



Sachbericht zum Projektabschluss

Vorhabenbezeichnung	MultiKulti - Kultivierung von bisher unkultivierten Mikroorganismen aus verschiedenen aquatischen Lebensräumen - Teilprojekt A
Leitung Teilprojekt A	Prof. Dr. Martin Koenneke
Förderkennzeichen	161L0285A
Berichtszeitraum	01.Juli 2021 – 30. Juni 2025
Autor	Prof. Dr. Martin Koenneke
Kontakt	Prof. Dr. Martin Koenneke Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM) AG Benthische Mikrobiologie Carl-von Ossietzky Str. 9-11 26129 Oldenburg Email: martin.koenneke@uol.de Telefon: 0441 798 5360

Fördermaßnahme „Methodenentwicklung in den Lebenswissenschaften“ im Förderbereich „BMBF-Kreativworkshopreihe Bio Challenges“.

Das Projekt wurde gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

I Kurdarstellung

1. Aufgabenstellung

Das hier beschriebene Projekt stellt die Umsetzungsphase für das Forschungsvorhaben MultiKulti dar, das während der Culture Challenge 2019 in Berlin von den Teilprojektleitern gemeinsam konzipiert wurde. Das Ziel dieses Projekts war es, ein allgemein gültiges Kultivierungskonzept zu entwickeln, mit dem bisher unkultivierte Mikroorganismen aus aquatischen Lebensräumen gerichtet erhalten, angereichert und isoliert werden können. Neben der Entwicklung und dem Bau eines mobilen und in Modulen aufgebauten Bioreaktors, sollten initiale Informationen über die vorhandene Diversität, die erforderlichen physikochemischen Lebensbedingungen und die ökophysiologische Rolle der Zielorganismen gewonnen werden.

Um das Prinzip unseres Konzepts zu überprüfen wurden bisher unkultivierte Mikroorganismengruppen ausgewählt, die in nährstoffarmen, aquatischen Habitaten vermutlich wichtige ökologische Funktionen übernehmen.

Die Zielsetzung unseres Teilprojekts A *Kultivierung und biogeochemische Rolle von Marine Group II Euryarchaeota aus der Nordsee* bestand darin, durch die erstmalige Kultivierung von Vertretern der sogenannten Marine Group II Euryarchaeota (MG II) aus der Nordsee, die Physiologie dieser abundanten Mikroorganismen zu erforschen und ihre Rolle im Kohlenstoff der Meere zu bestimmen. Dies beinhaltete, das Vorkommen der MG II in unserem gewählten Probennahmegebiet um die Insel Spiekeroog nachzuweisen und die Lebensbedingungen innerhalb ihres natürlichen Ökosystems zu charakterisieren. Neben der Erfassung der physikochemischen Parameter für die Kultivierung war es erforderlich durch Vorversuche ein geeignetes Screening Verfahren, mögliche Substrate sowie verträgliche bakterielle Inhibitoren für die selektive Kultivierung dieser potentiell heterotrophen, planktonischen Archaeen zu identifiziert werden.

2. Ablauf des Vorhabens

Das Konzept für den wissenschaftlichen Ansatz und die technische Ausführungsplanung wurde in einer einjährigen Sondierungsphase gemeinsam mit allen Projektpartnern ausgearbeitet. Durch die Berufung von Martin Könneke an das ICBM der Universität Oldenburg nach der Antragstellung, wurde das Teilprojekt A in Oldenburg statt, wie ursprünglich geplant, am MARUM in Bremen angesiedelt. Die geplante Projektlaufzeit von Juli 2021 bis Juni 2024 wurde kostenneutral um ein Jahr bis Juni 2025 verlängert.

Basierend auf der Antragsskizze war das Teilprojekt A am ICBM in Oldenburg für folgenden Arbeitspaketen (AP) (mit-)verantwortlich:

- AP 2.4: Markierung mit stabilen Isotopen
- AP 3.1: Anreicherungs- und Kultivierungsansätze mit klassischen Verfahren
- AP 3.2: Omics-unterstützte Anreicherung und Kultivierung
- AP 3.3: Meta-Daten-basierte Anreicherung und Kultivierung
- AP 3.4: Systematische und innovative Anreicherungs- und Isolierungsansätze
- AP 4.1: Logistic und Sicherheit vor Ort
- AP 4.5: Kultivierung und biogeochemische Rolle von Marine Group II (MG II) Euryarchaeota aus der Nordsee
- AP 5.1: Administrative und wissenschaftliche Koordination
- AP 5.2: Öffentlichkeitsarbeit

