

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger: Universität Duisburg-Essen

Projektleiter: Prof. Dr. Alexander Probst

Projekttitel: MultiKulti - Kultivierung von bisher unkultivierten Mikroorganismen aus verschiedenen aquatischen Lebensräumen

Förderkennzeichen: **161L0285E**

Berichtszeitraum: 01.07.2021-30.06.2025

Verantwortliche Autor*innen: Prof. Dr. Alexander Probst
Sophie Simon

Kontakt: Prof. Dr. Alexander Probst
Universität Duisburg-Essen
Fachbereich Chemie
Forschungszentrum One Health
S05 T02 A30
Universitätsstr. 5
D-45141 Essen
alexander.probst@uni-due.de

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autor*innen.

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

I. Kurze Darstellung

(1) die ursprüngliche Aufgabenstellung sowie den wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde

Kernziel des Vorhabens „MultiKulti“ war die Entwicklung und der Betrieb eines neuartigen Bioreaktors zur Kultivierung bisher noch nicht kultivierter Bakterien und Archaeen. Die Mehrheit (>99%) der bekannten Bakterien und Archaeen sind nur durch Metagenomik bekannt und können bisher nicht im Labor kultiviert werden. Der gemeinsam mit den Projektpartnern (UOL, DLR, HUB, FAU, TZW) geplante modulare „MultiKulti-Reaktor“ soll möglichst „habitatnah“ die Lebensbedingungen verschiedener Ökosysteme simulieren. Das Reaktorsystem sollte einen Betrieb bei bis zu 20 bar Druck mit einem Reaktorvolumen von 20 L ermöglichen. Aufgrund der geringen Zelldichten aquatischer Mikroorganismen wurde ein großes Reaktorvolumen als erforderlich angesehen, um ausreichend Biomasse für mikrobiologische Analysen zu gewinnen. Der Reaktor wurde mit Standardsensorik (pH, Druck, Leitfähigkeit) sowie projektspezifischen Methoden wie Live-Sequenzierung (AP 2.3. UDE) geplant und ausgestattet, um Kultivierungsbedingungen und Abweichungen präzise zu erfassen. Ein modularer Aufbau mit Nebenreaktoren sollte zudem Probenahmen ohne Eingriff in das Hauptsystem ermöglichen. Teilprojektziel der UDE war die Kultivierung/Anreicherung von Altiarchaeota, einem archaellen Phylum das in CO₂/Carbonat-reichen Ökosystem der terrestrischen Tiefenbiosphäre vorkommt [1, 2].

Das Projekt knüpfte an die Ergebnisse der vorherigen Sondierungsphase an. Nach der „Culture Challenge 2019“ in Berlin war es Ziel in dieser vom BMBF/BMFTR finanzierten Sondierungsphase das Konzept des *in situ*-Reaktors zusammen mit den Projektpartnern bereits auszuarbeiten. Im Projekt MultiKulti konnte daher direkt mit ersten Ergebnissen aus der Sondierungsphase fortgefahren werden. Zum Projektbeginn gab es bereits erste Veröffentlichungen zu 16S rRNA Gen Sequenzierungen mittels des Sequenziergerätes MinION von Oxford Nanopore Technologies (ONT); zudem war die Methodik im Rahmen der Sondierungsphase bereits projektspezifisch ausgehend mit geringer Biomasse beim Projektpartner UDE etabliert [3–5]. Bezüglich Omics-unterstützter Anreicherung und Kultivierung existierten zu Projektbeginn bereits publizierte Umsetzungen, wie beispielsweise die erste Kultivierung von *Saccharibacteria* [6].

(2) den Ablauf des Vorhabens

Der ursprünglich geplante Projektzeitraum war vom 01.07.2021 bis 30.06.24, nach kostenneutraler Verlängerung war das Projektende ein Jahr später am 30.06.2025. Im Rahmen des Verbundprojekts war der Projektpartner UDE für die folgenden Arbeitspakete allein- oder mitverantwortlich:

i. AP 2.3: Live-Sequenzierung (UDE)

- ii. AP 3.2 Omics-unterstützte Anreicherung und Kultivierung (**UDE**, DLR, UOL, TZW)
- iii. AP 3.3 Meta-Daten-basierte Anreicherung und Kultivierung (DLR, UOL, TZW, **UDE**)
- iv. AP 3.4 Systematische und innovative Anreicherungs- und Kultivierungsansätze (UOL, DLR, TZW, **UDE**)
- v. AP 4.4: Kultivierung und Ökophysiologie von Altiarchaeota (**UDE**)
- vi. AP 5.2. Öffentlichkeitsarbeit und wissenschaftlicher Austausch (alle Projektpartner*innen)

(3) die wesentlichen Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Die Ergebnisse des Teilprojekts zeigen, dass sogenannte *long-read* Metagenomik (hier basierend auf ONT) für das Schließen von Genomen aus komplexen Metagenomen entscheidend ist und sich ONT-Sequenzierung zuverlässig auch in Proben mit sehr geringer Biomasse einsetzen lässt. Durch Anwendung von ONT *long-read* Metagenomik konnte das erste geschlossene Genom eines Organismus des Phylum Altiarchaeota assembliert werden, genauer gesagt von *Altiarchaeum vulcanifelium*. Eine Analyse des Genoms zeigte eine Vielzahl an mobilen genetischen Elementen. Darüber hinaus konnte aus fünf weiteren Ökosystemen altiarchaeelle MAGs (*metagenome assembled genomes*, d.h. aus Metagenomen rekonstruierte Genome) rekonstruiert werden, die deutlich vollständiger und kohärenter waren als jene MAGs, die in vorherigen Studien mittels *short-read* Metagenomik erzeugt wurden.

