sequenzierungen (Next –Generation-Sequencing (NGS)). Es verwendet die SILVA Referenzdatenbanken, Taxonomien und Alignments als Referenz. Es erleichtert die Klassifizierung und bietet eine Fülle von Ergebnissen (Tabellen, Grafiken und Sequenz Dateien) zum Download.

Der grundlegende Arbeitsablauf der Pipeline kann in folgende Schritte unterteilt werden.

- Alignment
- Qualitätsmanagement
- De-Replikation (Identifizierung von identischen Sequenzen)
- Clustering basierend auf benutzerdefinierten Ähnlichkeitswerten (OTU Definition)
- Phylogenetische Klassifikation der OTUs / Sequenzen

Die Ergebnisse des Projekts wurden für die Prüfung und Verbesserung von SILVAngs verwendet, wobei die ATKiM Projektpartner im Gegenzug einen erweiterten Zugang zu SILVAngs erhielten. Weiterhin wurde der standardisierte Austausch von Kontextdaten, sowie die Verwaltung und nachhaltige Hinterlegung von Sequenz- und kontextuellen Daten besprochen. Die von dem Genomic Standards Consortium (MIXS und MIMARKS) festgelegten Mindeststandards sind in Bezug auf die Bedürfnisse der User-Community wie ATKiM bewertet worden. Mehrere Verbesserungen wurden vorgenommen und Version 4.0 des Standards wurde 2014 veröffentlicht <http://wiki.gensc.org/index.php?title=MIXS>. Mit dem Start des DFG-geförderten GFBio (German Federation for Biological Data (www.gfbio.org)) Projekt ist eine nutzerorientierte Service-Infrastruktur für Deutschland für die strukturierte Ablage von Sequenz- und Kontextdaten in öffentlichen Repositories wie EBI / ENA und Pangaea geplant. Durch die Teilnahme des AG Glöckner an diesem Projekt werden die in ATKiM erlangten Erkenntnisse, Eingang finden und zur weiteren Entwicklung der nachhaltigen, standardisierten Ablage und öffentlichen Zugänglichkeit von molekularbiologischen und Umweltdaten beitragen.

Museum für Naturkunde (MfN)

M Nazarova, U Struck

Im Rahmen des SAW Projektes "ATKIM" wurden etwa 600 Wasser- und Schwebstoffproben für Isotopenuntersuchungen gesammelt und analysiert. Für diesen Zweck wurden gemeinsam mit den anderen Projektgruppen zwei Expeditionen im November 2011 und Juni 2012 mit dem Forschungsschiff Meteor durchgeführt. Parallel durchgeführte Inkubationsexperimente während der Expeditionen wurden unternommen, um den Einfluss unterschiedlicher Abbauraten von terrestrischem DOC vs. marinem DOC auf die Isotopenzusammensetzung hin zu untersuchen.

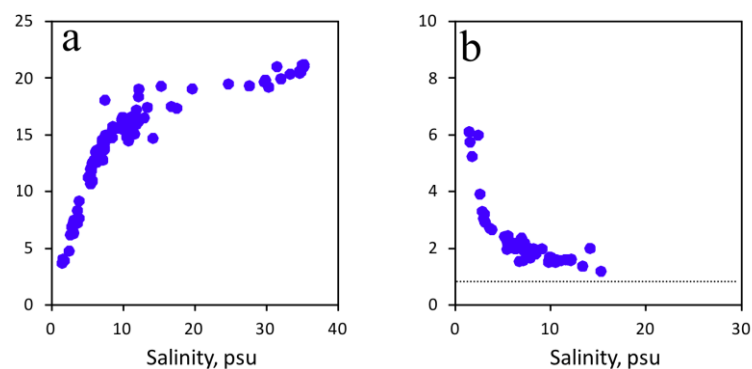


Abbildung 10: Verteilung der Konzentrationen von (a) anorganischen gelösten Kohlenstoff und (b) gelösten organischen Kohlenstoff (DOC) entlang des Salzgradienten während der Meteor-Expedition November 2011. DOC-Konzentrationswerte liegen für Salzgehalte >15 nicht vor, da hier die DOC Konzentrationen unter dem Detektionslimit (ca. 1 ppm) der Analysengeräte lagen. Die starke Abnahme von DOC Konzentrationen bereits nahe der Quellen in die Ostsee weist auf einen effektiven Mechanismus zur Reduktion arktischen DOCs nahe der Eintrags-Quellen hin.

