

(zu Nr. 8.2 NKBF 98)

Schlussbericht zu Nr. 8.2

ZE:	Förderkennzeichen:
Fraunhofer IGB	161B0871B
Vorhabensbezeichnung:	
BioProMare: KiGuMi – Biotechnologisches Potential des Darm-Mikrobioms des Antarktischen Krills, Teilprojekt B	
Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2020 – 31.01.2023	
Berichtszeitraum: 01.02.2020 – 31.01.2023	

Teil I: Kurzbericht

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung:

Mit dem KiGuMi-Projekt sollen verschiedene, zentrale Ziele erreicht werden, um die marine Biotechnologie mit Krill als Modellorganismus weiter zu entwickeln. Dabei sollen gefrorene Krill-Proben zuvor während einer Expedition im Südpolarmeer gewonnen werden.

Einrichtung einer Biobank: Eines unserer Hauptziele im Gesamtprojekt ist es, eine Biobank mit Kulturen aus dem Krill-Darm-Mikrobiom anzulegen. Mithilfe mikrobiologischer Isolierungs- und Kultivierungstechniken wird Krill sezieren um Zugang zu seinem Verdauungstrakt zu erhalten. Dieser dient als Inokulum für selektive Kulturen mit dem Ziel, ein Inventar isolierter, mikrobieller Spezies und Stämme aus dem Darmmikrobiom von *E. superba* zu erstellen. Mittels funktioneller Plattenassays sollen im Rahmen des Projekts insbesondere hydrolytische Enzyme identifiziert werden.

Metagenomik-Datenbank: Der nächste Meilenstein stellt die Erstellung einer umfassenden metagenomischen Datenbank aus gefrorenen Krillproben dar. Bei der DNA-Sequenzierung werden sowohl Short-Read- (Illumina) als auch Long-Read-Technologien (MinION) eingesetzt. Die Datenbank wird neue Einblicke in die taxonomische Vielfalt und das genetische Repertoire des Krill-Darm-Mikrobioms bieten und als grundlegende Ressource für nachfolgende Phasen und künftige Forschung dienen.

Identifizierung des funktionellen Repertoires: Wir werden eine robuste Pipeline zur Erforschung der funktionellen Aspekte des Krill-Darm-Mikrobioms entwickeln. Es wird ein integrierter Ansatz entwickelt, der Metatranskriptomik, Metaproteomik und gezielte Metabolomik (metaOMICS) umfasst. Die Pipeline wird hauptsächlich anhand von

gefrorenen Krillproben validiert, und ihre Anwendung wird industriell relevante Erkenntnisse liefern.

2. Ablauf des Vorhabens

Wir führten eine taxonomische Charakterisierung von Kulturen und Extrakten durch DNA-Amplikon-Sequenzierung durch: Wir verwendeten die Amplikon-Hochdurchsatz-Sequenzierung des 16S rRNA-Gens, um komplexe mikrobielle Gemeinschaften im Krill-Verdauungstrakt zu untersuchen. Die DNA wurde entweder aus dem Magen oder aus dem gesamten Verdauungstrakt extrahiert und durch gezielte PCR amplifiziert. Für eine umfassende Charakterisierung wurden drei Sequenzierungsansätze kombiniert: Nanopore-Sequenzierung für nicht kultivierbare und kultivierbare Mikrobiome und Sanger-Sequenzierung für Isolate. Wir erhielten gefrorenes Gewebe und isolierte Nukleinsäuren von der Gruppe unseres Partners B. Meyer und führten eine Hochdurchsatz-Sequenzierung von metagenomischer DNA aus Krill-Därmen durch. Die Proben umfassten sowohl einzelne als auch gepoolte Exemplare aus dem Krillmagen, der Krilldrüse und dem gesamten Verdauungstrakt. Außerdem wurden insgesamt 72 Krillproben verarbeitet, darunter Proben, die bei Raumtemperatur und 4 °C kultiviert wurden. Die DNA wurde isoliert, und ausgewählte Proben wurden einer Long-Read- und Short-Read-Sequenzierung unterzogen. Es wurde ein umfassendes Metagenom erstellt, das eine bemerkenswerte Vielfalt an Bakterientypen und enzymatischen Potenzialen erkennen ließ. Die meisten identifizierten Contigs waren der taxonomischen Ordnung Alteromonadales zuzuordnen, was mit bekannten Daten über marine Mikrobiome übereinstimmt.

Zwei Bakterienstämme mit vielversprechendem hydrolytischem Potenzial wurden identifiziert und sowohl mit Oxford Nanopore- als auch mit Illumina-Technologien sequenziert. Für die Genomassemblierung wurde eine gut validierte hybride Assemblierungspipeline verwendet, und nach der Assemblierung wurde eine funktionelle Annotation durchgeführt.

Wichtigste Ergebnisse und Einschränkungen

- Es wurde eine umfassende metagenomische Charakterisierung erreicht.
- Taxonomische und enzymatische Diversitäten im Krill-Darm-Mikrobiom wurden aufgedeckt.
- Eine metagenomische Analyse unter Verwendung von WGS war aufgrund des überwiegenden Krill-DNA in direkten Darmextrakten nicht möglich.

Unsere Studie lieferte ein detailliertes Verständnis der mikrobiellen Gemeinschaft im Krill-Darm, obwohl weitere Forschung erforderlich ist, um das Potenzial der Daten vollständig zu erkunden.

3. Die wesentlichen Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe B. Meyer und mit der Arbeitsgruppe R. Rabus haben wir eine umfassende metagenomische Charakterisierung des Krill-Darm-Mikrobioms durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Sequenzierungsansätze und -plattformen kombiniert. Unsere Ergebnisse zeigen eine bemerkenswerte taxonomische und enzymatische Vielfalt. Zwei vielversprechende bakterielle Stämme mit hydrolytischem Potenzial wurden sequenziert und analysiert. Diese umfassende Untersuchung ermöglichte die Erstellung einer umfangreichen Datenbank hydrolytischer Enzyme. Dabei wurden zwei vielversprechende bakterielle Stämme mit hohem hydrolytischem Potenzial identifiziert und genomisch sequenziert. Besonders hervorzuheben ist die Entdeckung von 374 nicht-redundanten EC-Kategorien, die zur Klasse der Hydrolasen gehören, und die erfolgreiche taxonomische Zuordnung der meisten Contigs. Die generierten Daten bieten nicht nur eine tiefgehende Einsicht in die mikrobielle Gemeinschaft des Krill-Darms, sondern sind auch eine wichtige Ressource für zukünftige Forschungen auf dem Gebiet der enzymatischen Biokatalyse.

Teil II: Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen

Vorgesehene Arbeiten im Berichtszeitraum laut Antrag: Das Fraunhofer Institut für Grenzflächen - und Bioverfahrenstechnik (IGB) ist im Rahmen des Gesamtprojekts KiGuMi in folgenden Arbeitspaketen involviert:

- WP 1: Isolation of microorganisms from the krill gut (Lead PI: R. Rabus).
- WP 2: Unraveling the diversity of microbial species and genetic repertoires (Lead PI: K. Sohn)
- WP 3: Establishing integrated metaOMICS for krill gut (Lead PI: R. Rabus)
- WP 4: Proof-of-concept: cultivation-dependent studies (Lead PI: H. Wilkes)
- WP 5: Proof-of-concept: different krill feeding scenarios (Lead PI: B. Meyer)
- WP 6: Synthesis (Lead PI: R. Rabus)

Seit unserem letzten Zwischenbericht haben wir unsere Anstrengungen auf mehrere Schlüsselbereiche konzentriert. Erstens haben wir die Hybrid-Metagenom-Assemblierung abgeschlossen. Zweitens haben wir die Analyse der vollständigen 16S rRNA durchgeführt. Zuletzt haben wir die vollständige Genomsequenzierung und die de-novo-Assemblierung ausgewählter Isolate vorgenommen. Diese Aktivitäten zielten auf eine detaillierte Erforschung des Mikrobioms im Darm der Krill ab. Wir haben sowohl kultivierungsabhängige als auch kultivierungsunabhängige Methoden für diese Untersuchung eingesetzt. Unser zweigleisiger Ansatz ermöglichte es uns, die mikrobielle Vielfalt zu erkunden und gleichzeitig das Potenzial für die Hydrolyse von Makromolekülen zu untersuchen. Der endgültige Versuchsplan sah wie folgt aus Abbildung (Abbildung 1):