3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Durch die Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybrisierungs (CARD-FISH) Technik an verschiedenen Wasserproben um die Insel Spiekeroog konnte erstmalige das Vorkommen und die saisonale Verteilung von MG II in Küstengewässern der Nordsee dargestellt werden. In Kombination mit weiteren Messungen von biologischen, chemischen und physikalischen Umweltparametern konnte gezeigt werden, dass die planktonisch lebenden MG II direkt nach der Sommeralgenblüte in den Monaten September bis November am häufigsten auftreten. In dieser Zeit stellen die MG II Populationen einen relativen Anteil von über 10% der gesamten planktonischen Mikroorganismengemeinschaft dar. Es konnte eine signifikante positive Korrelation mit der Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff und gelöstem Stickstoff, jedoch keine Korrelation mit der Gesamtmenge an Kohlenstoff nachgewiesen werden. Die relative Häufigkeit von MG II konnte mit 16S rRNA-Gen amplicon-sequencing (Illumina NextSeq1000) bestätigt und die Diversität der Mikroorganismengemeinschaft erfasst werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MG II in diesem Bereich der Nordsee überwiegend freilebend / planktonisch und nicht Partikel-assoziiert vorkommen. Mit diesen molekularökologischen Studien konnten der Probennahmestandort, der beste Zeitpunkt als auch die bevorzugten physikalisch-chemischen Rahmenbedingungen für erfolgreiche Kultivierungsansätze bestimmt werden.

Für die Omics-gestützten Kultivierung wurden in Kooperation mit unserem Projektpartner aus Essen metagenomische Analysen an den Wasserproben durchgeführt. Bisher wurden dabei 14 metagenomic assembled genomes (MAGs) von MG II bioinformatisch zusammengefügt, die teilweise charakteristische Gen-cluster enthalten und derzeit hinsichtlich ihrer metabolischen Eigenschaften untersucht werden. Mit der Anwendung vieler verschiedener klassischen batch-Ansätzen konnte bisher jedoch noch kein Vertreter der MG II kultiviert werden. Allerdings wurden aus kontinuierlichen Kulturansätzen viele Bakterienstämme isoliert, die auffällig hohe und für diese Arten nicht beschriebene Antibiotika-Resistenzen aufweisen.

Die Zielsetzung unseres Teilprojekts A bestand darin, durch die Kultivierung von Vertretern der MG II aus der Nordsee, **a) die allgemeine Gültigkeit unseres Kultivierungskonzeptes zu validieren, b) die Physiologie dieser wichtigen Mikroorganismen zu erforschen und c) ihre Rolle im Kohlenstoff der Meere zu bestimmen**. Dies beinhaltete, das Vorkommen der MG II in unserem gewählten Probengebiet um die Insel Spiekeroog nachzuweisen und die Lebensbedingungen innerhalb ihres natürlichen Ökosystems zu charakterisieren. Neben der Erfassung der physikochemischen Parameter für die Kultivierung war es erforderlich durch Vorversuche mögliche Substrate und verträgliche bakterielle Inhibitoren für die selektive Kultivierung zu identifizieren. Zur präzisen physiologischen Charakterisierung des Metabolismus und zur Gewinnung von ausreichender Biomasse für biochemische, chemotaxonomische und genomische Untersuchungen, sollte die Kultivierung in kontinuierlichen Kulturen mit geringen Nährstoffzugaben etabliert werden.

AP 2.4: Markierung mit stabilen Isotopen

Die Versuche mit Einsatz von Substraten, die stabile Kohlenstoff oder Wasserstoff Isotope als Markierung enthalten, waren für den Einsatz im MultiKulti-Reaktor geplant. Aufgrund der verspäteten Fertigstellung und Inbetriebnahme des Reaktors, konnten diese Techniken nicht angewendet werden.

AP 3.1: Anreicherungs- und Kultivierungsansätze mit klassischen Verfahren

Als ersten Schritt für die Kultivierung von MG II mussten wir nachweisen, ob und wann diese Mikroorganismen in der Nordsee vorkommen. Dafür wurde im Rahmen einer Masterarbeit, die von Herrn Abad Grueso Mena in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde (Seasonal patterns of the euryarchaeotal Marine Group II in the North Sea, Universität Oldenburg, 2023), eine Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (CARD-FISH) Methode optimiert und etabliert, um Mikroorganismen der MG II selektiv und quantitativ in Meerwasser nachzuweisen. Als potentieller Probenahme Ort für die Kultivierung wurden die Gewässer um die Nordsee Insel Spiekeroog gewählt, die mit Wasser in der Nähe der Insel Helgoland als Referenzstandort verglichen wurden. Die absolute und relative Abundanzen von MG II wurden zu vier verschiedenen Jahreszeiten zwischen Juli 2022 und Mai 2023 bestimmt und mit verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern korreliert. In seiner Abschlussarbeit konnte Herr Grueso zeigen, dass unsere Zielorganismen vor Spiekeroog im September, kurz nach der Sommeralgenblüte, am häufigsten auftreten und einen relativen Anteil von etwa 10 % der gesamten Mikrobiomengemeinschaft darstellen. Weiterhin konnte eine signifikante, positive Korrelation mit der Verfügbarkeit von Sauerstoff und gelöstem Stickstoff, jedoch keine Korrelation mit dem verfügbaren Kohlenstoff nachgewiesen werden. Während die absolute Häufigkeit von MG II um Spiekeroog mit den Werten von Helgoland übereinstimmen, war die relative Abundanz in Helgoland aufgrund geringer Mikroorganismenkonzentration im Meerwasser höher (bis zu 23 %) und mit vorherigen Studien vergleichbar (Orellana et al. 2019).