Für diesen Zweck wurde während der ATKIM-Studie die Kohlenstoffisotopenzusammensetzung im partikulären organischen Kohlenstoff (POC), dem gelösten organischen Kohlenstoff (DOC) und im anorganischen gelösten Kohlenstoff (DIC) mit deren jeweiligen Konzentrationen bestimmt. Diese Parameter wurden teilweise mit neuen Analysesystemen bereits an Bord während der Expeditionen gemessen. Zum Einsatz kamen hier ein OI-1030 TOC Analyzer, der mit einem PICARRO i1111 CRDS Kohlenstoffisotopenanalyser gekoppelt ist und ein PICARRO L1102-i Cavity Ring Down Spectrometer für die Analyse von Sauerstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnissen in Wasserproben.

Das Hauptanliegen der Feldstudie war es, die verschiedenen Kohlenstoffpools entlang des Salzgehaltsgradienten von der nördlichen Ostsee ausgehend bis in die Nordsee zu verfolgen und deren Isotopenzusammensetzung auf Effekte der Umsatzprozesse beim Abbau organischer Materie zu studieren. Beispielhaft zeigt Abbildung 10 die Verteilung der Konzentrationen von DIC und DOC entlang des Salzgradienten während der Expedition im November 2011. In parallel durchgeführten Inkubationsexperimenten stieg jeweils die C-Isotopie in den DOC-Proben an während im parallel ansteigenden POC-Pool dessen Kohlenstoffisotopie abnahm. Dies weist darauf hin, dass der DOC Pool einen quantifizierbaren Anteil vom arktischen DOC Pool (mit typischerweise niedrigen Kohlenstoffisotopenwerten) durch Aggregationsprozesse verliert.

Universität Rostock Institut für Chemie Abteilung Chemie (UniR)

S Otto, M Sklorz, T Streibel, R Zimmermann

Bei terrestrischem gelösten organischen Material (tDOM) handelt es sich um eine mehr oder weniger komplexe, polymere Matrix, bei dessen Untersuchung der molekularen Zusammensetzung und Konzentrationen relevanter Stoffe bzw. dessen Veränderungen spezielle analytische Methoden eingesetzt werden müssen. DOM umfasst zahlreiche interessante Substanzklassen, z.B. phenolische Komponenten, die beim Abbau von Lignin entstehen, Mono- und Polysaccharide und organische Säuren, die einen Zugang zur Abschätzung der mikrobiellen in situ Aktivität ermöglichen.

Zuallererst ist es von Bedeutung, einen Überblick über die Zusammensetzung des tDOM vom nördlichen (Bottensee) bis zum südwestlichen Bereich der Ostsee (Skagerrak) zu gewinnen. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Salinität einen potentiellen Einfluss sowohl auf die Distribution als auch die Abbaubarkeit des gelösten organischen Materials besitzt, ergibt sich ein spezifisches Verteilungsmuster. Aus zeitlichen Gründen und aufgrund der komplexen und aufwendigen Messungen wurde der Probenumfang für Untersuchungen zum Transekt der Ostsee und zu den Inkubationsexperimenten auf die Sommerproben (Meteor-Ausfahrt 87/3a) beschränkt. Diese erschienen nach Voruntersuchungen vielversprechender, da sich im Vergleich zu den Winterproben (Meteor-Ausfahrten 86/1a und 86/1b) deutlichere räumliche und zeitliche Unterschiede zeigten.