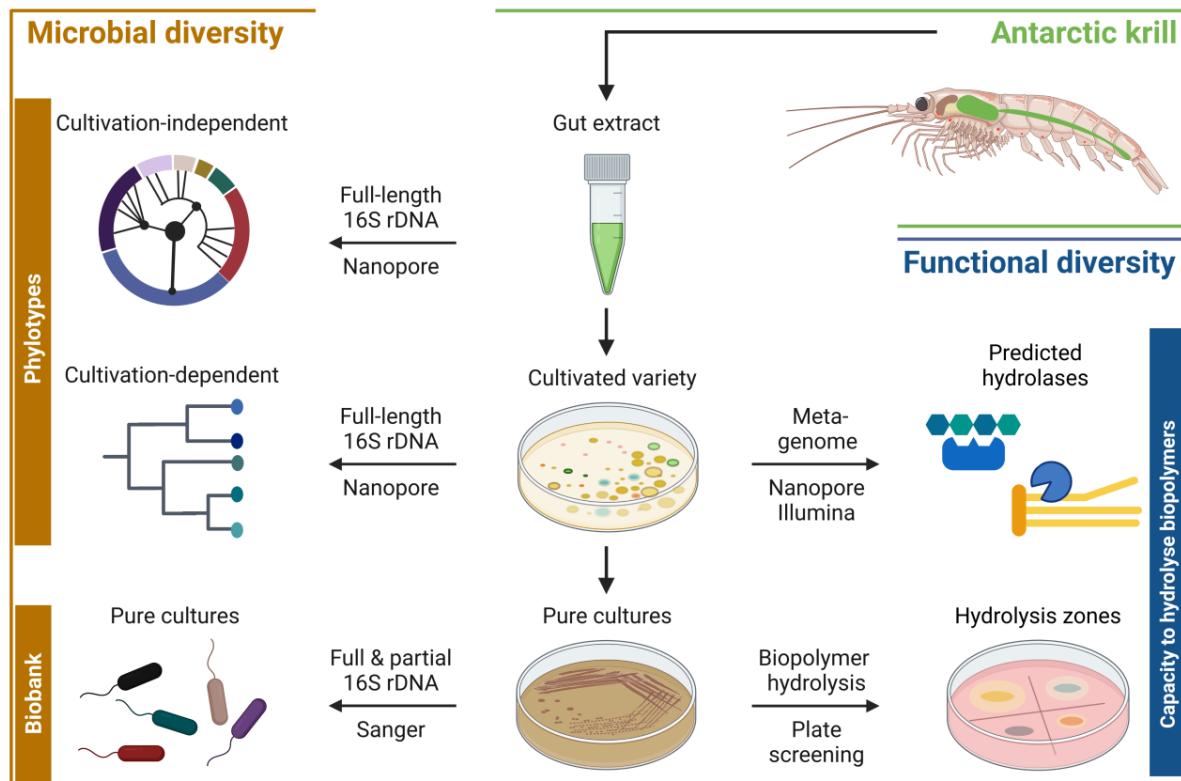


Abbildung 1. Versuchsplan. Charakterisierung der funktionellen Diversität des Krill-Darm-Mikrobioms durch hybride metagenomische Assemblierung und 16S-Vollängensequenzierung

WP 1.1 Taxonomische Charakterisierung von Kultivaren und Extrakten durch DNA-Amplikon-Sequenzierung

Die Amplikon-Hochdurchsatzsequenzierung des 16S ribosomalen RNA (rRNA)-Gens ist derzeit die am häufigsten verwendete Technik zur Untersuchung komplexer mikrobieller Gemeinschaften. In ersten Experimenten wurde die Eingangs-DNA, die entweder aus dem Magen („stomach“) oder aus dem gesamten Verdauungstrakt („entire digestive tract“) extrahiert wurde, einer gezielten PCR zur Amplifizierung der V4-Region der für 16S rRNA kodierenden DNA durchgeführt (Abbildung 1a). Das PCR-Produkt wird dann mit AMPure XP-Beads aufgereinigt. Um eine mit dem Illumina-Sequenzer kompatible Bibliothek zu erzeugen, werden Dual-Index-Primer mit einer PCR mit begrenztem Zyklus hinzugefügt (Abbildung 1b), gefolgt von einer weiteren Reinigung mit AMPure XP-Beads, wie im Protokoll zur Vorbereitung der 16S-Metagenom-Sequenzierungsbibliothek (Illumina) beschrieben.

Die Analyse zeigte, dass nach der Amplifikation die Menge und Reinheit der Probe für eine Hochdurchsatz-Sequenzierung von 16S ribosomalen RNA (rRNA)-Genen aus Mikrobiom-Proben ausreicht.

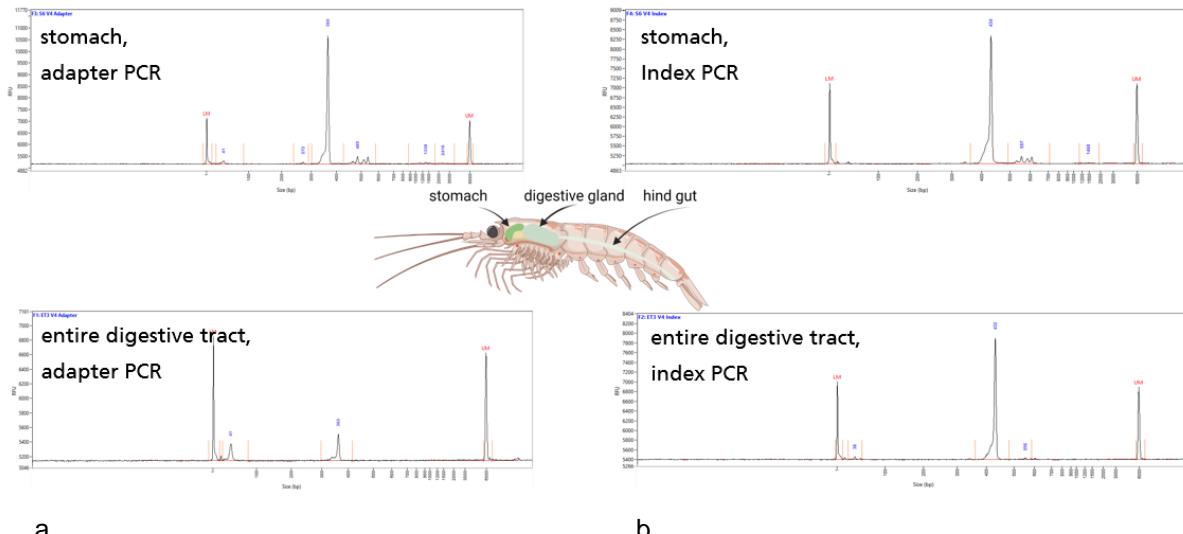


Abbildung 2. Vorbereitung einer 16S rRNA V4 Amplikon-Bibliothek aus dem Magen und dem gesamten Verdauungstrakt des antarktischen Krills. Die Profile wurden mit einem Fragment Analyser erzeugt. a. Gezielte PCR-Amplifikation der V4-Region b. PCR mit begrenztem Zyklus zur Erzeugung einer Illumina-kompatiblen Bibliothek.

Die Sequenzierung wurde auf einem NextSeq2000 Illumina-Sequenzergerät über P2 Run im Paired-End-Modus mit 2 mal 100 Zyklen für jede Probe durchgeführt, was zu einer durchschnittlichen Sequenztiefe von etwa 0,7 Millionen Reads pro Probe führte. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die Sequenzierungsergebnisse:

	read counts (R1)	GC content	Predicted rRNA Features	Identified rRNA Features	Taxonomic Hits Distribution				
					Bacteria	Eukaryota	Archaea	%identified	α-diversity
entire digestive tract	753608	55 ± 5 %	5802	3264	551205	10411	370	74.57%	33
stomach	616746	54 ± 5 %	3313	1521	411409	2630	0	67.13%	37

Tabelle 1. rRNA-Amplikon-Sequenzierung und Annotationsstatistik (MG-RAST). Sequenziert wurden Proben aus dem Magen („stomach“) und dem gesamten Verdauungstrakt („entire digestive tract“).