Es wurde demonstriert, dass Amplikonsequenzierungen des gesamten 16S rRNA Gens mittels ONT technisch ausgereift sind und als neuer Standard taxonomischer Analysen von Amplikondaten dienen sollten, anstelle nur Teilregionen des etwa 1500 bp langen Gens zu nutzen. So kann eine höhere taxonomische Auflösung erreicht werden. Darüber hinaus zeigt die Kombination von Kultivierung mit einem DNA-Basenanalogen mit ONT-Sequenzierung ihr Potenzial, mikrobielle Aktivität direkt abzuleiten. Aussagen zur mikrobiellen Aktivität konnten zuvor nur durch zusätzliche Omics-Ansätze wie Metatranskriptomik getroffen werden.

Im Verlauf des Projekts fand eine besonders enge Zusammenarbeit mit den Projektpartnern (UOL, FAU, HU, DLR und TZW) statt. Darüber hinaus wurden für drei der Publikationen noch externe Wissenschaftler*innen auf Grund besonderer Expertise hinzugezogen (siehe II.5).

II. Eingehende Darstellung

(1) im Rahmen des Vorhabens durchgeführte Arbeiten, im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung

a) AP 2.3: Live-Sequenzierung

Ursprüngliches Ziel des Arbeitspakets war es, die bereits etablierte Methode zur Live-Sequenzierung kontinuierlich an den aktuellen Stand der Technik anzupassen. Aufgrund der schnellen technologischen Entwicklungen im Bereich ONT-Sequenzierung war eine regelmäßige Überprüfung und Aktualisierung des Arbeitsablaufs sowohl hinsichtlich der Herstellung der DNA-Bibliotheken, als auch der bioinformatischen Auswertung der Daten erforderlich. Im Laufe des Projekts wurden noch kleine Anpassungen der Echtzeit-Sequenzierung gemacht, so wurde neben dem Primerset 27f/1492r, welches gut für Bakterien funktioniert, noch das Primerset 1f/1497r etabliert, das eine Amplifikation von archaischen 16S rRNA-Genen zeigt. Dazu wurde die für Multikulti erworbene TapeStation (Agilent) zur automatisierten Elektrophorese in den Arbeitsablauf integriert, somit kann die Qualitätskontrolle der eingesetzten DNA und der Amplikons deutlich zeitsparender erfolgen als mit klassischer Agarose-Gelelektrophorese. Der etablierte Arbeitsablauf ist in Abbildung 1 gezeigt. Die im Antrag beschriebene Analyse-Software für die Reaktorüberwachung mittels 16S rRNA Markergen Live-Sequenzierung wurde nicht programmiert, da kein Reaktorbetrieb absehbar war.

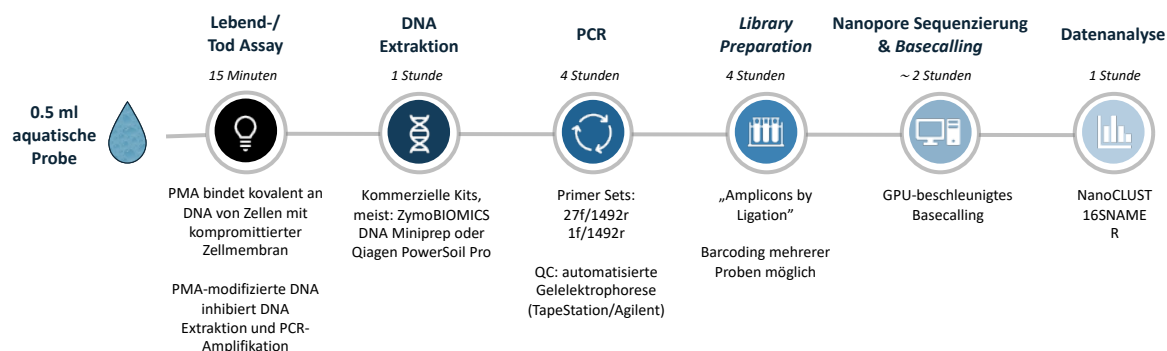


Abbildung 1: Finaler Arbeitsablauf für die Echtzeit-Sequenzierung zum Reaktormonitoring.

Entscheidend für den Projektverlauf war eine stetige Implementation aller Weiterentwicklungen im Bereich der ONT *long-read* Sequenzierung. Zum Zeitpunkt der Antragstellung war die Qualität von ONT-*Reads* noch problematisch und erreichte nur eine Genauigkeit von ~90%, da sich diese jedoch kontinuierlich bis auf >99% zu Projektende, konnten im Rahmen dieses Arbeitspakets immense Weiterentwicklungen im Bereich ONT *long-read* Sequenzierung gemacht werden, die zum Zeitpunkt der Antragsstellung nicht absehbar waren [7–9]:

Metagenomik mit Sequenzierungsplattformen von ONT ermöglichen die direkte Sequenzierung (theoretisch) unbegrenzt langer DNA-Fragmente aus mikrobiellen