Um die molekulare Zusammensetzung entlang des Gradienten durch die Ostsee und in den Inkubationsexperiment-Proben im zeitlichen Verlauf zu beleuchten, wurde ein Aufbau der thermischen Desorption/Pyrolyse – Gaschromatographie simultan mit der harten Elektronenstoßionisations-Massenspektrometrie auf der einen und einer weichen resonanzverstärkten Multiphotonenionisation auf der anderen Seite gekoppelt (TD/Py-GC- QMS/ToFMS).

Als ein Ergebnis nehmen die phenolischen Einheiten des Lignins zumeist mit zunehmender Salinität ab. Daneben zeigten die Proben der Inkubationsexperimente für den Pyrolyseschritt (500°C) nur wenige zeitliche Veränderungen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass zum einen diese Unterschiede mehr oder weniger auf den niedrigen Massenbereich begrenzt sind und zum anderen die makromolekularen Stoffe über die betrachteten Zeitskalen hinweg nicht durch die mikrobielle Gemeinschaft abgebaut werden. Multivariate Datenanalysen, speziell Hauptkomponentenanalysen, bestätigten dieses Ergebnis.

Nach der Vorgabe von (Hedges *et al.*, 1982; Miltner & Emeis, 2000) wurde eine Methode zum basischen Aufschluss und zur Derivatisierung von wässrigen Proben entwickelt. Sie ermöglicht den Abbau der komplexen Ligninmatrix neben dem Schutz der relevanten, freigesetzten monomeren Phenolkomponenten. Die Probenvor- und Probenaufarbeitung sind erfolgreich getestet worden. Aufgrund einer zu niedrigen Sensitivität des verwendeten GC-El-QMS-Systems wurde im Hinblick auf eine erwünschte Quantifizierung ein Wechsel zum empfindlicheren doppelt-fokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer (MAT 95) vorgenommen. Nach einer abgeschlossenen Optimierung des Systems werden weitere Analysen zum Ligningehalt bzw. dessen Zusammensetzung folgen.

Der z.T. verwendete Photoionisations-Massenspektrometrie-Aufbau wird kommerziell durch die Firma Photonion GmbH, Schwerin, vertrieben. Im Laufe des Projektes wurden eine Doktorarbeit und eine Diplomarbeit angefertigt.

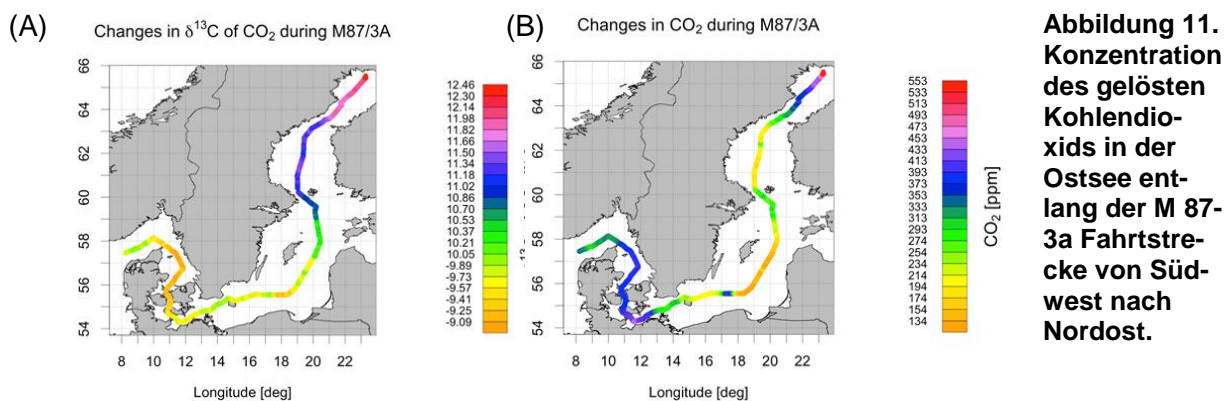
Universität Stockholm, Institut für angewandte Umweltforschung (ITM)