Für die 16S-Analyse haben wir den Metagenom-Analyse-Server MG-RAST verwendet. Die obige Tabelle (Tabelle 1) enthält die Anzahl der vorhergesagten und identifizierten rRNA-Features sowie die Verteilung der taxonomischen Hits gemäß MG-RAST. Wie man sieht, können etwa 74,6 % und 67,1 % aller Amplikons aus dem gesamten Verdauungstrakt bzw. dem Magen einer bestimmten taxonomischen Domäne zugeordnet werden. Die Shanon α-Diversität des Datensatzes ist nicht besonders hoch, solange sie von der Klassifizierung auf Speziesebene ausgeht, und mit den aktuellen Teilamplikondaten können wir nur eine begrenzte Anzahl von Reads korrekt auf Speziesebene klassifizieren. Dennoch ist der Prozentsatz der zugeordneten Reads auf der Ebene der taxonomischen Klasse bereits so hoch wie 52,88 % für den gesamten Verdauungstrakt und 45,68 % für den Magen. Auf

dieser Ebene können die Amplikons 32 verschiedenen taxonomischen Klassen zugeordnet werden. Die Vergleichsanalyse ist in Abbildung 2 unten dargestellt:

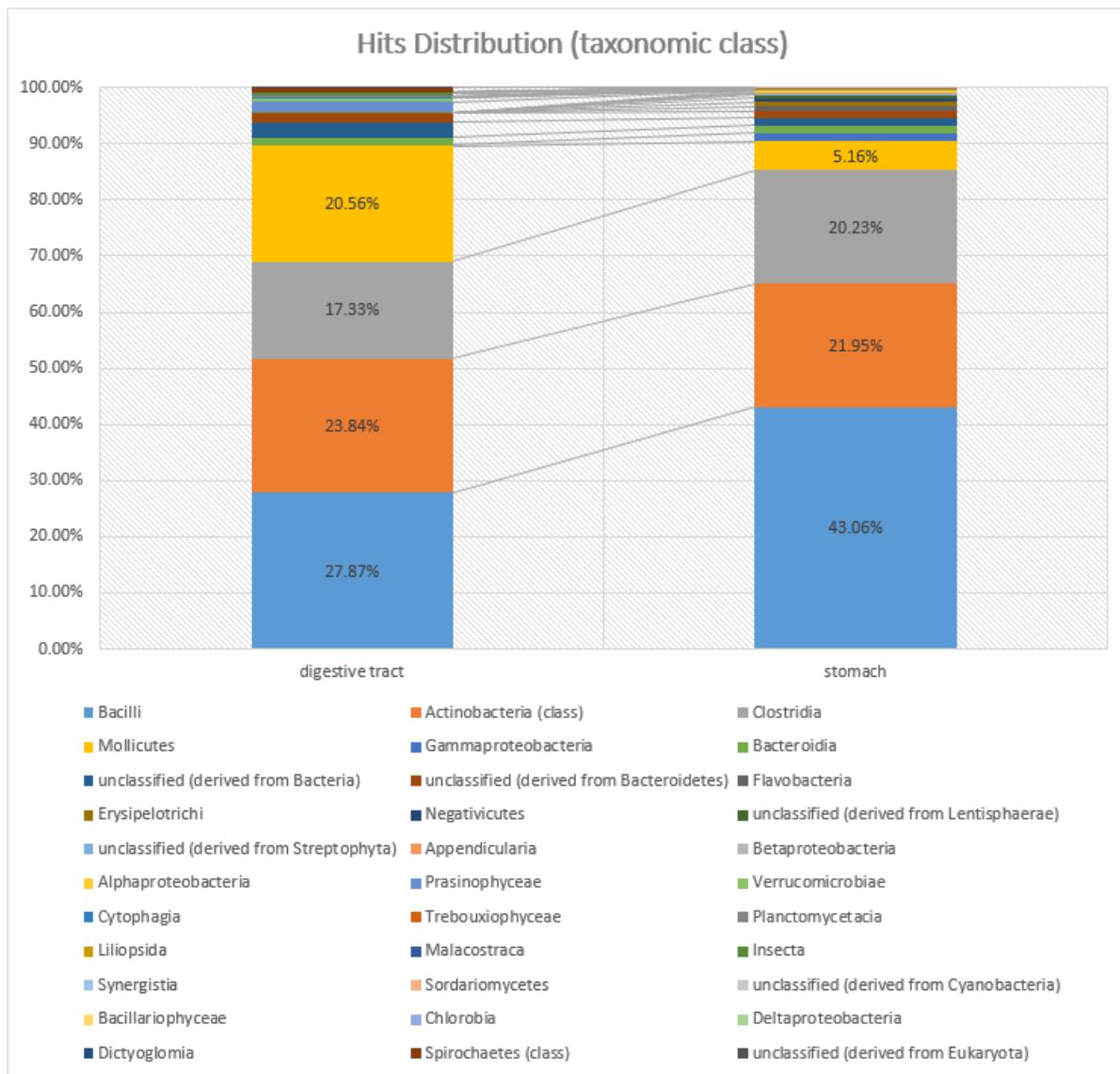


Abbildung 3. Verteilung der taxonomischen Hits. Die klassifizierten Read-Zahlen sind auf die Größe einer Sequenzierbibliothek normalisiert. Nur die 4 häufigsten Klassen werden durch die Zahlen dargestellt; alle taxonomischen Klassen ergeben zusammen 100%.

Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, machen die vier häufigsten Klassen 90 Prozent der Artenvielfalt in der Probe aus. Interessanterweise kann man die Verschiebung in der Artenzusammensetzung erkennen, wenn man nur das Magenmikrobiom oder den gesamten Verdauungstrakt des Krills betrachtet.

Der gewählten Methode zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität erweist sich als sehr erfolgreich auf verschiedenen taxonomischen Ebenen, einschließlich der Familien- oder

sogar Gattungsebene, wo MG-RAST etwa 30 % der Reads erfolgreich annotieren kann. Dennoch können weitere Verbesserungen erzielt werden, indem die V4-Amplikon-Sequenzierung in voller Länge (z. B. mit Illumina 2x300-Sequenzierbibliotheken oder Volllänge 16S Nanoporesequenzierung) eingeführt wird, was eine zuverlässigere Artenidentifizierung ermöglicht.

Krill-Darm Mikrobioms Diversität: vergleich von Direkt Extrakt und Kultivierbares Microbiomes

Wie bereits beschrieben, haben wir von unserem Partner 2 alle Proben für die Sequenzierung erhalten, einschließlich kultivierbarer und direkter Darmextrakte. Um die mikrobielle Vielfalt des Krill-Darms vollständig aufzudecken, haben wir drei verschiedene Sequenzierungsansätze kombiniert:

- (i) Vollständige Sequenzen der 16S-rDNA wurden mittels ONT Nanopore-Technologie aus Extraktten des Krill-Darms sequenziert, um das nicht-kultivierbare Mikrobiom so umfassend wie möglich abzubilden.
- (ii) Extrakte des Krill-Darms wurden auf Vollmedium-Agarplatten ausgestrichen, und der sich bildende Bakterienrasen wurde vollständig abgenommen, um die kultivierbare Vielfalt mittels Nanopore-Sequenzierung zu erfassen.
- (iii) Die vollständigen Sequenzen der 16S-rDNA-Gene wurden aus den etwa 200 Reinkulturen aus dem Krill-Darm (siehe vorheriger Zwischenbericht) mit der Sanger-Methode bestimmt (bei Partner 2).

Die Ergebnisse des Vergleichs sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 4): Der zirkuläre phylogenetische Baum in der Mitte wurde mit iTools erstellt, basierend auf der 16S rRNA Nanopore Sequenzierung in voller Länge. Alle Reads nach Basecalling, Trimming und qualitätsbasierter Filtrierung wurden mit der Epi2Me-Pipeline von ONT klassifiziert und mithilfe von BLAST (e-Wert < 0,01, Mindestabdeckung 60 %, Mindestidentität 77 %) der nächstliegenden Kategorie zugeordnet. Der phylogenetische Baum basiert auf der Klassifizierung auf Familienebene, da die Gesamtzahl der zugeordneten Gattungen für eine Visualisierung zu hoch ist.

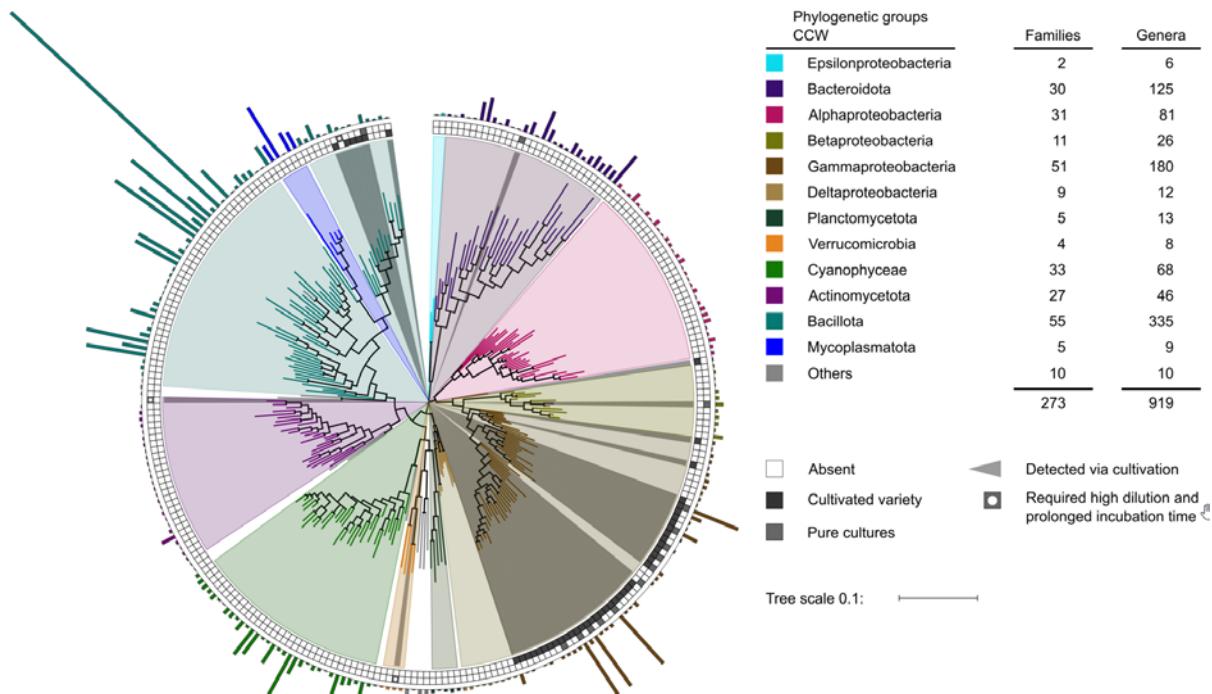


Abbildung 4. Mikrobielle Diversität des Mikrobioms des Krill-Darms.