Zur Erfassung der mikrobiellen Diversität wurde im Anschluss eine weitere Masterarbeit von Herrn Parsa Zahedi in unsere Arbeitsgruppe durchgeführt (Microbial Communities of the North Sea: An Overview, Universität Oldenburg 2024). Mit DNA basierten 16S rRNA Gen Amplicon Sequenzierung konnte Herr Zahedi die CARD-FISH Ergebnisse bestätigen und durch die Analyse von unterschiedlich gefiltertem Meerwasser zusätzlich zeigen, dass MG II in der Nordsee überwiegend in der planktonischen Fraktion (Porengröße <0,45 µm) und nicht Partikel-assoziiert vorkommen.

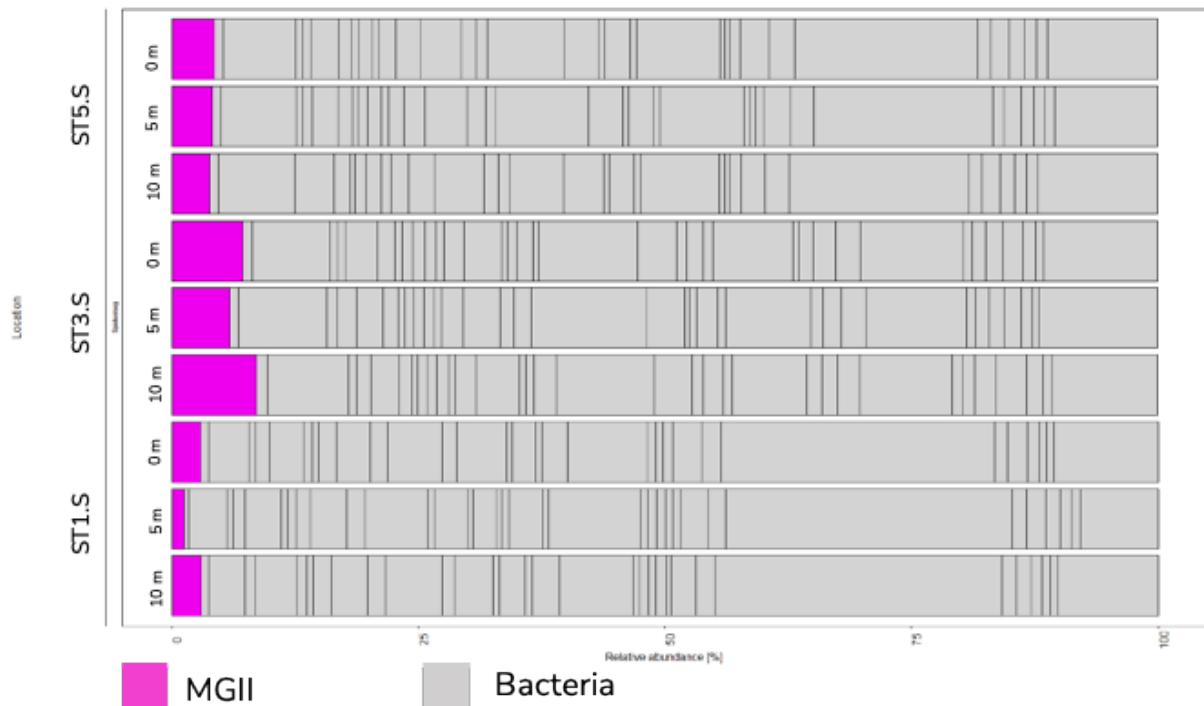


Abbildung 3: Relative Abundanz von MG II in Meerwasser verschiedener Probenahme-Stationen und Wassertiefen um die Insel Spiekeroog im September 2023. Die Abbildung zeigt den relativen Anteil von MG II 16S rRNA Genen in Relation zu Bakterien, die durch Amplicon Sequenzierung (Illumina NextSeq1000) ermittelt wurden.

Verschiedene metagenomische Studien von MG II deuten darauf hin, dass zumindest einige Vertreter dieser Gruppe komplex organische Substrate als Energie- und Kohlenstoffquelle verwenden können (Santoro 2019). Dementsprechend wurde das Wachstum von MG II systematisch mit verschiedenen komplexen Substratkombinationen, verschiedener Salzkonzentration und mit der Zugabe von Antibiotika, die das Wachstum von Bakterien jedoch nicht von Archaeen hemmen, in klassischen batch-Ansätzen untersucht. Als Substrate wurden N-acetylglucosamin, kolloides Chitin, und Zellulose eingesetzt. In den Kultivierungsansätzen konnte mit allen eingesetzten Substraten ein Anstieg der MG II Konzentration von 5×10^5 auf 10^7 Zellen pro ml innerhalb einer Inkubationszeit von 150 h festgestellt werden. Im Gegensatz zur Gesamtzellzahl erfolgte anschließend eine starke Abnahme der MG II

Population. Die Ergebnisse wurden mittels CARD-FISH Analyse zunächst validiert (Abb. 6).