M Geibel, CM Mörth, C Humborg

Mit abnehmendem Salzgehalt verringert sich tendenziell der $\text{CO}_2\text{-}\delta^{13}\text{C}$ Gehalt im DOC von -9 ‰ bei marinen Bedingungen (Salzgehalt 33) zu -12,5 ‰ bei einem Salzgehalt unterhalb 5. Wir nehmen an, dass der Rückgang in der Isotopensignatur des pCO_2 ein direktes Ergebnis

der Veratmung von terrestrischen C- Quellen ist, da die typische $\delta^{13}\text{C}$ Signatur von terrestrischem Kohlenstoff ca. -28‰ sich von der des marinen Phytoplanktons, ($\delta^{13}\text{C} -21\text{‰}$) unterscheidet.

Über die $\delta^{13}\text{C}$ Isotopenzusammensetzung von pCO_2 und Alkalität waren wir auch in der Lage, die Carbonatbildung (CO_2 , HCO_3^{2-}) und die $\delta^{13}\text{C}$ Isotopenzusammensetzung des gelösten anorganischen Kohlenstoff (DIC) entlang der gesamten Salzgehalt-Gradienten zu berechnen (Abb. 11). Die berechnete $\delta^{13}\text{C}$ der DIC stimmt sehr gut mit gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -DIC überein. Die $\delta^{13}\text{C}$ von anorganischen Kohlenstoff-Isotopendaten, zusammen mit der Isotopenzusammensetzung des gelösten organischen Kohlenstoffspeichers, ermöglicht es uns, den Beitrag des terrestrischen Kohlenstoffs zur Gesamtatmung in der Ostsee zu quantifizieren. Diese Messungen, kombiniert mit Modellierungsmethodik, werden in der Regel für die Bestimmung der relativen Remineralisierung der organischen Substanz in einer Wassersäule genutzt.



Im Rahmen dieser Studie wurde ein neues Water Equilibration Gas Analyzer System (WEGAS) der Universität Stockholm genutzt. Es besteht aus drei Hauptkomponenten: Equilibrator (Kopfraumvolumen 1l), Cavity Ring-Down-Spektroskopie (CRDS) Gasanalysegerät für CO_2 stabile Isotope (Modell G2131-i, Picarro Inc., Sunnyvale, CA), Gastransportsystem. Wasser wird im Equilibrator bei 5l/min durch zwei Düsen in feine Tropfen zerstäubt um die Austauschfläche zwischen Wasser und Gasraum zu maximieren, so dass sich ein optimales Gleichgewicht einstellt.

Das Gerät ist nicht für den Kreislaufbetrieb entworfen, der analysierte Gasstrom (25 ml/min) wird entlüftet und von der Umgebungsluft kompensiert. Die Konzentration von CO_2 und CH_4 und der $\delta^{13}\text{C}$ von CO_2 in der Umgebungsluft wird durch häufiges Schalten verglichen. Ein Vergleich mit dem IOW CO_2 -Analysesystem zeigte eine hervorragende Übereinstimmung sowohl in CO_2 und CH_4 -Messungen.