Der innere Kreis der Heatmap um den phylogenetischen Baum stellt das kultivierte Mikrobiom dar, das ebenfalls mit der Nanopore 16S-Technologie in voller Länge sequenziert wurde. Der äußere Ring der Heatmap stellt die Reinkultur dar, die von Partner 2 mit der 16S-Sanger-Sequenzierung in voller Länge sequenziert wurde. Das Balkendiagramm am äußeren Radius des Diagramms stellt die kumulative Anzahl von Reads dar, die bestimmten Gattungen zugeordnet wurden.

Die häufigste phylogenetische Gruppe, die sowohl im kultivierbaren Mikrobiom als auch in den Reinkulturen vorkommt, sind die Gammaproteobakterien. Wir konnten im Krill-Darm-Mikrobiom insgesamt 919 verschiedene Gattungen aus 273 verschiedenen Familien und 13 Klassen identifizieren.

WP 2.1 Isolierung und Hochdurchsatz-Sequenzierung von metagenomischer DNA aus Krill-Därmen

Von der Arbeitsgruppe B. Meyer (SP 1) konnten im vergangenen Berichtszeitraum gefrorenes Gewebe und isolierte Nukleinsäuren (DNA/RNA) von Krill aus vergangenen Ausfahrten erhalten werden. Dabei handelte es sich sowohl um Einzelproben, als auch gepoolte Proben vom jeweiligen Organ von 5 Tieren aus dem Magen („Stomach“), Mitteldarmdrüse („gland“), Darm („hind gut“) sowie des Gesamtverdauungstrakts („entire digestive tract“). Von allen Proben wurden sowohl Ausbeuten als auch Integritäten mittels Qubit und Fragment-Analyzer ermittelt. Eine Übersicht zeigt Abbildung 5:

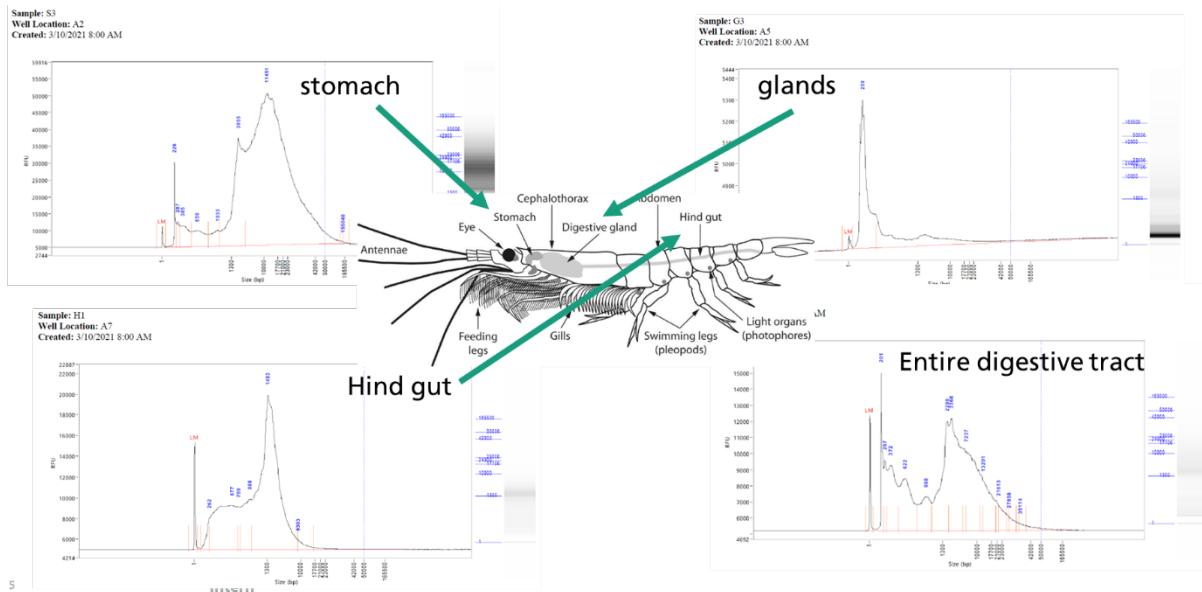


Abbildung 5. Qualitativer und quantitativer Nachweis isolierter metagenomischer DNA verschiedener Krill-Organe. Profile nach Auf trennung mittels Fragment-Analyz.

Die Analysen ergaben dabei, dass sowohl die Ausbeuten als auch die Integritäten/Größenverteilungen zwischen unterschiedlichen Proben sich stark unterscheiden können. Das ist insofern von Bedeutung, da für eine Sequenzierung mit anschließender Assemblierung möglichst große Fragmente in ausreichender Menge vorhanden sein sollten. Sowohl für Einzel- als auch Poolproben gab es ausreichende Konzentrationen, wobei sich die Längenprofile teilweise deutlich unterschieden hatten. Bevorzugt für eine Sequenzierung und Assemblierung von Metagenomaten ist eine Fragmentlänge von < 10 Kilobasen. In Zukunft sollen deshalb weitere Proben (auch aus zukünftigen Ausfahrten) analysiert werden.

Sowohl für den Darm („hind gut“) als auch den Magen („stomach“) konnten inzwischen ebenfalls Long-Read-Sequenzierungen durchgeführt werden. Dabei zeigte sich allerdings, dass die mittleren Fragmentlängen deutlich unter 10 Kilobasen liegen (Tabelle 2). Weitere Optimierung hinsichtlich Probenhandling und –verarbeitungen waren deshalb notwendig, um längere Sequenzabschnitte für eine Assemblierung zu generieren.



Hind gut	Stomach		
Number of reads	24.84 M	Number of reads	5 M
Total bases	21.3 Gb	Total bases	8.96 Gb
After trimming	12.7 Gb	After trimming	6.2 Gb
Median read length	498 b	Median read length	484 b
>Q10	48.5%	>Q10	61%
N50	1037	N50	3896

Tabelle 2. Long Read-Sequenzierung mittels MinION Nanoporesequencer. Sequenziert wurden Proben aus dem Darm („hind gut“) und dem Magen („stomach“).

Trotz unzureichender Sequenzlängen wurde ein erster Versuch einer Assemblierung gestartet, um einen ersten Eindruck von den Komplexitäten der Proben für zukünftige Optimierungen zu bekommen. Wie von den relativ kurzen Sequenzfragmenten zu erwarten, waren mit einer durchschnittlichen Größe von knapp 10 kb die assemblierten Contigs vergleichsweise klein. Der größte Contig betrug knapp 90 kb (Abbildung 6). Eine weitere Besonderheit bei der Assemblierung ist die Tatsache, dass das Host-Genom (also Krill / *Euphausia superba*) zum Abgleich noch nicht publiziert ist und damit nicht zur Verfügung steht. Dies erschwert die Zuordnung der Contigs zusätzlich.