Gemeinschaften. Dadurch lassen sich Genome einzelner Organismen deutlich vollständiger und kohärenter rekonstruieren, da lange Reads über repetitive Genomregionen hinwegreichen und Assemblierungsbrüche minimieren. Dank *long-read* Sequenzierungen wurden geschlossene Genome rekonstruiert aus Metagenomen innerhalb kurzer Zeit Routine [10–13]. Diese Möglichkeit wurde entsprechend projektspezifisch weiterentwickelt, um die Vorteile der Metagenomik gegenüber Amplikonsequenzierungen auch im Reaktormonitoring zu nutzen. Amplikonsequenzierungen des 16S-rRNA-Gen erlauben nur Aussagen über die Zusammensetzung eines Mikrobioms („Wer ist da?“), während Metagenomik noch Rückschlüsse auf das metabolische Potential erlaubt („Wer ist da und was können sie?“). Hier bestand die Herausforderung im hohen DNA-Input (1-3 µg) den ONT für die Sequenzierung empfiehlt, während hingegen DNA-Konzentrationen in Zielökosystem von MultiKulti wie Trinkwasser, oder Grundwasser gering sind. Hinzukommend ist bei einem möglichen Reaktorbetrieb von einem geringen Volumen an Probe auszugehen, welches für Sequenzierungen entnommen werden kann. Daher wurde mit einem mikrobiellen DNA-Standard, der genau definierte Mengen genomischer DNA von acht Mikroorganismen enthält (ZymoBIOmics) die DNA Input Menge für die Herstellung der DNA-Bibliotheken in Triplikaten bis auf 1 ng reduziert. Die Ergebnisse wurden auf verschiedenen Schritten eines metagenomischen Workflows evaluiert und zeigten, dass die DNA Input Mengen deutlich reduziert werden können, ohne Verluste an Qualität der Reads oder Möglichkeit hochqualitative Genome zu rekonstruieren. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass sogenannte Hybridassemblierungen, die *short-* und *long-Reads* nutzen, immer kohärentere Ergebnisse liefern als alleinige short-read Assemblierungen [14]. Das ist ein wichtiger Indikator ONT long-reads auch beispielsweise für die Omics-unterstützte Kultivierung (AP 3.2) mitanzuwenden.

Das initial umgesetzte Reaktormonitoring mittels Echtzeit-Amplikonsequenzierungen wurde komplementiert durch ein lebend-tot-Assay mittels Propidium-Monoazid (PMA), da sonst nicht ausgeschlossen werden kann, dass nur „DNA-Relikte“ toter Zellen sequenziert werden; auch die Metagenomik erlaubt keine Rückschlüsse über mikrobielle Aktivität oder Viabilität. ONT-Sequenzierung und modifiziertes Basecalling ermöglichen neben den vier kanonischen DNA-Basen auch die Identifizierung von DNA-Modifikationen oder nicht-kanonischen DNA-Basen. Diese Möglichkeit wurde genutzt, um aktivitätsbasierte Metagenomik zu etablieren. Dazu werden Anreicherungskulturen aus Belebtschlamm mit dem Thymidin-Analogen Bromdesoxyuridin (BrdU) versetzt, aktive mikrobielle Zellen können BrdU aufnehmen und nach Phosphorylierung anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in neu synthetisierte DNA einbauen. Das eingebaute BrdU lässt sich dann mit bereits bestehenden bioinformatischen Methoden in Populationsgenomen nachweisen und zeigt so, welche Spezies zum Zeitpunkt der Probenahme aktiv waren [15]. Durch das BrdU-Assay konnte auch die Induktion von Prophagen gezeigt werden, die unter Umständen das Wachstum von Zielorganismen behindern. Das BrdU-Assay erlaubt

zudem einen Nachweis von Aktivitätsraten bei Verwendung verschiedener Medien für Anreicherungskulturen. Gemeinsam mit der Identifizierung von induzierten Prophagen können mit diesen Informationen Kultivierungsexperimente optimiert werden [16]. Abbildung 2 zeigt den experimentellen Konzeptnachweis und den erfolgreichen Nachweis von BrdU in Genomen.

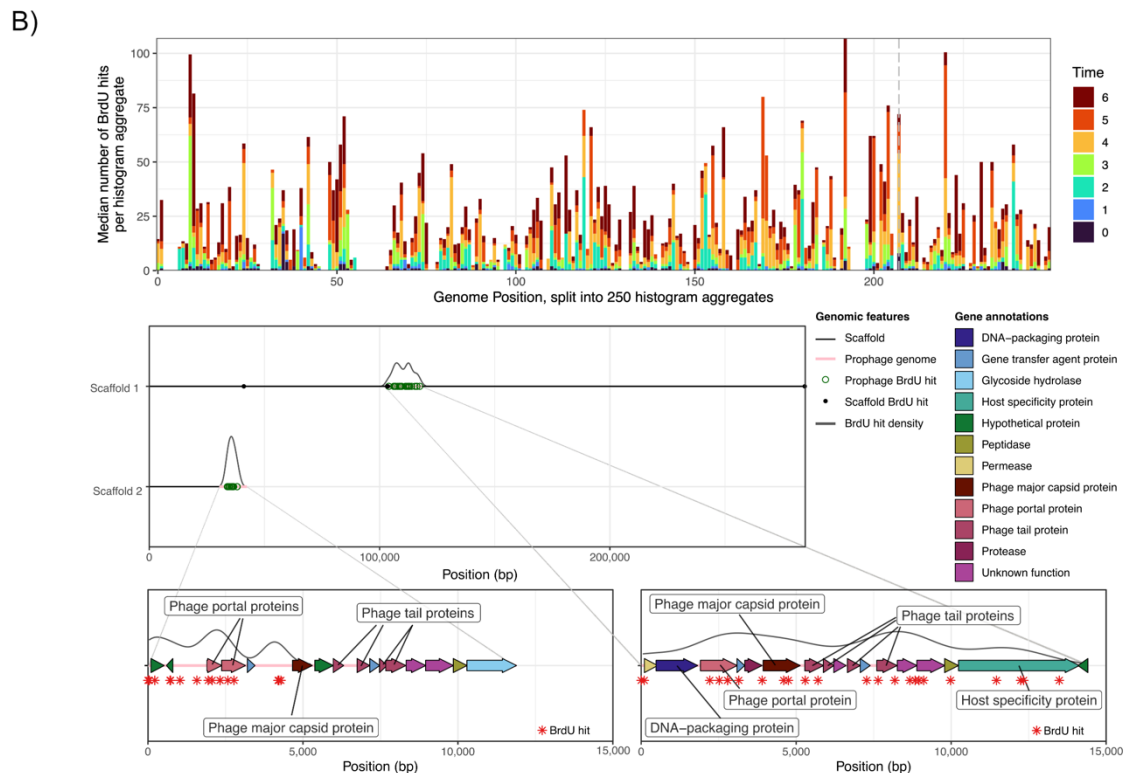
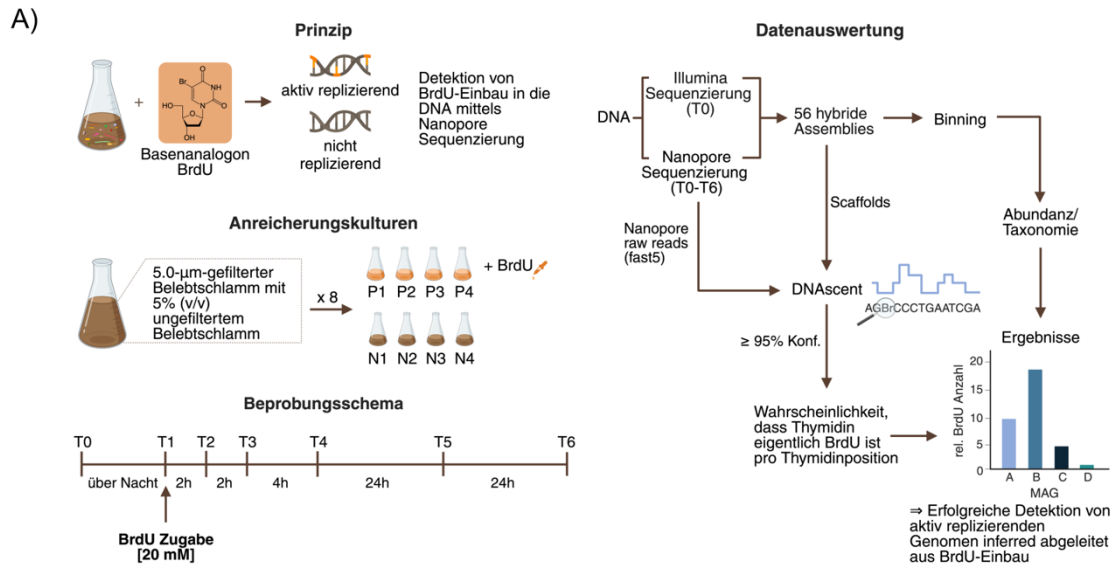