Zitierte Literatur

- Battin TJ, Luysaert S, Kaplan LA, Aufdenkampe AK, Richter A, Tranvik LJ. (2009). The boundless carbon cycle. *Nat Geosci* **2**:598–600.
- Berggren M, Laudon H, Haei M, StrÅm L, Jansson M. (2009). Efficient aquatic bacterial metabolism of dissolved low-molecular-weight compounds from terrestrial sources. *ISME J* **4**:408–416.
- Crump BC, Kling GW, Bahr M, Hobbie JE. (2003). Bacterioplankton community shifts in an Arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl Environ Microbiol* **69**:2253–2268.
- Dinasquet J, Kragh T, Schrøter M-L, Søndergaard M, Riemann L. (2013). Functional and compositional succession of bacterioplankton in response to a gradient in bioavailable dissolved organic carbon. *Environ Microbiol* **15**:2616–28.
- Dittmar T, Koch B, Hertkorn N, Kattner G. (2008). A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. *Limnol Oceanogr Methods* **6**:230–235.
- Van Dongen BE, Zencak Z, Gustafsson Å. (2008). Differential transport and degradation of bulk organic carbon and specific terrestrial biomarkers in the surface waters of a sub-arctic brackish bay mixing zone. *Mar Chem* **112**:203–214.
- Hedges JI, Ertel JR, Leopold EB. (1982). Lignin geochemistry of a Late Quaternary sediment core from Lake Washington. *Geochim Cosmochim Acta* **46**:1869–1877.
- Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J*. **5**:1571–1579.
- Herndl GJ, Brügger A, Hager S, Kaiser E, Obernosterer I, Reitner B, *et al.* (1997). Role of ultraviolet-B radiation on bacterioplankton and the availability of dissolved organic matter. *Vegetatio* **128**:43–51.
- Jiao N, Herndl GJ, Hansell D a, Benner R, Kattner G, Wilhelm SW, *et al.* (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat Rev Microbiol* **8**:593–9.
- Jørgensen NOG, Stepanauskas R. (2009). Biomass of pelagic fungi in Baltic rivers. *Hydrobiologia* **623**:105–112.
- Köhler H, Meon B, Gordeev V V, Spitz A, Amon RMW. (2003). Dissolved organic matter (DOM) in the estuaries of Ob and Yenisei and the adjacent Kara Sea, Russia. *Proc Mar Sci Elsevier (Amsterdam)*, Vol 6 281–310.
- Miltner A, Emeis KC. (2000). Origin and transport of terrestrial organic matter from the Oder lagoon to the Arkona Basin, Southern Baltic Sea. *Org Geochem* **31**:57–66.
- Mulligan C, Fischer M, Thomas GH. (2011). Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* **35**:68–86.
- Stojiljkovic I, Baumler AJ, Heffron F. (1995). Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*: Nucleotide sequence, protein expression, and mutational analysis of the *cchA* *cchB* *eutE* *eutJ* *eutG* *eutH* gene cluster. *J Bacteriol* **177**:1357–1366.

Veranstaltungen im Rahmen des ATKiM Projekts

- 9. März 2011 Kick off Treffen, IOW Warnemünde
- 30. Mai - 7. Juni 2011 tDOM Proben nähme in Kalix, Schweden
- 20. Juni - 24. Juni 2011 ATKiM Summer School, IOW Warnemünde
- 5. Oktober 2011 ATKiM Ausfahrtvorbereitungstreffen, IOW Warnemünde
- 4. November – 5. Dezember 2011 Meteor Ausfahrt M86
- 17. April 2012 ATKiM Ausfahrtvorbereitungstreffen, IOW Warnemünde
- 29. Mai –11. Juni 2012 Meteor Ausfahrt M87
- 2. Oktober 2012 ATKiM Auswertungstreffen
- 14. Februar 2013 ATKiM Auswertungstreffen
- 5. Juni 2013 ATKiM Auswertungstreffen
- 4. – 6. November. 2013 ATKiM Summer School, DSMZ Braunschweig
- 22. – 23. Januar. 2014 ATKiM Abschlusstreffen

Stellungnahme, ob Ergebnisse des Vorhabens wirtschaftlich verwertbar sind und ob eine solche Verwertung erfolgt oder zu erwarten ist; Angaben zu möglichen Patenten oder Industriekooperationen

Die Photoionisation die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde soll durch das Unternehmen Photonion GmbH, Schwerin auf eine mögliche kommerzielle Anwendung überprüft werden. Andere gewerbliche Anwendungen der vorliegenden Ergebnisse sind nicht geplant.

Angabe der Beiträge von möglichen Kooperationspartnern im In- und Ausland, die zu den Ergebnissen des Vorhabens beigetragen haben

Neben den ATKiM Partnern gab es keine anderen Mitwirkenden an diesem Projekt.