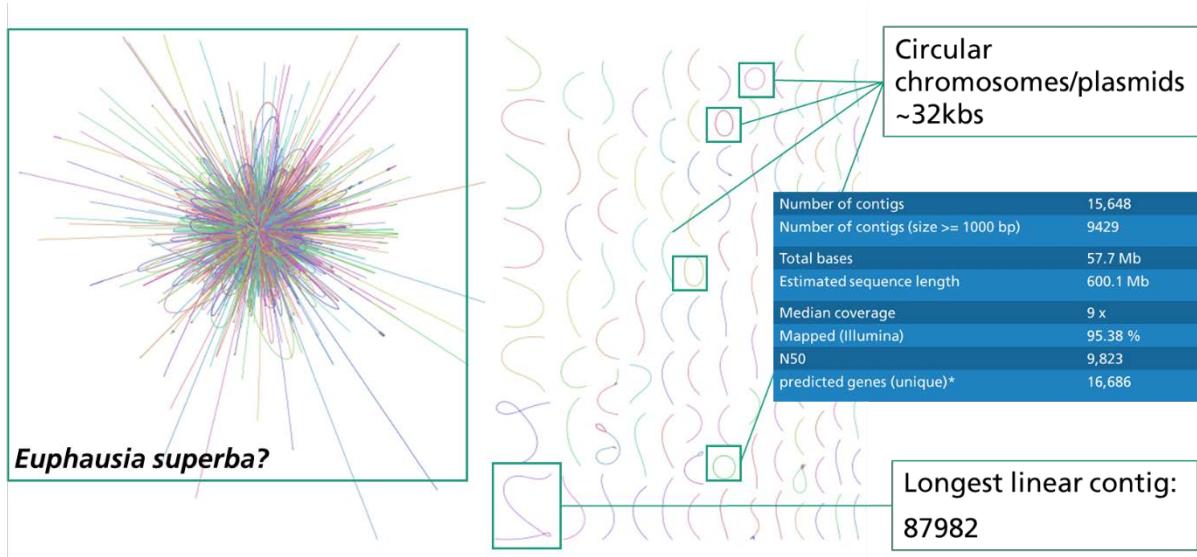


Abbildung 6. Darstellung assemblierter Contigs. Die de-novo Assemblierung wurde mittels meta-fly durchgeführt.

WP 2.2 Hybride metagenomische Assemblierung, Annotation und taxonomische Klassifizierung des kultivierbaren Mikrobioms des Krilldarms

Vorbereitung der Proben

Wir erhielten insgesamt 72 Krillproben, entweder homogenisierte Därme in MB-Medien (direkte Proben) oder kultivierte Bakterien bei Raumtemperatur oder bei 4°C (Tabelle 3).

Wir führten eine DNA-Isolierung aus 20 direkten, 20 RT- und 20 4°C-Proben durch, wobei wir die Proben mit den höchsten CFUs pro Bedingung auswählten. Nach der Qualitätskontrolle wurden 12 Proben für ein anschließendes Sequenzierungsexperiment verwendet, bei dem sowohl Long- als auch Short-Read-Sequenzierungen durchgeführt wurden. Für jede Bedingung und jedes Sequenzierungsexperiment wurde ein gleicher Pool von Proben verwendet (Krill 7, 11, 12, 13, 17, 21 – Set I; Krill 14, 18, 22, 23, 26, 29 – Set II).

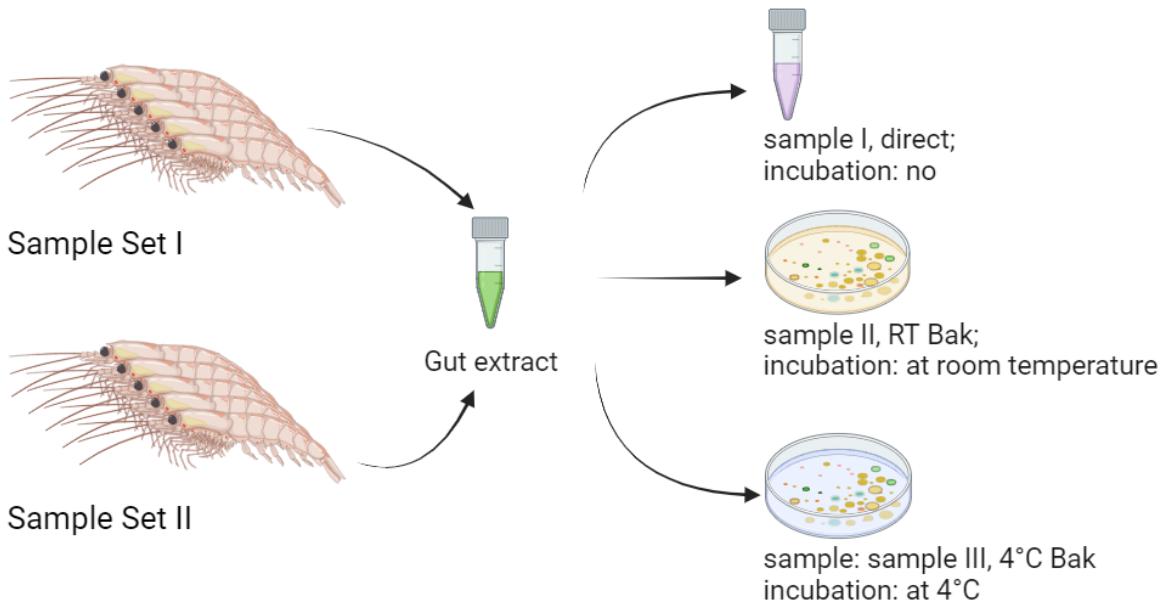


Abbildung 7. Sequenzierproben vorbereitung

Sample ID	Set ID	Direkt (homogenized Krill gut in MB)	Bakterien RT (room temperature Bacteria)	Bakterien 4°C (4 °C cultured Bacteria)
Krill 7	I	Krill 7, Direkt	Krill 7, Bakterien RT	Krill 7, Bakterien 4°C
Krill 11	I	Krill 11, Direkt	Krill 11, Bakterien RT	Krill 11, Bakterien 4°C
Krill 12	I	Krill 12, Direkt	Krill 12, Bakterien RT	Krill 12, Bakterien 4°C
Krill 13	I	Krill 13, Direkt	Krill 13, Bakterien RT	Krill 13, Bakterien 4°C
Krill 17	I	Krill 17, Direkt	Krill 17, Bakterien RT	Krill 17, Bakterien 4°C
Krill 21	I	Krill 21, Direkt	Krill 21, Bakterien RT	Krill 21, Bakterien 4°C
Krill 14	II	Krill 14, Direkt	Krill 14, Bakterien RT	Krill 14, Bakterien 4°C
Krill 18	II	Krill 18, Direkt	Krill 18, Bakterien RT	Krill 18, Bakterien 4°C
Krill 22	II	Krill 22, Direkt	Krill 22, Bakterien RT	Krill 22, Bakterien 4°C
Krill 23	II	Krill 23, Direkt	Krill 23, Bakterien RT	Krill 23, Bakterien 4°C
Krill 26	II	Krill 26, Direkt	Krill 26, Bakterien RT	Krill 26, Bakterien 4°C
Krill 29	II	Krill 29, Direkt	Krill 29, Bakterien RT	Krill 29, Bakterien 4°C

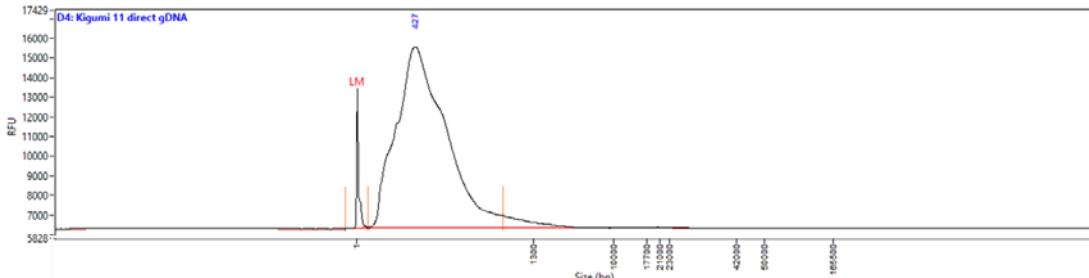
Tabelle 3. Krill-Proben, die für die WGS-Sequenzierung von Short-Reads (Illumina) und Long-Reads (ONT) verwendet wurden

Leider war die Metagenomik-Analyse der direkten Probe unter Verwendung der WGS-Kurz- und Long-Reads-Sequenzierung aufgrund des starken Abbaus der genomischen DNA im direkten Darmextrakt nicht durchführbar.

Abbildung 8 unten zeigt ein typisches Fragment Analyser Profil der Sequenzierungsbibliotheken, die aus genommischer DNA hergestellt wurden, die entweder aus der direkten Probe (Feld a) oder aus den kultivierten Proben (Feld b) extrahiert wurde.

Die WGS-Bibliothek aus der direkten Probe weist einen hohen Fragmentierungsgrad auf, wobei die Mehrzahl der DNA-Fragmente nur etwa 400 Basen lang ist, was die Sequenzierung und Assemblierung zu einer sehr anspruchsvollen Aufgabe macht.

a.



b.