Abbildung 2: Aktivitätsbasierten Metagenomik. A) Experimenteller Aufbau des Konzeptnachweises. Nach BrdU-Zugabe wurde zu mehreren Zeitpunkten Biomasse der Anreicherungskulturen entnommen und mittels ONT sequenziert. Zur Verbesserung der MAGs wurden hybride Assemblierungen mit Illumina reads vorgenommen. B) Nachweis von BrdU-Einbau in das metagenom-assemblierte Genom eines Deltaproteobakteriums (oben) und ein Prophagengenom (unten). Abbildung aus Simon et. al, 2025 [16].

Insgesamt führten die Zielvorgaben des Arbeitspakets 2.3 zu einem weitaus höheren Nutzen als ursprünglich vorgesehen (siehe auch Publikationen).

b) AP 3.2 Omics-unterstützte Anreicherung und Kultivierung

Ursprüngliches Ziel des Arbeitspaketes für den Projektpartner UDE: Durch Omics-Technologien sollte im Vorfeld der Kultivierung das genetische Potential der jeweiligen mikrobiellen Gemeinschaften kultivierungsunabhängig untersucht werden. Für die Projektpartner UOL, DLR und TZW wurden Illumina-Metagenome zentral über die UDE mit der Firma CeGaT/Tübingen (Aufträge an Dritte) erzeugt. Dies umfasste die DNA-Sequenzierung durch CeGaT, Read-QC, Assemblierung und Annotation der Datensätze durch den Projektpartner UDE. Durch diesen abgestimmten Prozess war eine konsistente und einheitliche Datengrundlage über alle Teilprojekte hinweg gewährleistet.

c) AP 3.3 Meta-Daten-basierte Anreicherung- und Kultivierung

Ursprüngliches Projektziel: Bestimmung abiotischer, physikochemischer Parameter der Ökosysteme, um die genauen Anreicherungs- und Kultivierungsbedingungen für den Reaktorbetrieb zu kennen. Für Geysir Andernach liegen umfassende Messergebnisse vor, daher waren die für uns notwendigen Parameter, die auch wichtig für die Reaktorkonzeptionierung bereits bekannt. Die Daten wurden in einem Zeitraum von 100 Jahren zwischen 1904 und 2004 orientierend der Trinkwasserverordnung (TrinwV-GW) erhoben [2]. Bei einer möglichen Probenahme mit MultiKulti-Bioreaktor wäre die Aktualität dieser Messwerte stichprobenhaft kontrolliert worden.

d) AP 3.4 Systematische und innovative Anreicherungs- und Kultivierungsansätze

Ursprüngliches Ziel des Arbeitspaketes für den Projektpartner UDE: Sequenzierung, Assemblierung und Annotation aller Anreicherungskulturen oder Reinkulturen aller Arbeitsgruppen an der UDE. Die vorgesehenen Sequenzierungen des Arbeitspakets waren im Rahmen des Gesamtvorhabens deutlich weniger nötig, da durch die verspätete Reaktorfertigstellung kaum Kulturen sequenziert werden konnten. Für den Projektpartner UOL wurden Anreicherungskulturen sequenziert.