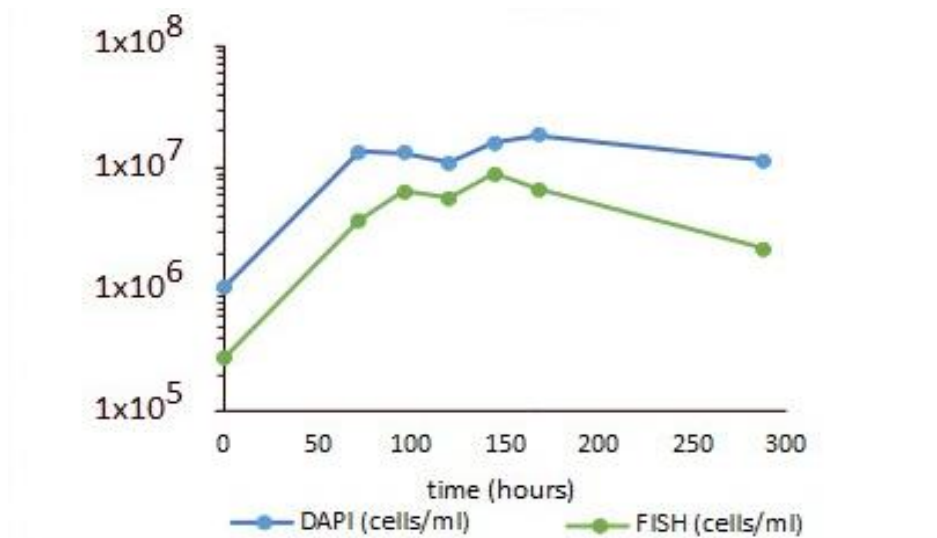


Abbildung 4: Batch-Anreicherung von MG II in künstlichem Meerwassermedium mit Zugabe von komplexen organischen Substraten. Dargestellt ist die Zunahme der MG II Population (CARD FISH, Sonde EURY806) im Vergleich zur gesamten Mikroorganismenkonzentration (DAPI) mittels Epi-Fluoreszenzmikroskopie.

Um inhibierende Effekte auf das Wachstum von MG II durch Substratlimitierung, Bildung toxischer Stoffwechselprodukte oder möglichem Virenbefall zu verringern und das Wachstum von Bakterien zu hemmen, wurde ein System zur kontinuierlichen Kultivierung eingeführt. Die Verdünnungsrate wurde gemäß der MG II Verdopplungszeit in den batch-Kulturen auf 20 h eingestellt, die eingesetzte Substrat Konzentration verringert und Bakterien-hemmende Antibiotika zugesetzt. Die kontinuierliche Kultur wurde über einen Zeitraum von 200 Tagen betrieben. Dabei wurde das Wachstum durch direktes mikroskopisches Auszählen von SYBRGreen gefärbten Zellen bestimmt. Die Mikroorganismenzusammensetzung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch 16S rRNA-Gen Amplicon Sequencing charakterisiert. Diese Arbeiten fanden im Rahmen einer weiteren Masterarbeit statt (Adbullah Özcan, Universität Oldenburg, Abgabe 2026).

Um das beschriebene gemeinsame Auftreten von MG II und phototrophen Mikroalgen zu untersuchen, wurden weiterhin batch-Kultivierungsansätze mit den einzelligen Algen *Phaecystis globosa* und *Micromonas pusilla* durchgeführt. Auch hier konnte mittels qPCR eine anfängliche Zunahme der MG II Population festgestellt werden.

Obwohl die Kultivierungsmethoden reproduzierbar waren und das Wachstum von MG II sowohl durch qPCR als auch durch CARD FISH nachgewiesen wurden, konnten in den Kulturen keine MG II durch 16S rRNA Gen-Amplicon Sequencing oder durch metagenomische Analysen (gemeinsam mit UDE) nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der qPCR Methode wurden daher die PCR Produkte aus den MG II Anreicherungen dafür mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit den Produkten aus der Umwelt verglichen. Während die Umweltproben nur ein einziges Produkt mit der erwarteten Fragmentlänge zeigte, wurden in den Kulturen zwei unterschiedliche

Fragmente gefunden. Dies bedeutet, dass die angewendete qPCR Methode nicht spezifisch genug war und es in den Anreicherungen zu einer Co-Reaktion mit einer anderen Gensequenz kam. Die anschließende Klonierung und Sequenzierung des zweiten Fragments ergab, dass die Gensequenz zu einem marinen Bakterium der Gattung *Devosia* gehört. Angehörige dieser alpha-Proteobakterium Gruppe wurde im Anschluss ebenfalls als Hauptbestandteil der Mikroorganismengemeinschaft in der kontinuierlichen Kultur gefunden. Die qPCR Methode wurde dementsprechend angepasst und die Spezifität konnte durch viele Experimente nun verifiziert werden. Zusammenfassend können wir sagen, dass wir keine MG II Kulturen anreichern oder isolieren konnten, sondern trotz sorgfältiger Überprüfung unserer Screeningmethode einer falschen Mikroorganismengruppe gefolgt sind. Erstaunlich war für uns die Tatsache, dass sehr viele heterotrophe Bakterien, die wir aus dem Meerwasser der Nordseeküste kultiviert und isoliert haben, Resistenzen gegen viele, in der Medizin eingesetzte Antibiotika besitzen. In einer gemeinsamen Masterarbeit mit Mikrobiologen am ICBM und aus der medizinischen Fakultät der Universität Oldenburg wurden verschiedene Bakterien aus der kontinuierlichen Kultur isoliert und hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenzen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stämme aus der Nordsee im Gegensatz zu den jeweiligen Typenstämmen aus den Stammsammlungen resistent gegen eine Vielzahl von Antibiotika sind. Diese Resistenzen werden vermutlich von terrestrischen multi-resistenten Stämmen, die über die Flüsse in die Küstengewässer der Nordsee gespült werden, durch horizontalen Gentransfer übermittelt.

AP 3.2: Omics-unterstützte Anreicherung und Kultivierung

Zur Bestimmung der physiologischen Kapazität von MG II und zur präzisen phylogenetischen Einordnung wurden metagenomische Analysen an Wasserproben von Spiekeroog und Helgoland durchgeführt, die durch hohe MG II Abundanzen charakterisiert waren. Von den 10 ausgewählten Wasserproben (September & November 2024) konnten bisher insgesamt 211 MAGs (*metagenomic assembled genomes*) von Bakterien und Archaeen rekonstruiert werden. Von diesen 211 MAGs konnten wir 14 MG II bioinformatisch zusammenführen, die eine *Completeness* zwischen 63 und 97% und nur geringe Kontaminationen beinhalten (siehe Abb. 4). In einem bioinformatischen Masterprojekt (in Kooperation mit Prof. Dr. Sarahi Garcia, ICBM) wird derzeit versucht durch Metagenomabgleiche mit MAGs aus globalen Datenbanken, die MG II MAG-Anzahl und Informationsdichte zu erhöhen.

Location	Month	Station	Depth [m]	*Classification	Completeness [%]	Contamination [%]
Spiekeroog	September	ST1.S	0	f_Poseidoniaceae:g_Poseidonia;s_Poseidonia sp009887255	63	5
			10	f_Poseidoniaceae:g_MGIIa-L1;s_MGIIa-L1 sp009887095	97	3
		ST3.S	0	f_Poseidoniaceae:g_Poseidonia;s_Poseidonia sp009887255	61	0
			5	f_Thalassarchaeaceae:g_MGIIb-02;s_MGIIb-02 sp030828405	97	0
		ST5.S	0	f_Poseidoniaceae:g_MGIIa-L1;s_MGIIa-L1 sp009887095	97	18
			5	f_Poseidoniaceae:g_MGIIa-L1;s_MGIIa-L1 sp009887095	97	5
		ST3.S	5	f_Thalassarchaeaceae:g_MGIIb-02;s_MGIIb-02 sp030828405	92	0
			10	f_Poseidoniaceae:g_MGIIa-L1;s_MGIIa-L1 sp009887095	97	11
		ST5.S	0	f_Thalassarchaeaceae:g_MGIIb-02;s_MGIIb-02 sp030828405	95	3
			10	f_Poseidoniaceae:g_MGIIa-L1;s_MGIIa-L1 sp009887095	97	5
Helgoland	September	ST4.H	0	f_Poseidoniaceae:g_Poseidonia;s_Poseidonia sp002494645	61	0
			10	f_Thalassarchaeaceae:g_MGIIb-02;s_MGIIb-02 sp030828405	97	0

*d_Archaea;p_Thermoplasmata;c_Poseidonia;o_Poseidoniales

Abbildung 5: Übersicht der zusammengeführten MG II MAGs (metagenomic assembled genomes) aus Nordseewasserproben.

Die bisherigen Analysen zeigten, dass vor Spiekeroog beide MG II Familien, also sowohl Angehörige der *Poseidinaceae* als auch der *Thalassarchaeae* vorkommen. Während aus Nordseewasser in der Nähe von Helgoland, das durch die Entfernung zur Küste weniger terrestrische Einträge erhält, ausschließlich Angehörige der *Thalassarchaeaceae* (MG IIb) gefunden wurden, konnten bei der Küsten-nahen Station (auf der Wattseite von Spiekeroog) ausschließlich MAG von Angehörigen der *Poseidoniaceae* (MG IIa) generiert werden. Diese Unterschiede wurden durch Untersuchungen des PAN Genoms bestätigt. Hier konnten einzigartige Gen-Cluster innerhalb der MG IIa und MG IIb assoziierten MAGs identifiziert werden (Abb. 5), die auf signifikante genomische Unterschiede zwischen MAGs aus der Nordsee-zugewandten (off-shore beeinflusst) und der Rückseitenwatt Station hindeuten. Im Rahmen einer Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe und in Kooperation mit unserem Projektpartner Prof. Dr. Probst (UDE) werden nun die bioinformatischen Analysen fortgeführt, um diese besonderen Gen Cluster zu untersuchen und die potenzielle Stoffwechselwege der verschiedenen MG II Gruppen zu identifizieren. Im Speziellen geht es darum, mögliche Besonderheiten bzw. metabolische Fähigkeiten zu finden, die Hinweise auf den Energie- und Kohlenstoffstoffwechsel liefern und die gezielte Kultivierung der MG II unterstützen. Abweichend von der ursprünglichen Planung, wurden die Metagenome mit unserem eigenen Sequenzierer (Illumina NextSeq100) direkt am ICBM erzeugt, wodurch lediglich die Verbrauchsmaterial beschafft werden musste. Diese genehmigte Änderung der Kostenplanung wurde durch die Beschaffung des Geräts aus Berufungszusagen möglich.

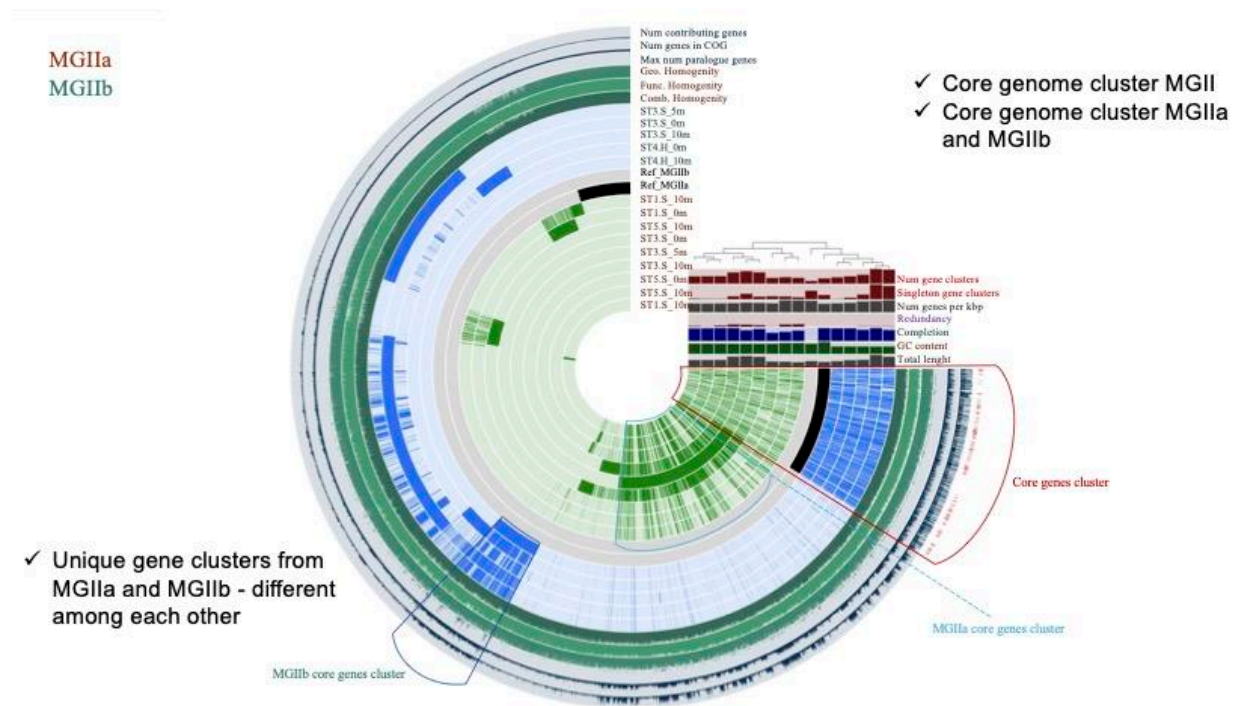


Abbildung 6: Untersuchung des PAN Genoms der zusammengeführten MG II MAGs aus Nordseewasserproben bei Spiekeroog.

AP 3.4: Systematische und innovative Anreicherungs- und Isolierungsansätze

Voraussetzung für dieses Arbeitspaket war die Erhaltung der aktiven Zielorganismen im Bioreaktor.

AP 4.1: Logistik und Sicherheit vor Ort

Logistische und Sicherheitsrelevante Aspekte für den Betrieb des MultiKulti-Reaktors am ICBM wurden bereits während der Berufungsverhandlungen von Martin Könneke mit den verantwortlichen Stellen diskutiert und gelöst.

AP 4.5: Kultivierung und biogeochemische Rolle von Marine Group II (MG II) Euryarchaeota aus der Nordsee

Der ursprünglich geplante Ansatz zur Kultivierung von MG II unter *in-situ* nahen Bedingungen im Bioreaktor konnte leider nicht durchgeführt werden. Eine erfolgreiche Kultivierung von MG II durch eine andere Arbeitsgruppe ist ebenfalls nicht veröffentlicht. Durch den umfangreichen Datensatz aus den hier dargestellten ökologischen und metagenomischen Analysen wurde das Wissen über diese abundante Mikroorganismengruppe und ihr Vorkommen in Küstengewässern deutlich erweitert. Die Gewissheit, dass MG II quasi direkt vor unserem Institut vorkommen, ermöglicht uns nun sehr viele Möglichkeiten für weitere Kultivierungsansätze. Im speziellen haben wir bereits mit den Kollegen der AG Marine Geochemie am ICBM

konkrete Forschungsvorhaben geplant, die im Rahmen von Studentenprojekten bereits im September 2026 durchgeführt werden sollen.