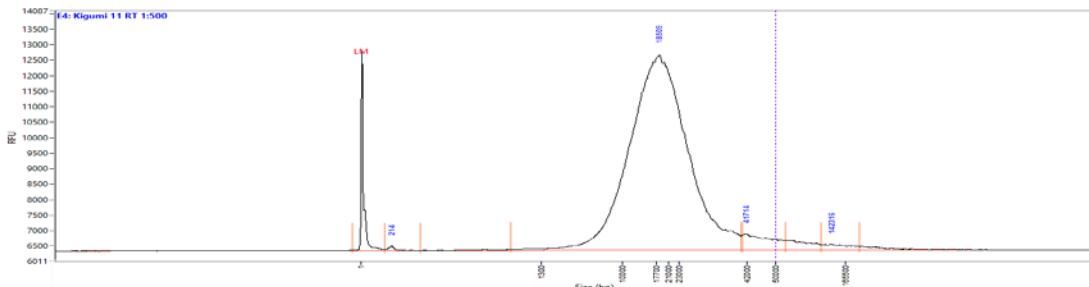


Abbildung 8. Visualisierung der Größenverteilung der DNA-Fragmente mit dem Fragment Analyser nach der Extraktion aus der direkten Probe (a) und aus den Proben, die entweder bei Raumtemperatur oder bei 4°C berechnet wurden. Als Beispiel wird auf Tafel (b) das Profil für die RT-Probe gezeigt.

Sequenzierung

Jede Krillprobe in dieser Studie war ein Pool aus den Därmen von drei verschiedenen antarktischen Krill-Exemplaren, die während einer Schiffsreise in der antarktischen Bransfield-Straße gewonnen wurden. Der Darminhalt jedes dieser Tiere wurde kombiniert und dann mit einem sterilen Mörser und Stößel in Meeresbrühe homogenisiert. Das zusammengefasste Homogenat wurde dann gleichmäßig in drei Teilproben aufgeteilt, die jeweils einem anderen Versuchszweck dienten:

- Direkte Probe (I): Ein Drittel des gepoolten, homogenisierten Krilldarm-Inhalts wurde sofort in ein steriles Kryo-Gefäß überführt und eingefroren.
- Probe bei Raumtemperatur (II – Bakterien RT): Ein weiteres Drittel wurde auf Marine Broth Agarplatten (Sigma-Aldrich) ausgestreut und 5 Tage lang bei Raumtemperatur bebrütet. Alle gewachsenen Bakterienkolonien wurden mit sterilen Schlingen geerntet und in ein Kryo-Gefäß (Thermo Fisher Scientific) überführt.
- Niedrigtemperatur-Probe (III – Bakterien 4°C): Das letzte Drittel wurde ebenfalls auf Marine Broth Agarplatten ausgestreut und 10 Tage lang bei 4°C bebrütet. Die Bakterienkolonien wurden geerntet und auf ähnliche Weise wie bei II in ein Kryo-Fläschchen überführt.

Es wurden zwei verschiedene Probenpools vorbereitet und mit unterschiedlichen Techniken und Plattformen sequenziert.

- Probensatz I (Krillproben 7, 11, 12, 13, 17, 21): Die DNA wurde mit dem ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research) gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert und zusätzlich mit den AMPure XP Beads im Verhältnis 1:1 (Beckman Coulter) gereinigt.

- Probensatz II (Krillproben 14, 18, 22, 23, 26, 29): Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen) gemäß den Richtlinien des Herstellers und wurde zusätzlich mit den AMPure XP Beads im Verhältnis 1:1 aufgereinigt (Beckman Coulter).

Tabelle 4 zeigt einen Überblick über die Größe der Sequenzierbibliotheken und Sequenzierergebnisse für alle sequenzierten Proben:

Sequencing sample	Illumina WGS 2x50 bp	Illumina WGS 2x300pb	ONT WGS	ONT 16S rRNA
Probensatz I, 4°C Probenpool	5.8*10 ⁷		12.51*10 ⁶ , N50 4.81 kb	2.41*10 ⁶ N50 1.58 kb
Probensatz I, RT Probenpool	5.1*10 ⁷		6.02*10 ⁶ , N50 6.02 kb	2.64*10 ⁶ N50 1.58 kb
Probensatz I, direct				3.04*10 ⁶ N50 1.56 kb
Probensatz II, 4°C+RT Probenpool 1		1.3*10 ⁸ (6 Replikaten)	4.38*10 ⁶ N50 3.22	
Probensatz II, 4°C+RT Probenpool 2		1.65*10 ⁸ (6 Replikaten)	14.49*10 ⁶ N50 2.87	

Tabelle 4. Sequenzierbibliotheken und Sequenzierergebnisse

Hybrid *de novo*-Metagenom-Assembly

Um die kultiverungsabhängige funktionelle Vielfalt des Krill-Darm-Mikrobioms zu entschlüsseln und die größtmögliche Anzahl potenzieller Enzyme zu identifizieren, beschlossen wir, die Metagenom-Zusammenstellung für jeden Versuchsaufbau separat durchzuführen und vier Unter-Zusammenstellungen für RT-, 4°C- und zwei abgefragte Proben zu erstellen, gefolgt von der funktionellen Annotation jedes identifizierten ORF und der taxonomischen Identifizierung auf der Ebene der Contigs. Die resultierenden Teilassemblies wurden im letzten Schritt der Analysepipeline zusammengeführt, um einen umfassenden Überblick über die funktionelle Vielfalt zu erhalten (Abbildung 9).

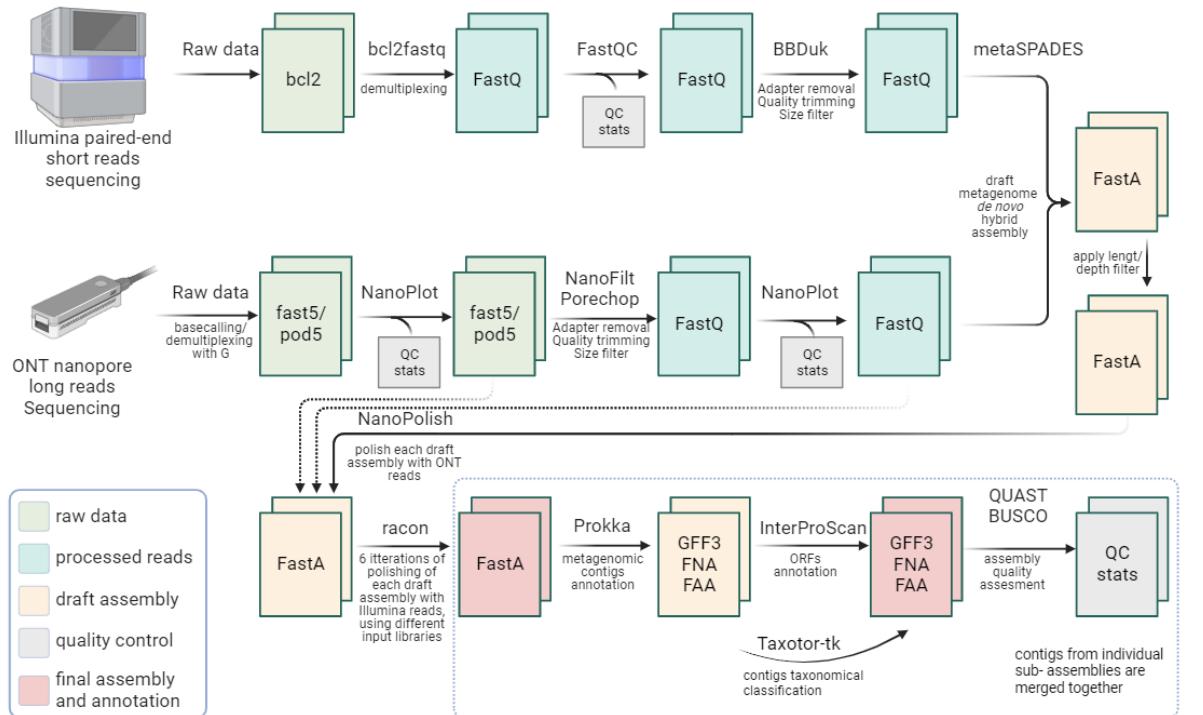


Abbildung 9. Hybrid de novo-Metagenom-Assembly pipeline

Jede einzelne Subassembly wurde mit dem Quast getestet, um die Qualität der Assemblierung zu kontrollieren. Es zeigt sich, dass die aus dem Sample Set II generierten Subassemblies aufgrund der höheren Sequenziertiefe der Input-Bibliotheken im Allgemeinen bessere Statistiken aufweisen (Tabelle 3).