e) AP 4.4: Kultivierung und Ökophysiologie von *Altiarchaeota*

Ursprüngliches Ziel: Anreicherung und Kultivieren von *Altiarchaeota* unter Hochdruck im Multikulti-Bioreaktor. Grundwasser aus Geysir Andernach, dessen Mikrobiom von *Altiarchaeota* dominiert wird (~70%), sollte direkt in den Reaktor geleitet werden, um Temperatur und Druck aufrecht zu erhalten [2]. Auf Grund von Verzögerungen im Reaktorbau und der einhergehenden verspäteten Fertigstellung, konnte keine Probenahme und entsprechend keine Kultivierungsversuche gemacht werden. Im Antrag wurde die Hypothese aufgestellt, dass *Altiarchaeota* zwingend hohen Druck benötigen,

da vorherige Kultivierungsversuche mit Serumflaschen (gängige Serumflaschen können nur einem Überdruck von 1.5 bar standhalten) keinen Erfolg hatten. Im Projektverlauf wurden daher keine weiteren Kultivierungsversuche ohne den für dieses Arbeitspaket unerlässlichen Reaktor angestellt. Eine erfolgreiche Kultivierung von Altiarchaeota durch Dritte im Laufe des Projektzeitraums ist nicht bekannt.

Erkenntnisgewinne bezüglich der Ökophysiologie von *Altiarchaeota* konnten dennoch durch Metagenomik erreicht werden. Altiarchaeota gehören zu den besser erforschten nicht-kultivierten Archaeen, jedoch beruhten alle Studien bisher auf fragmentierten Genomen, mittels short-read-Sequenzierungen, dem bisherigen Goldstandard in der Metagenomik, ist es sehr schwierig geschlossene Genome zu rekonstruieren. Durch die Anwendung von ONT *long-read*-Sequenzierungen konnten im Laufe des Projekts *Altiarchaeota* Genome aus sechs verschiedenen Ökosystemen verbessert werden. Dabei wurden mit *Altiarchaeum pausaniensis* ein neues Genus und mit *Cryptoaltiarchaeum carolinensis* auch ein neues Genus bzw. eine neue Familie innerhalb der Altiarchaeota nachgewiesen (Abbildung 3).

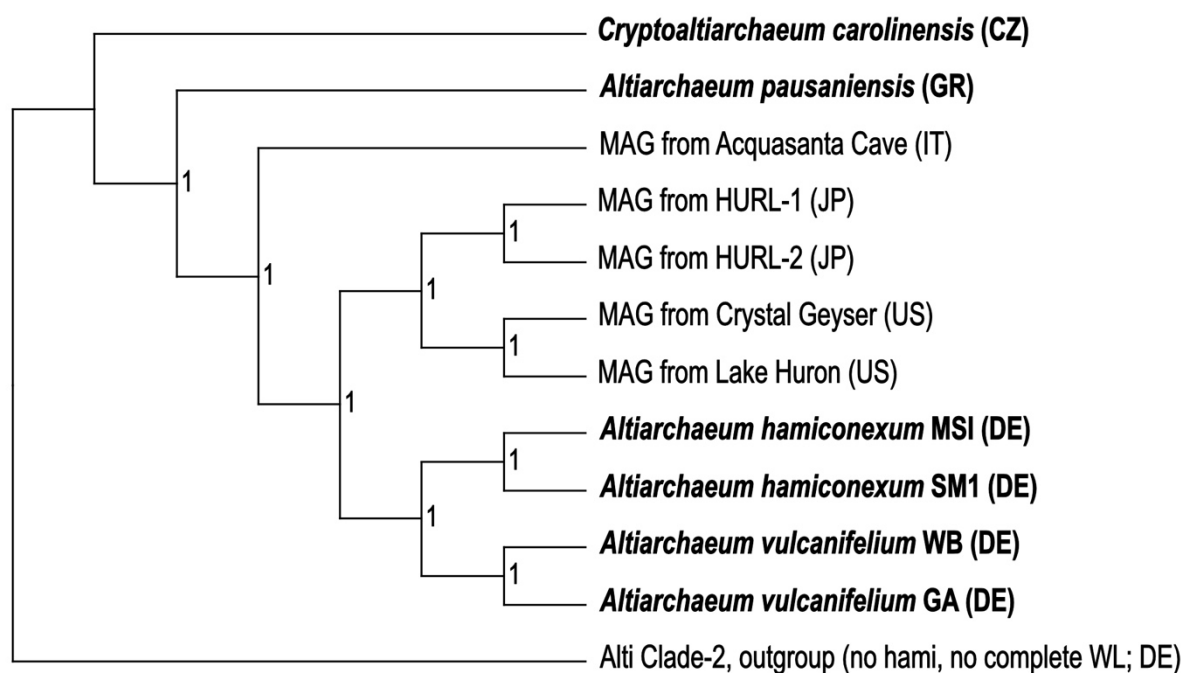


Abbildung 3: Phylogenie der Altiarchaeales basierend auf 53 archaeellen Markergenen. Die Genome, die in fett geschriebenen Spezies, wurden innerhalb des Projekts Multikulti rekonstruiert. Phylogenomische Analyse wurde durchgeführt mit WhereDoGGo (Kolyfetis & Adam, 2024; <https://github.com/MEDEALab/WhereDoGGo>).

Eine valide Publikation dieser Namen anhand des SeqCodes [17] ist noch ausstehend befindet sich aber gerade in Arbeit. Aus dem Zielökosystem, Geysir Andernach, konnte sowohl das erste geschlossene Altiarchaeum-Genom rekonstruiert werden als auch elektronenmikroskopisch die Zellmorphologie bestimmt werden. Am Ökosystem Mühlbacher Schwefelquelle (MSI; Regensburg) wurde die in AP 2.3 etablierte Metagenomik mit geringem DNA-Input angewandt, um die hohe Stammheterogenität in

den dort von *Altiarchaeum hamiconexum* ausgebildeten Biofilmen zu reduzieren. Die Präsenz mehrerer verschiedener Stämme der gleichen Spezies in einer Probe erschwert gute Assemblierungen, durch die Mikrohabitat-spezifische Sequenzierung einzelner Biofilmflocken konnte das bisher beste Genom von *Altiarchaeum hamiconexum* MSI rekonstruiert werden.

f) AP 5.2. Öffentlichkeitsarbeit und wissenschaftlicher Austausch

Öffentlichkeitsarbeit und wissenschaftlicher Austausch war Ziel aller Projektpartner des Verbundprojekts und wurde umgesetzt durch z.B. eine regelmäßige Webinarreihe zum Thema Kultivierung.