AP 5.1: Administrative und wissenschaftliche Koordination

Die Koordination des Gesamtprojektes MultiKulti erfolgte am ICBM der Universität Oldenburg. Dabei wurde Prof. Dr. Martin Könneke zunächst von Dr. Marion Pohlner und in den letzten Monaten der Projektphase von Sönke Rolfes unterstützt. Beide organisierten, moderierten und dokumentierten die online und vor Ort Treffen der Projektpartner, kümmerten sich um die home page (multikultivierung.de) und hielten die Kommunikation zwischen den Projektpartnern untereinander und mit externen Stellen (z.B. Projektträger) aufrecht.

Neben den monatlichen online Treffen und ca. halbjährlichen vor Ort Treffen bei den verschiedenen Projektpartnern, sind als wesentliche Ereignisse der Besuch von Stephan Albani (MdB) am ICBM (Juli 2021), das KickOff-Meeting am ICBM (September 2021) als auch das Abschluß-Meeting in Essen (Mai 2025) zu nennen.

Gemeinsame Probennahmen aller Projektteilnehmer und ein Kultivierungs-Ringversuch fanden im November 2021 am Kaltwasser Geysir Andernach und im Juni 2024 im Wattenmeer und der Nordsee vor Spiekeroog statt. Diese Unternehmungen wurden maßgeblich durch die Projektkoordinatoren und mit Hilfe der Projektpartner vor Ort organisiert.

Desweiteren wurde eine Webinar-Serie über die Kultivierung von Mikroorganismen initiiert und in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Unter anderem wurden online-Vorträge von Prof. Dr. Jörg Overmann (DSMZ Braunschweig), Ken Stedman (Portland State University, USA), William B. Whitman (University of Georgia, USA), Robert Reichelt (Universität Regensburg) und Jens Kallmeyer (GFZ Potsdam) präsentiert, die ebenfalls von zahlreichen (z.T. > 100) externen Gästen besucht wurden.

AP 5.2: Öffentlichkeitsarbeit

Unser Teilprojekt wurde regelmäßig in die Öffentlichkeitsarbeit des ICBM als einziges universitäre Meeresforschungsinstituts Niedersachsens integriert. Neben Veranstaltungen am ICBM im Rahmen der *Langen Nacht der Wissenschaft* oder der *PhD days*, wurde das Projekt auch im Nationalpark-Haus Wittbülten auf Spiekeroog vorgestellt. Die weiteste Tragweite hatte jedoch die Projekt-homepage multikultivierung.de, auf die alle Projektpartner regelmäßig von externen Besuchern, Studenten oder Wissenschaftlern angesprochen wurden.

Im Bereich des wissenschaftlichen Austausches wurden zu diesem Projekt folgende Kooperationen etabliert:

Prof Dr. Sarahi Garcia, Pelagische Mikrobiologie, ICBM Oldenburg

Prof. Dr. Thorsten Dittmar, Marine Geochemie, ICBM Oldenburg

Prof. Dr. Susanne Erdmann, MPI für Marine Mikrobiologie Bremen

Abschlussarbeiten

Innerhalb des Berichtszeitraum wurden im Rahmen dieses Projekts zwei Masterprojekte im internationalen Masterstudiengang Microbiology am ICBM der Universität Oldenburg erfolgreich abgeschlossen.

Seasonal patterns of the euryarchaeotal Marine Group II in the North Sea, Abad Felipe Grueso Mena, 2023

Microbial Communities of the North Sea: an Overview, Parsa Zahedi, 2024

Eine weitere Masterarbeit über die kontinuierliche Kultivierung und Isolierung von planktonischen Mikroorganismen aus der Nordsee von Abdulah Öczan soll im April 2026 eingereicht werden.

Weiterhin wurden während der Projektlaufzeit acht eigenständige sechswöchige *Research Projects* im Rahmen des Microbiology Programms erfolgreich abgeschlossen.

Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Fördermittel wurden gemäß des genehmigten Kostenplans verwendet. Dabei entfielen die größten Kosten auf folgende Posten:

- 1) Personalmittel (0812): **226.938,44 EURO** für eine Doktoranden- und eine Koordinatorenstelle (insgesamt 17 Monate).
- 2) Verbrauchsmittel / Sonstige Verwaltungsausgaben (0843): **83.870,00 EURO** In diesem Posten sind die Verbrauchsmittel für die Sequenzierung enthalten.
- 3) Investitionsmittel (0850): **29.690,70 EURO** Zur qualitativen Kontrolle der DNA Proben für die Metagenom-Sequenzierung wurde ein Analysegerät (TapeStation / Agilent: 25.036,65 EURO) benötigt.

Alle Mittelverwendungen sind im zahlenmäßigen Nachweis aufgeführt. Die genehmigte Änderung des Kostenplans der Personalmittel (E9 zu E13) und der Auftrags- und Expeditionskosten begründeten sich mit der Berufung von Martin Könneke ans ICBM und den damit verbundenen infrastrukturellen Gegebenheiten. Die Änderung der Personalmittel für die Doktorandin (E13) und die kostenneutrale Verlängerung begründeten sich auf den Mutterschutz / Elternzeit der wissenschaftlichen Mitarbeiterin.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Alle im Projektzeitraum durchgeführten Arbeiten sowie die dafür aufgewandten Ressourcen waren notwendig und angemessen, da sie der in der Projektskizze dargelegten Zielerreichung entsprachen. Alle bedingten Änderungen der Arbeits-, Zeit- und Kostenplanungen wurden in den Zwischenberichten angezeigt und erläutert.

Der Projektlaufzeit fiel leider in einen Zeitraum, der durch die nachwirkenden Folgen der COVID-Pandemie und den Überfall Russlands auf die Ukraine geprägt war. Dadurch ergaben sich Erschwernisse bei der Durchführung der wissenschaftlichen Arbeiten aber vor allem globale Warenengpässe und lange Lieferfristen für molekularbiologische und technische Produkte. Dies resultierte in einer deutlich verspäteten Fertigstellung und Inbetriebnahme des MultiKulti-Reaktors, der ein Kernstück unseres Projekts darstellt. Dementsprechend wurde das Erreichen vieler Projektziele erheblich erschwert. Trotzdem brachte dieses Teilprojekt unter der Mithilfe der Projektpartner und engagierten Studierenden viele neue wissenschaftlich Erkenntnisse hervor, die uns bei der Erforschung der Ökophysiologie und Diversität planktonischer Archaeen erheblich helfen und die Notwendigkeit der Mittel rechtfertigt.

Voraussichtliches Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Gemäß des formulierten Verwertungsplan beinhaltet dieses Teilprojekt keine wirtschaftliche Verwertung. Die wissenschaftliche Verwertung erfolgt durch Publikationen in Fachjournalen und durch Fachbeiträge auf nationalen und internationalen Konferenzen. Darüber hinaus werden die gewonnenen Umweltdaten und metagenomische Daten über Forschungsdatenbanken verschiedenen wissenschaftlichen Bereichen und Disziplinen zugänglich gemacht.

Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Innerhalb der Projektlaufzeit sind viele Publikationen veröffentlicht wurden, die sich mit der Ökophysiologie von MG II beschäftigen. Allerdings kenne ich keine Studie, die das erfolgreiche Kultivieren dieser Gruppe beschreibt. In den meisten Arbeiten wird über die bioinformatische Analyse von existierenden oder neuen Metagenomen berichtet, die Hinweise über potentielle metabolische Eigenschaften, der Detektion von Virensequenzen oder das Vorkommen von MG II in weiteren marinen Standorten berichten. Da die Kultivierung von bisher unkultivierten Mikroorganismen ein hohes Risiko trägt und häufig ein mehrjähriges Unterfangen darstellen kann, werden Kultivierungsprojekte nur selten gefördert oder von Promovierenden oder PostDoc, aufgrund der zeitlich befristeten Verträge, nicht als Forschungsprojekt gewählt.

Auch im Bereich des Bioreaktorbaus für die Kultivierung umweltrelevanter Mikroorganismen bei geringen Nährstoffkonzentrationen sind mir keine Fortschritte bekannt.

Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Folgender Artikel wurde im peer-review Verfahren unter Beteiligung dieses Teilprojekts veröffentlicht:

Simon, S.A., Aschmann, V., Behrendt, A., Hügler, M., Engl, L.M., Pohlner, M., Rolfes, S., Brinkhoff, T., Engelen, B., Könneke, M., Rodriguez-R, L.M., Bornemann, T.L.V., Nuy, J.K., Rothe, L., Stach, T.L., Beblo-Vranesevic, K., Leuko, S., Runzheimer, K., Möller, R., Conrady, M., Huth, M., Trabold, T., Herkendell, K., Probst, A.J., 2025.

Earth's most needed uncultivated aquatic prokaryotes. *Water Research* 273, 122928. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122928>

Zwei weitere Manuskripte werden zurzeit angefertigt und sollen 2026 für die Veröffentlichung eingereicht werden. Ein Manuskript befasst sich mit der saisonalen Verteilung und Diversität von MG II in Küstengewässern der Nordsee. Ein zweites Manuskript beschreibt die detaillierte metagenomische Analyse von MG II in Nordseewasser.

In einem Vortrag beim BigBang.. Microbes! VAAM Workshop über die Kultivierung der Unkultivierbaren. (Köln, 2023) wurde das MultiKulti Projekt vorgestellt.

Literaturverzeichnis

DeLong, Edward F. (2020): Exploring Marine Planktonic Archaea: Then and Now. In *Frontiers in microbiology* 11, p. 616086. DOI: 10.3389/fmicb.2020.616086.

Rinke C., Rubino F., Messer LF., Youssef N., Parks DH., Chuvochina M., et al. (2019). A phylogenomic and ecological analysis of the globally abundant Marine Group II archaea (Ca. Poseidoniales ord. nov.). *ISME J.* 13, 663–675. doi: 10.1038/s41396-018-0282-y

Santoro, Alyson E.; R. Alexander Richter; Christopher L. Dupont (2019): Planktonic Marine Archaea (11), pp. 131–158. Available online at <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121916-063141>.