Assembly	Draft hybrid assembly Contigs Nr. (L \geq 1kb)	final hybrid assembly Contigs Nr. (L \geq 10kb, coverage \geq 10)
Sample set I, 4°C pool	10282	nr. contigs: 1297 total length: 42.46*10 ⁶ N50: 10.64 kb % mapped: 80,59%
Sample set I, RT pool	7472	nr. contigs: 961 total length: 30.07*10 ⁶ N50: 14.78 kb % mapped: 82,86%
Sample set II, 4°C+RT pool 1	2832	nr. contigs: 1280 total length: 77.65*10 ⁶ N50: 101.70 kb % mapped: 83,80%
Sample set II, 4°C+RT pool 2	2831	nr. contigs: 1580 total length: 91.94*10 ⁶ N50: 97.74 kb % mapped: 91,53%

Tabelle 5. Metagenome Assemblierung Statistiken

Wir haben jeden Contig mit dem Tool Taxotor-tk auf seine potenzielle taxonomische Einordnung geprüft und die vorhergesagten ORFs mit Prokka annotiert. 3230 von 4035 Contigs wurden einem Bakterien-Superkingdom zugeordnet, während bei den restlichen 805 Contigs die taxonomische Identifizierung fehlschlug, was entweder auf die Tatsache einer inkonsistenten Assemblierung oder auf potenziell neue Arten hinweist, die in der aktuellen

Version der NCBI-Datenbank, die zur Identifizierung verwendet wurde, noch nicht vorhanden sind. Die zusätzlichen Untersuchungen sind erforderlich, um das Potenzial der Daten voll auszuschöpfen.

Von 3230 Contigs wurden die meisten auf der Ebene der taxonomischen Ordnung (3108) und der taxonomischen Familie (3007) klassifiziert. 59 % aller Contigs wurden der Ordnung Alteromonadales zugeordnet, was mit den bekannten Daten über das marine Mikrobiom übereinstimmt (Abbildung 10).

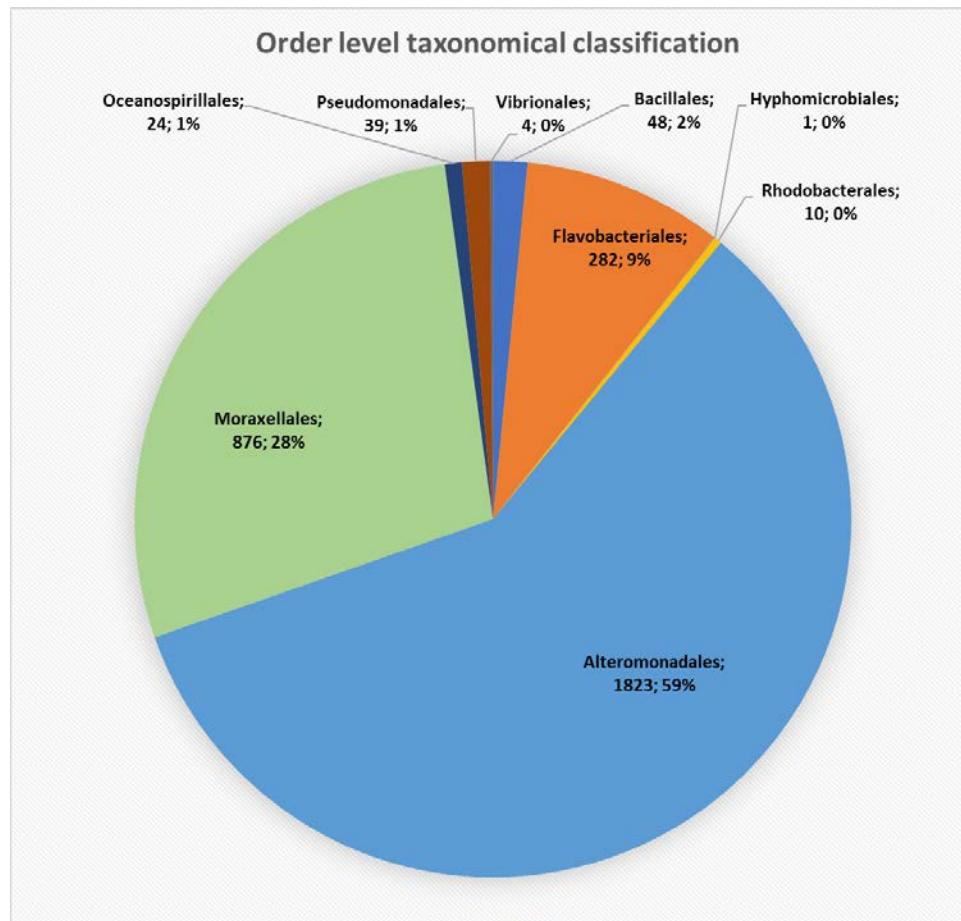


Abbildung 10. Distribution of contigs at the taxonomical order level

Von den insgesamt 4035 Contigs haben wir 206800 ORFs identifiziert (102864 sind annotierte Proteine, und 103990 sind hypothetische Proteine). Für 60827 finden wir eine EC-Nummer, und 70010 haben eine COG-Kategorie-Kennung. Mit Hilfe von InterProScan haben wir die identifizierten ORFs zusätzlich mit den IPR-Nummern, GO-Nummern und anderen Links zu Datenbanken ergänzt.

Unter den 102,9k annotierten Proteinen befinden sich 16,9k nicht redundante Proteine. Sie konnten etwa 31k EC-Kategorien und 36k COG-IDs zugeordnet werden. So gibt es beispielsweise 316 nicht redundante EC-Kategorien, die verschiedenen hydrolytischen Enzymen entsprechen.

EC und COG decken die meisten der annotierten Proteine ab, während für einige der Einträge auch andere Annotationen wie GO verfügbar sind.

Hydrolytisches Potenzial des Krill-Darm-Mikrobioms.

In dem vollständigen Metagenom-Datensatz können wir 374 nicht redundante EC-Kategorien identifizieren, die zur Klasse der Hydrolasen (EC 3) gehören.

Die am häufigsten vorkommenden Hydrolasen sind 3 Klassen von Hydrolasen: 3.1 (Esterasen), 3.5 (Amidasen) und 3.4 (Proteasen/Peptidasen). (Abbildung 6)

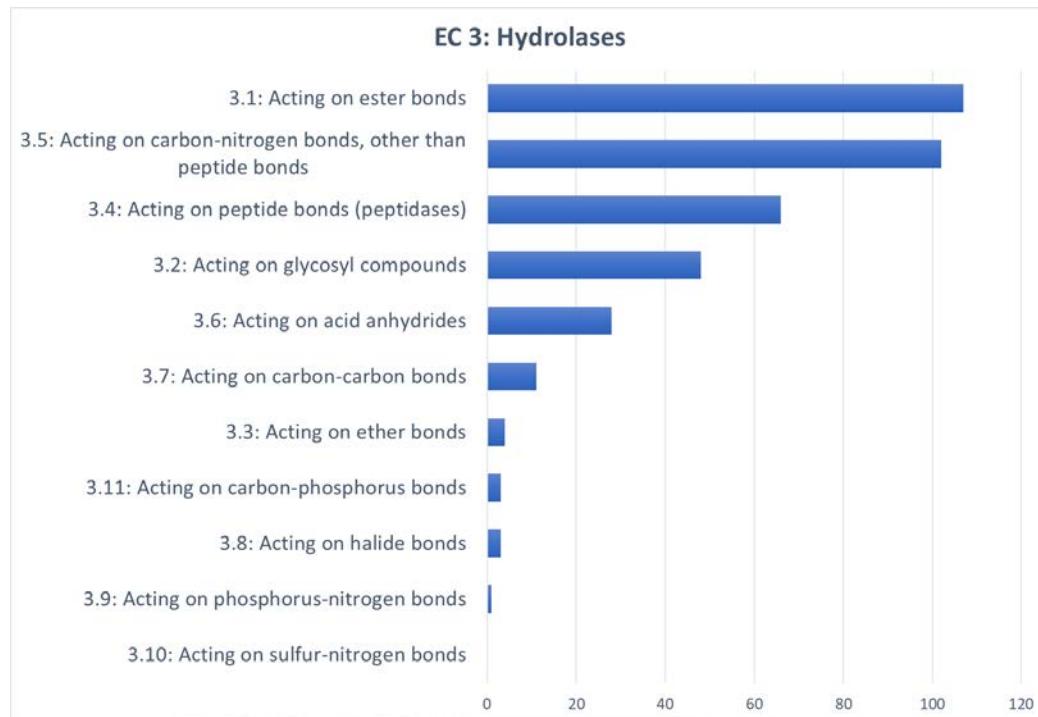


Abbildung 11. EC category 3 (hydrolases) subclasses.

Hohe Esterase-Aktivität (3.1): 107 in dieser Kategorie enthaltenen Enzymen sind für den Abbau von Ester-Bindungen verantwortlich. Dies könnte auf eine starke Fähigkeit zum Abbau komplexer Lipide, Fette oder sogar bestimmter Arten organischer Stoffe wie Pflanzenmaterial oder Phytoplankton hindeuten.

Hohe Amidase-Aktivität (3.5): Mit 102 Instanzen können diese Enzyme andere Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen als Peptidbindungen spalten. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Mikrobiom in der Lage ist, verschiedene Arten von stickstoffhaltigen organischen Verbindungen abzubauen.

Hohe Peptidase-Aktivität (3.4): Die 66 Instanzen deuten auf die Fähigkeit zur Proteinverdauung hin. Dies könnte für den Abbau von aufgenommenen Beuteproteinen oder die Verwertung endogener Proteine wichtig sein.

Die obigen Ergebnisse stehen im Einklang mit dem derzeitigen Wissen über marine Crustaceen, die häufig einen hohen Gehalt an Enzymen aufweisen, die Proteine und Lipide abbauen können, was wahrscheinlich die Nährstoffzusammensetzung ihrer Nahrung widerspiegelt.

Interessanterweise zeigen die Daten auch das Vorhandensein einer Aktivität zum Abbau von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (3.7): 11 Fälle könnten auf die Fähigkeit hinweisen, komplexere organische Moleküle zu bearbeiten, zu denen auch bestimmte Arten von Biopolymeren gehören könnten.

WP 2.3 Genomsequenzierung, Assemblierung und *In-silico*-Annotation von ausgewählten Isolaten

Zwei Stämme, nämlich DOL_62_A und DOH_87_A, wurden von unseren Partnern für ihr vielversprechendes hydrolytisches Potenzial identifiziert. Beide dieser Isolate wurden durch zwei unterschiedliche Plattformen sequenziert: die Gesamtgenom-Sequenzierung mit Long-Read von Oxford Nanopore Technologies und die Ganzgenom-Sequenzierung mit Short-Read von Illumina.

Für die Assemblierung der Genome dieser Stämme wurden gut validierte Hybrid-Assembly-Pipeline eingesetzt. Diese Pipeline umfasst die rohdatenbasierte Qualitätsbeschneidung, die Filterung und die Assemblierung sowohl mit auf der Basis von Long-Reads (ONT) und Short-Reads (Illumina) in Spades. Die funktionale Annotation wurde dann nach der Assemblierung mit Prokka und InterProScan durchgeführt.

Zusätzlich haben wir den TYGS-Dienst (Type Strain Genome Server) genutzt, um kultivierte Isolate zu identifizieren. Laut TYGS ist es zwar nicht möglich, die Herkunftsart des Isolats DOL_62_A zu identifizieren, aber die nächstgelegene Art im phylogenetischen Baum ist *Pseudoalteromonas undina*. DOH_87_A Isolat wird mit hoher Wahrscheinlichkeit als *Pseudoalteromonas arctica* identifiziert.

Nachfolgend finden Sie einige Statistiken zur Genomassemblierung (Tabelle 6):

Strain	genome size	# contigs	N50	# genomic features	TYGS identification
DOL_62_A	4063163	62	104037	3770	potential new species
DOH_87_A	4583710	66	138995	4124	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>

Tabelle 6 Genomassemblierung von Isolaten

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalmittel IGB:

Zur Durchführung des für diesen Vorschlag beschriebenen Forschungsprojekts werden ein Biologe, ein Techniker sowie ein Bioinformatiker benötigt. Der Biologe wird an der Etablierung von Extraktionsverfahren zur Isolierung und Aufbereitung von DNA und RNA beteiligt sein. Darüber hinaus koordiniert der Wissenschaftler das Zusammenspiel von Wetlab-Verfahren und Bioinformatik und betreut den Techniker. Aus der Zuordnung des Personals zu den einzelnen Arbeitspaketen ergibt sich ein Personalbedarf an Wissenschaftler:in (EG13), Datenanalyst (EG13) sowie Technische(r) Assistent:in (EG7). Zusätzlich wurden Mittel für wissenschaftliche Hilfskräfte benötigt.

Sachmittel IGB:

Für die Etablierung von Protokollen und die Analyse, werden Verbrauchsmaterialien benötigt, darunter Material für die Nukleinsäureisolierung und Qualitätskontrolle, Bibliotheksvorbereitung und Sequenzierungskits sowie allgemeine Laborartikel.

3. Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Das vorgestellte Projekt baut auf dem umfangreichen Wissen und Erfahrung aller teilnehmenden Partner auf. Nur durch die Kombination der verschiedenen Kompetenzen aller Partner – mikrobiologische Erfahrung, Rekrutierung von Krill-Proben mittels Hochsee-Ausfahrten, molekularbiologische Erfahrung mit Probenverarbeitung und Sequenzierung sowie fundierte bioinformatische Kenntnisse – konnte ein solches Projekt angegangen und umgesetzt werden. Jeder Projektpartner hat dazu essentielle Bausteine eingebracht. Eine Etablierung von Metagenomdaten- und Biobanken wurde erst durch ein konzertiertes Vorgehen von Mikro- und Molekularbiologen, sowie Bioinformatikern und Experten für Meeresbiologie wurde ein entsprechendes Projekt realisierbar. Es erforderte einen enormen Aufwand für die Entnahme von Krill-Proben, die Anlage von Bakterienkulturen und die Sammlung von Isolaten sowie die Beherrschung der Molekularbiologie, Sequenzierungstechnik und Bioinformatik.

Eine angemessene Finanzierung, die dieses Projekt überhaupt erst möglich machte, war daher zwingend notwendig.

4. Der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft – im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Der voraussichtliche Nutzen der durchgeföhrten Forschung ist vielfältig und birgt erhebliches Potential für weitere wissenschaftliche, industrielle und umweltbezogene Anwendungen. Die neu erstellte umfangreiche Datenbank hydrolytischer Enzyme ist eine wichtige Ressource für die Biotechnologie. Diese Enzyme könnten in der Produktion von Biokraftstoffen, Plastikabbau, in der Lebensmittelverarbeitung und im Umweltschutz eingesetzt werden. Insbesondere interessant sind die beiden identifizierten Stämme mit hohem hydrolytischem Potenzial. Sie sind Kandidaten für weiterführende Forschungen zur enzymatischen Biokatalyse.

Konkrete Planungen für die nähere Zukunft beinhalten die detaillierte Charakterisierung der hydrolytischen Enzyme, einschließlich ihrer Anwendung in verschiedenen industriellen Prozessen.

Darüber hinaus planen wir, unsere Erkenntnisse durch wissenschaftliche Publikationen und Konferenzbeiträge weiter zu verbreiten. Die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen und Arbeitsgruppen soll intensiviert werden, insbesondere im Hinblick auf die funktionelle Annotation und mögliche Anwendungen der identifizierten Enzyme und Bakterienstämme. Langfristig könnten diese Arbeiten

dazu beitragen, neue Strategien für das Management mariner Ökosysteme und den Schutz der antarktischen Fauna zu entwickeln.

Insgesamt bieten die gewonnenen Ergebnisse eine solide Grundlage für die Weiterentwicklung und Verwertung im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans. Sie ermöglichen nicht nur Fortschritte in der Grundlagenforschung, sondern haben auch das Potenzial, direkte wirtschaftliche und gesellschaftliche Auswirkungen zu erzielen.

5. Der während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Obwohl es bereits beträchtliche wissenschaftliche Erkenntnisse über die Biologie, Ökologie und Physiologie des Krills gibt, ist seine Genomsequenz aufgrund seiner großen Genomgröße von bis zu 48 Gbp, die um eine Größenordnung größer ist als das menschliche Genom, noch nicht verfügbar.

Bakterien, die im Verdauungstrakt des Krills gedeihen, sind bisher nur wenig untersucht worden, dennoch gibt es erste Hinweise darauf, dass bakterielle Enzyme zum Verdauungskoktail im Magen und in der Verdauungsdrüse des Nördlichen Krills, *Meganyctiphantes*, beitragen. Außerdem wurden *Psychrobacter* spp. aus *E. superba* isoliert, die kälteangepasste Metalloproteasen ausscheiden, und in einer neueren Studie wurden 42 Pilz- und 33 Bakterienarten im antarktischen Krill identifiziert. Somit ist es offensichtlich, dass auch der Krill als Metaorganismus betrachtet werden kann, der potenziell ein Kernmikrobiom wie andere Meerestiere besitzt, d. h. das Wohlergehen des Krills sollte weitgehend von der Zusammensetzung, Funktionalität und Anpassungsfähigkeit seines Mikrobioms abhängen.

Weiter sind keine anderen signifikanten Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen bekannt geworden. Bisher stellen die im Rahmen dieses Projekts gewonnenen Ergebnisse eine einzigartige Grundlage zum Verständnis und zur biotechnologischen Verwertung des Krill-Mikrobioms dar.

6. Die erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.5 des NKBF

Das Fraunhofer IGB plant in Zusammenarbeit mit den anderen Projektpartnern die Veröffentlichung der im Rahmen dieses Projekts gemachten Ergebnisse. Ein Manuskript ist zurzeit in Bearbeitung und soll beim Journal Microbiology Spectrum bis Ende 2023 eingereicht werden.