Insbesondere die Fortschritte im Bereich der ONT *long-read* Sequenzierung, wurde fortlaufend während des Projekts bereits mit anderen Wissenschaftler*innen geteilt. Zum Wissenstransfer und für gemeinsame ONT-Sequenzierungen wurde mit Wissenschaftler*innen folgender Arbeitsgruppen zusammengearbeitet:

1. Prof. Dr. Cara Magnabosco
Geobiologie, Departement Erd- und Planetenwissenschaften
ETH Zürich
Schweiz
2. Prof. Dr. Carlos Bezuidenhout
Unit for Environmental Sciences and Management, Microbiology,
North-West University
Südafrika
3. Prof. Dr. Ivan Berg
Diversität des mikrobiellen Stoffwechsels
Universität Münster
Deutschland
4. Prof. Dr. Fritz Titgemeyer
Fachbereich Oecotrophologie, Facility Management
Labor für Lebensmittelmikrobiologie und Betriebshygiene
FH Münster
Deutschland
5. Prof. Dr. Dirk Schulze-Makuch
Zentrum für Astronomie und Astrophysik (ZAA)
Technische Universität Berlin
Deutschland

Während des Projektzeitraums wurden zudem zwei Schülerpraktikanten im Rahmen kurzer „Schnupperpraktika“ betreut und konnten so erste Erfahrungen in einem naturwissenschaftlichen Labor sammeln.

(2) die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Fördermittel wurden gemäß dem genehmigten Finanzierungsplan verwendet. Die größten Ausgabepositionen entfielen auf

Personal (E13): 142.653,43 €

Verbrauchsmaterialien/sonstige allgemeine Verwaltungsausgaben: 112.889,70 €

Vergabe von Aufträge an Dritte: 44,037.46 €

Sämtliche Mittelverwendungen sind im zahlenmäßigen Nachweis belegt. Genehmigte Änderungen am Finanzierungsplan im Rahmen der kostenneutralen Verlängerung betrafen hauptsächlich die Positionen Personal (E13) und Dienstreisen, begründet durch Mutterschutz/Elternzeit der wissenschaftlichen Mitarbeiterin angestellt auf MultiKulti.

(3) die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Alle durchgeführten Arbeiten waren notwendig, um die im Förderantrag definierten Ziele zu erreichen. Die eingesetzten Ressourcen und Methoden erwiesen sich als angemessen. MultiKulti verfolgte einen sehr innovativen Ansatz mit dem Bau eines modularen und transportablen Reaktors und eine moderne Kombination aus klassischer Mikrobiologie, Bioinformatik und Bioverfahrenstechnik.

Der Reaktorbau wurde durch anhaltende externe Rahmenbedingungen, wie die COVID-19-Pandemie oder den Krieg Russlands in der Ukraine, geprägt. Beides führte während Teile der Projektlaufzeit zu eingeschränkter Warenverfügbarkeit und verlängerten Beschaffungszeiten. Die nicht rechtzeitige Fertigstellung des MultiKulti-Bioreaktors erschwerte die Erreichung der Projektziele erheblich. Dennoch ermöglichte die Finanzierung des Teilprojekts wesentliche methodische Erkenntnisse hinsichtlich *long-read* Metagenomik, als auch weitere genom-zentrische Perspektiven zum Zielorganismus *Altiarchaeum*.

(4) der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Wie im Antrag angekündigt bestehen für die Teilprojekte der UDE keine wirtschaftlichen Verwertungspläne. Die Verwertbarkeit hinsichtlich Publikationen ist wie im Antrag beschrieben bereits in drei peer-reviewten Journalen erfolgt, wobei eine weitere Veröffentlichung in Planung ist. In dieser Veröffentlichung planen wir die Arten von *Altiarchaeales* mit qualitativ hochwertigen Genome dank long-read Sequenzierung mittels des SeqCodes valide zu beschreiben.

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

Während der Projektlaufzeit wurden enorme Entwicklungsschritte im Bereich der ONT Metagenomik gemacht, insbesondere durch Produktweiterentwicklungen durch den Hersteller ONT selbst. Im Projektzeitraum wurden sowohl neue FlowCells, verbesserte Enzyme und Nanoporen, als auch verbesserte Basecalling-Algorithmen veröffentlicht. Die Kombination daraus ermöglicht deutlich verbesserte Genomrekonstruktionen und 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierungen mit Spezies-Level-Diskriminierung als vor Projektbeginn möglich war [9, 12, 18, 19]. Eine AI-basierte Methode zur Diskriminierung von lebenden und toten mikrobiellen Zellen unter Nutzung der ONT-Rohdaten wurde kürzlich veröffentlicht [20], jedoch ist die Möglichkeit zur Anwendung jener auf komplexe mikrobielle Gemeinschaften noch unklar. Die vorliegenden Forschungsergebnisse zu diesem Ansatz der *viability-resolved* Metagenomik verfolgt zwar ein anderes Kernziel als die hier gezeigten Arbeiten zur aktivitäts-basierten Metagenomik, doch ergänzen sie diese, indem sie eine komplementäre Perspektive auf die toten, lebenden oder tatsächlich aktiven prokaryotischen Zellen einer mikrobieller Gemeinschaften eröffnen. Zudem ist der Ansatz die ONT-Rohdaten zu nutzen eleganter, da BrdU als DNA-Basenalogon mutagen wirkt. Hier zeigt sich Potential für künftige Weiterentwicklungen der aktivitäts-basierten Metagenomik.

(6) die erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF

Die Projektergebnisse wurden bzw. werden in wissenschaftlichen Fachzeitschriften, Konferenzbeiträgen und öffentlichen Datenbanken publiziert. Alle Veröffentlichungen erfolgten gemäß Nr. 5 der NKBF/NABF unter Nennung des Förderkennzeichens 161L0285E.

Nachfolgende Publikationen sind in peer-reviewten Fachzeitschriften erschienen:

Gemeinsame Veröffentlichung mit dem gesamten MultiKulti-Konsortium und weiteren Fachexperten über die Bedeutung von Kultivierung im „Omics-Zeitalter“, die Review bietet ein Kompendium über besonders wichtige (zB auf Grund ihrer Rolle in biogeochemischen Stoffkreisläufen) bisher unkultivierte Prokaryoten und eine ingenieurwissenschaftliche Perspektive über den Bioreaktorbau:

Simon, S.A., Aschmann, V., Behrendt, A., Hügler, M., Engl, L.M., Pohner, 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 Publikationen sind dem Arbeitspaket 2.3 zuzuschreiben, in dessen Rahmen die Sequenzierung mittels Sequenzierern von Oxford Nanopore Technologies über die Amplikon-basiertes Live Sequenzierung hinaus noch weiterentwickelt wurde:

Simon, S.A., Soares, A.R., Bornemann, T.L.V., Lange, A., Griesdorn, L., Fuentes, A., Dieckmann, M., Krok, B.A., Ruff, S.E., Hügler, M., Moraru, C., Probst, A.J., 2025. Inferring replication states of bacteria and viruses in enrichment cultures via long-read sequencing. ISME Communications 5, ycaf041. <https://doi.org/10.1093/ismeco/ycaf041>

Simon, S.A., Schmidt, K., Griesdorn, L., Soares, A.R., Bornemann, T.L.V., Probst, A.J., 2023. Dancing the Nanopore limbo – Nanopore metagenomics from small DNA quantities for bacterial genome reconstruction. BMC Genomics 24, 727. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09853-w>

Über Zielorganismen des Phylums *Candidatus* Altiarchaeota wird derzeit eine vierte Publikation angefertigt (AP 4.4), die in den kommenden Wochen bei einem peer-reviewten Journal eingereicht und als Pre-Print vorabveröffentlicht wird.

Die Forschungsergebnisse wurden ebenso auf (inter)nationalen Konferenzen in Form von Postern oder Vorträgen präsentiert:

Poster

ISME18 | International Symposium on Microbial Ecology (2022) - Lausanne, Schweiz

Simon, S. A., Bornemann, T. L. V.; Plewka, J.; Figueroa-Gonzalez, P. A.; Griesdorn, L.; Eßer S. P.; Soares, A. R. & Probst, A. J.: “A complete and circularized genome from Nanopore metagenomics sheds light onto population genomics of a highly abundant carbon fixer in Earth’s crust“

London Calling (2023) - London, UK

Simon, S. A., Schmidt, K., Griesdorn, L., Soares, A. R., Bornemann, T. L. V. & Probst, A. J.: “Dancing the Nanopore Limbo: Low DNA input for successful microbial metagenomics with Oxford Nanopore Technologies“

FEMS2023 | Congress of European microbiologists (2023) - Hamburg, Deutschland

Simon, S. A., Schmidt, K., Griesdorn, L., Soares, A. R., Bornemann, T. L. V. & Probst, A. J.: “Dancing the Nanopore Limbo: Bacterial genome reconstruction from small DNA quantities using Nanopore long-read metagenomics“

VAAM 2023 | Jahrestagung Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (2023) - Göttingen, Deutschland

Simon, S. A., Bornemann, T. L. V.; Plewka, J.; Figueroa-Gonzalez, P. A.; Griesdorn, L.; Geydirici, I.; Soares, A. R. & Probst, A. J.: “Unveiling the ecophysiology and genome

complexity of Candidatus Altiarchaeum with high-quality genome recovery via Nanopore sequencing”

Vorträge

Treffen der VAAM Fachgruppe Qualitätsmanagement - Kaarst, Deutschland, 2023

Simon, S. A.: “Von Bytes zu Bakterien: Detektion von Mikroorganismen mittels Nanopore Sequencings”

Aseptikon 2024, 15. Deutsche Mikrobiologie- und Hygienekonferenz - Mannheim, Deutschland

Simon, S. A.: “Von den Grundlagen zur Anwendung - Nanopore Sequenzierung im Kontext von One Health”

Planetary Protection: Metagenomics in spaceflight workshop - virtuell, 2024

Simon, S. A.: “Low-biomass Nanopore metagenomics”

17th International Congress Thermophiles 2025 - Münster, Deutschland

Simon, S. A.; Bornemann, T. L. V.; Griesdorn, L.; Zhang, P.; Plewka, J.; Banas, I.; Eßer S. P.; Geydirici, I.; Dieckmann, M.; Soares, A. R.; Kaur, K. P.; Adam, P. S.; Smrhova, T.; Strejcek, M.; Uhlik, O. & Probst, A. J.: “Dropped it like it’s hot: Proposal of a thermophilic ancestry of Altiarchaeum”

VBIO Summerschool “Bakterien”, Köln, Deutschland, 2025

Archaeen statt Bakterien: Metagenomische Spurensuche im Kaltwassergeysir

Darüber hinaus hat das MultiKulti im Allgemeinen zu folgenden Veröffentlichungen beigetragen, die sich mit Altiarchaeum oder aquatischen Ökosystemen beschäftigen:

Esser, S.P., Rahlff, J., Zhao, W., Predl, M., Plewka, J., Sures, K., Wimmer, F., Lee, J., Adam, P.S., McGonigle, J., Turzynski, V., Banas, I., Schwank, K., Krupovic, M., Bornemann, T.L.V., Figueroa-Gonzalez, P.A., Jarett, J., Rattei, T., Amano, Y., Blaby, I.K., Cheng, J.-F., Brazelton, W.J., Beisel, C.L., Woyke, T., Zhang, Y., Probst, A.J., 2023. A predicted CRISPR-mediated symbiosis between uncultivated archaea. *Nat Microbiol* 8, 1619–1633.
<https://doi.org/10.1038/s41564-023-01439-2>

Eine weitere Publikation über Viren des bakteriellen Phylums *Nitrospirota* ist in Bearbeitung und wird zeitnah veröffentlicht. In Kooperation mit der RAG-Aktiengesellschaft (ehemals Ruhrkohle AG) wurden dazu in Bochum an den „Harpener

Teiche“ und der Zeche „Friedlicher Nachbar“ aquatische Biofilme beprobt. Diese wurden metagenomisch auf deren prokaryotische und virale Gemeinschaft hin analysiert.

Literaturverzeichnis

1. Probst AJ, Ladd B, Jarett JK, Geller-McGrath DE, Sieber CMK, Emerson JB, et al. Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. *Nat Microbiol.* 2018;3:328–36. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0098-y>.
2. Bornemann TLV, Adam PS, Turzynski V, Schreiber U, Figueroa-Gonzalez PA, Rahlff J, et al. Genetic diversity in terrestrial subsurface ecosystems impacted by geological degassing. *Nat Commun.* 2022;13:284. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27783-7>.
3. Nygaard AB, Tunsjø HS, Meisal R, Charnock C. A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *Sci Rep.* 2020;10:3209. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59771-0>.
4. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong B-Y, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun.* 2019;10:5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>.
5. Rodríguez-Pérez H, Ciuffreda L, Flores C. NanoCLUST: a species-level analysis of 16S rRNA nanopore sequencing data. *Bioinformatics.* 2020;:btaa900. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa900>.
6. Cross KL, Campbell JH, Balachandran M, Campbell AG, Cooper CJ, Griffen A, et al. Targeted isolation and cultivation of uncultivated bacteria by reverse genomics. *Nat Biotechnol.* 2019;37:1314–21. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0260-6>.
7. Minei R, Hoshina R, Ogura A. De novo assembly of middle-sized genome using MinION and Illumina sequencers. *BMC Genomics.* 2018;19:700. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5067-1>.
8. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol.* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>.
9. Sereika M, Kirkegaard RH, Karst SM, Michaelsen TY, Sørensen EA, Wollenberg RD, et al. Oxford Nanopore R10.4 long-read sequencing enables the generation of near-finished bacterial genomes from pure cultures and metagenomes without short-read or reference polishing. *Nat Methods.* 2022;19:823–6. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01539-7>.

10. Moss EL, Maghini DG, Bhatt AS. Complete, closed bacterial genomes from microbiomes using nanopore sequencing. *Nat Biotechnol.* 2020;38:701–7. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0422-6>.
11. Sereika M, Petriglieri F, Jensen TBN, Sannikov A, Hoppe M, Nielsen PH, et al. Closed genomes uncover a saltwater species of *Candidatus Electronema* and shed new light on the boundary between marine and freshwater cable bacteria. preprint. *Microbiology*; 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.10.26.513921>.
12. Sereika M, Mussig AJ, Jiang C, Knudsen KS, Jensen TBN, Petriglieri F, et al. Genome-resolved long-read sequencing expands known microbial diversity across terrestrial habitats. *Nat Microbiol.* 2025. <https://doi.org/10.1038/s41564-025-02062-z>.
13. Cusco A, Perez D, Viñes J, Francino O. Long-Read Metagenomics to Retrieve High-Quality Metagenome-Assembled Genomes from Canine Feces. preprint. In Review; 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-60068/v1>.
14. Simon SA, Schmidt K, Griesdorn L, Soares AR, Bornemann TLV, Probst AJ. Dancing the Nanopore limbo – Nanopore metagenomics from small DNA quantities for bacterial genome reconstruction. *BMC Genomics.* 2023;24:727. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09853-w>.
15. Boemo MA. DNAscent v2: detecting replication forks in nanopore sequencing data with deep learning. *BMC Genomics.* 2021;22:430. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07736-6>.
16. Simon SA, Soares AR, Bornemann TLV, Lange A, Griesdorn L, Fuentes A, et al. Inferring replication states of bacteria and viruses in enrichment cultures via long-read sequencing. *ISME Commun.* 2025;5:ycaf041. <https://doi.org/10.1093/ismeco/ycaf041>.
17. Hedlund BP, Chuvochina M, Hugenholtz P, Konstantinidis KT, Murray AE, Palmer M, et al. SeqCode: a nomenclatural code for prokaryotes described from sequence data. *Nat Microbiol.* 2022;7:1702–8. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01214-9>.
18. Burian J, Boer RE, Hernandez Y, Morales-Amador A, Jiang L, Bhattacharjee A, et al. Bioactive molecules unearthed by terabase-scale long-read sequencing of a soil metagenome. *Nat Biotechnol.* 2025;:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41587-025-02810-w>.
19. Zhao W, Zeng W, Pang B, Luo M, Peng Y, Xu J, et al. Oxford nanopore long-read sequencing enables the generation of complete bacterial and plasmid genomes without short-read sequencing. *Front Microbiol.* 2023;14:1179966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1179966>.

20. Ürel H, Benassou S, Marti H, Reska T, Sauerborn E, Pinheiro Alves De Souza Y, et al. Nanopore- and AI-empowered microbial viability inference. *GigaScience*. 2025;14:giaf100. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaf100>.