Qualifikationsarbeiten, die im Zusammenhang mit dem Vorhaben entstanden sind

Die Arbeit wurde im Rahmen von fünf Doktorarbeiten durchgeführt wobei zwei Doktorandinnen (M Nazarova, MfN; J. Simon, DSMZ) ihre Arbeiten abgebrochen haben. Die Doktorandenstelle der Uni G konnte nicht besetzt werden und wurde von einem Postdoc (Dr. S Markert) zu 50% bearbeitet.

Promotionen (kurz vor Fertigstellung)

- Stefan Otto (Universität Rostock Institut für Chemie Abteilung Chemie)
- Angelika Rieck (Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei)
- Marcus Manecki (Leibniz-Institut für Ostseeforschung, Warnemünde, Meereschemie)

Diplomarbeiten

- Sabrina Erdmann (Universität Rostock Institut für Chemie Abteilung Chemie)

Liste der Publikationen aus dem Vorhaben

- Bergen B., Herlemann D.P.R. and Jürgens K. (2015) Zonation of bacterioplankton communities along aging upwelled water in the northern Benguela upwelling. *Front. Microbiol.* 6:621. doi: 10.3389/fmicb.2015.00621
- Bergen, B., Herlemann, D. P. R., Labrenz, M. and Jürgens, K. 2014 Distribution of the verrucomicrobial clade Spartobacteria along a salinity gradient in the Baltic Sea. *Environ Microb*: 6, 625–630.
- Herlemann D.P.R., Manecki M, Meeske C, Pollehne F, Labrenz M, Schulz-Bull D., Dittmar T., Jürgens K. 2014. Uncoupling of Bacterial and Terrigenous Dissolved Organic Matter Dynamics in Decomposition Experiments. *PLoS ONE* 9(4): e93945. doi: 10.1371/journal.pone.0093945
- Herlemann, D.P.R., Woelk, J., Labrenz, M., Jürgens, K. 2014. Diversity and abundance of “Pelagibacterales” (SAR11) in the Baltic Sea salinity gradient. *Syst. Appl. Microbiol.* 37: 601-604.
- Herlemann D.P.R., Lundin D., Labrenz M., Jürgens K., Zheng Z., Aspeborg H., Andersson A.F. 2013. Metagenomic de novo assembly of an aquatic representative of the verrucomicrobial class Spartobacteria. *mBio* 4(3):e00569-12.
- Otto, S., Erdmann S., Streibel T., M. Manecki, Herlemann D.P.R., Schulz-Bull D., Zimmermann R.. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry with electron-ionization and resonance-enhanced-multi-photon-ionization for characterization of terrestrial dissolved organic matter in the Baltic Sea (submitted).
- Otto, S., Streibel T., Erdmann S., Sklorz M., Schulz-Bull D., Zimmermann R., 2014, Application of Pyrolysis-Mass Spectrometry and Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry with electron-ionization or resonance-enhanced-multi-photon-ionization for characterization of crude oils, *Analytica Chimica Acta*.
- Rieck A., Herlemann, D.P.R., Jürgens, K., Grossart, H.P. Particle-associated bacteria substantially contribute to diversity of marine, mesohaline and oligohalinesurface-bacteria in the Baltic Sea (submitted)

Darstellung der Maßnahmen zur Sicherung und Verfügbarmachung der im Vorhaben produzierten Forschungsdaten

Die generierten 16S rRNA Gen Daten und Metagenomdaten wurden bei European Nucleotide Archive hinterlegt. Die bereits veröffentlichten Daten sind unter der acc. PRJEB4004 hinterlegt.

Pressemitteilungen

04.03.2011 "Was passiert im Meer, wenn Dauerfrostböden ihre Kohlenstoff-Depots freigeben?" Barbara Hentzsch, Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde

Leibniz Nordost (12): "Wird Klimawandel sich selbst verstärken?" Dagmar Amm und Barbara Hentzsch, Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde