

Tiefe Biosphäre

Zusammen in Dunkelheit – mikrobielle Interaktionen in der Erdkruste

ALEXANDER J. PROBST

AQUATISCHE MIKROBIELLE ÖKOLOGIE, UMWELTMIKROBIOLOGIE UND BIOTECHNOLOGIE, FAKULTÄT FÜR CHEMIE, UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN

VAAM-Forschungspreis 2020

The terrestrial subsurface houses about one third of Earth's bacteria and archaea, yet little is known about ecosystem structure and interaction of microorganisms in the deep biosphere. In recent studies we tackled this knowledge gap by using cold-water geysers as model systems with high microbial activity. Scavenging biomolecules by symbiotic Archaea and Bacteria functions as a carbon sink in these ecosystems and creates complex nutrient networks that we are only at the beginning of understanding.

DOI: 10.1007/s12268-020-1382-6

© Der Autor 2020

■ Etwa 70 Prozent der Mikroorganismen unseres Planeten leben im Untergrund der Meere und Kontinente, ohne den Einfluss von Licht und meist bei minimalem Nährstoffangebot. Zu Recht bezeichnete Kelly Wrighton 2012 die tiefe Biosphäre der Kontinente als „*Final Frontier*“. Sie bezog sich dabei auf die große Diversität an unerforschten Mikroorganismen in den tiefen kontinentalen Ökosystemen und ihre schwere Zugänglichkeit für die Forschung. In der Tat kann ein einziges Ökosystem des terrestrischen Untergrunds fast alle genomisch bekannten bakteriellen Phyla enthalten [1]. Die meisten der Organismen, die in der tiefen Biosphäre gefunden werden, sind wenig verwandt zu verfügbaren Stämmen in unseren Kulturensammlungen, und ihr genetisches Repertoire beginnen wir erst durch die Verfügbarkeit von Umweltgenomik im Ansatz zu verstehen.

Kalte, gasgetriebene Geysire als hot spots der tiefen Biosphäre

Im Vergleich zu Biotopen (nahe) der Erdoberfläche sind jene des Untergrunds nur schwer zugänglich. Zwar öffnen Bohrungen auch immer Zugänge zu neuen Proben, aber dabei werden Sedimente sehr leicht kontami-

niert, sodass eine gute Kontaminationskontrolle notwendig ist. Heiße oder kalte Geysire hingegen bringen durchgehend Grundwasser mit Mikroorganismen zutage, die leicht mittels Filtration aus den Systemen gewonnen werden können. Gerade kalte, gasgetriebene Geysire stellen ein hervorragendes Fenster in die tiefe Biosphäre dar und beinhalten Tausende verschiedener Mikroben [2] aus mehr als 100 verschiedenen Phyla [3]. Kalte Geysire sind in der Regel durch große Mengen von CO₂ getrieben, die entweder durch Entgasung aus Magma (z. B. direkt aus dem Mantel) oder den Abbau von Kalkstein entstehen (Abb. 1A). Beide Arten der Entgasung bestehen fast ausschließlich aus CO₂ (über 99 Prozent), jedoch enthalten die Gase aus Magma oft auch andere Gase wie Wasserstoff und Schwefelwasserstoff. Diese Kombination von Gasen stellt unter anderem die Nahrungsgrundlage für chemolithoautotrophe Mikroorganismen dar.

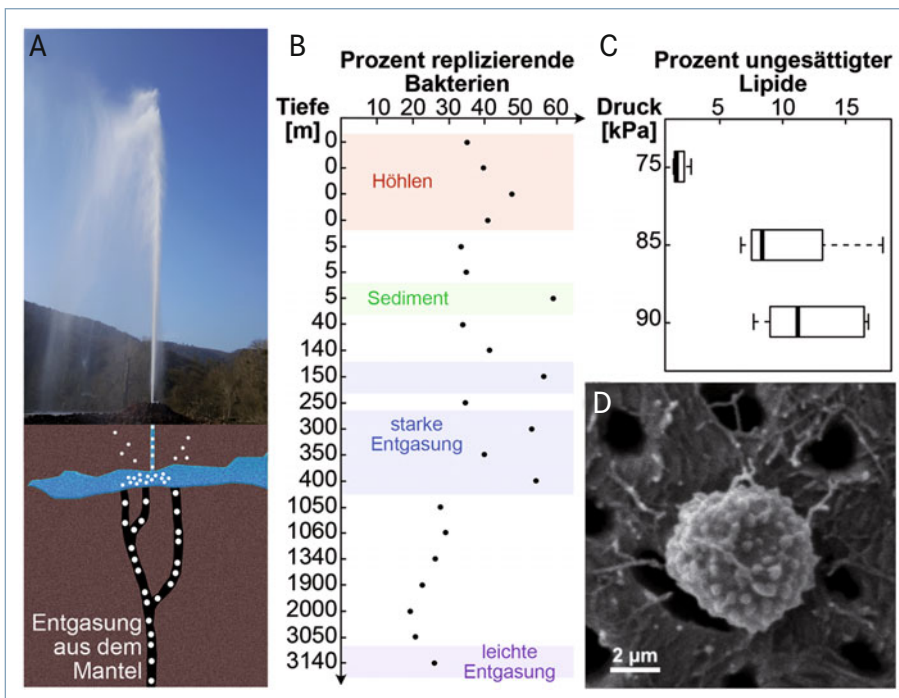
In der Tat kann eine komplexe Biozönose in solchen Ökosystemen alleine durch CO₂-Fixierung aufrechterhalten werden, was auf die Existenz einer Nahrungskette im Untergrund hindeutet [2]. Wie aktiv Biozönosen jedoch im Untergrund sind, blieb lange eine offene Frage. Da RNA-Extraktionen von Pro-

ben aus dem Untergrund aufgrund der geringen Biomasse meist nicht erfolgreich sind, benutzen wir einen bioinformatischen Ansatz, um die Aktivität von Bakterien im Untergrund abzuschätzen [4]. Dieser beruht auf dem Verhältnis der DNA-Menge am Replikationsursprung eines bakteriellen Chromosoms im Vergleich zum Replikationsterminus. Dabei kann in Metagenomen abgeschätzt werden, welcher Prozentsatz an Organismen in einer Spezies gerade aktiv ihr Genom replizieren.

Wir zogen den Vergleich von Grundwasser- und Sedimentproben heran, da hier bekannt ist, dass Sedimente viel aktivere Organismen enthalten als das Grundwasser, und konnten somit die Gültigkeit dieses Ansatzes positiv bewerten. Für über 17 verschiedene Grundwasserökosysteme von 0 m Tiefe (Höhlen) bis 3,2 km Tiefe konnten wir zeigen, dass die bakterielle Replikation im Schnitt zwischen 19 und 56 Prozent (aktive Population) variiert und mit der Tiefe der Ökosysteme linear abnimmt (Abb. 1B). Eine Ausnahme von dieser Regel stellte jedoch das Grundwasser von kalten, gasgetriebenen Geysiren dar, das Bakterien mit einer hohen vorhergesagten Aktivität beinhaltet [4].

Anpassung der Mikroorganismen an hohen CO₂-Partialdruck

Obwohl allgemein der Metabolismus der Chemolithoautotrophie in der tiefen Biosphäre relativ gut konserviert zu sein scheint [4], weisen Organismen in kalten, gasgetriebenen Geysiren spezifische Anpassungen auf. Je tiefer der Ursprung des Grundwassers und damit je höher der *in situ*-Gasdruck ist, desto mehr ungesättigte Lipide enthalten diese Bakterien (Abb. 1C, [2]). Dies ist wahrscheinlich eine Anpassung von Mikroorganismen, um die Membranfluidität aufrechtzuerhalten. Je nach Verfügbarkeit von Sauerstoff betreiben Mikroorganismen unterschiedliche CO₂-Fixierungswege im CO₂-reichen Grundwasser: Im aeroben Milieu findet man vor allem den kostspieligen Calvin-Benson-Bassham-Zyklus, während unter mikroaeroben Bedingungen der reverse Citratzyklus vorherrscht



▲ **Abb. 1:** **A**, Foto des Geysirs Andernach und schematische Darstellung des Austritts des Mantelgases in den Grundwasserleiter (unten) [4]. **B**, Genomreplikationsraten von Bakterien in Grundwasserökosystemen verschiedener Tiefe [4]. Entgasung führt im Grundwasser zu ähnlicher Aktivität wie in normalen Sedimenten oder oberflächennahen Gebieten. **C**, Anstieg von ungesättigten Lipiden (6–15 Doppelbindungen) mit der Druckzunahme im Geysir, dargestellt in einem Boxplot-Diagramm [2]. **D**, Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Candidatus Altiarchaeum CG* aus einem kalten Geysir.

[3]. Unter anaeroben Bedingungen dominiert der effizienteste bekannte CO_2 -Fixierungsweg (Wood-Ljungdahl-Weg), vor allem in Archaeen [3, 4]. Diese unkultivierten Archaeen gehören zum Phylum der Altiarchaeota [3] und sind nahe mit *Altiarchaeum hamiconexum* (**Abb. 1D**, [5]) verwandt [4].

Zusammenspiel von Physiologie und Biogeographie der Altiarchaeota

Mikroorganismen des Phylums Altiarchaeota sind relativ weit in marinen Sedimenten und im terrestrischen Untergrund verbreitet [6] und werden in zwei große Klade eingeteilt: Alti-1 und Alti-2. Während Organismen der Gruppe Alti-2 metabolisch etwas vielfältiger sind, wurden sie bisher nur in geringer Zahl in verschiedenen Ökosystemen entdeckt. Alti-1-Archaeen sind weniger weit verbreitet, jedoch dominieren sie in der Regel ihr Ökosystem [5]. Wie diese Organismen ihre Energie gewinnen, ist noch relativ unbekannt; Kohlenstoffisotopenanalysen, gekoppelt mit Metagenomik, wiesen aber eindeutig eine Autotrophie der Organismen nach [3, 5]. Neben der Funktion als Primärproduzent in ihren Ökosystemen beeindruckt Alti-1-Organismen durch Enterhaken-ähnliche Zel-

lanhänge, die in den Genomen dieser Klade allgemein genetisch codiert sind [4]. Dadurch können diese Organismen relativ reine Biofilme in den Ökosystemen bilden und hinsichtlich ihrer Ökophysiologie studiert werden [5].

Bekannte Organismen der Gruppe Alti-1 sind (basierend auf 16S-rRNA-Gen-Analysen und durchschnittlicher Nukleotididentität) relativ nah verwandt, sodass sie nach momentanem Stand der Forschung zur selben Gattung gehören [4]. Interessanterweise nimmt die durchschnittliche Nukleotididentität mit geographischer Distanz zu, eine Beobachtung, die auch phylogenomische Analysen bestätigten. Wir gehen davon aus, dass die Enterhaken Alti-1-Archaeen im Ökosystem verankern, sie somit wenig verbreitet werden und deswegen die Veränderung der Geographie der Ökosysteme gut widerspiegeln [4].

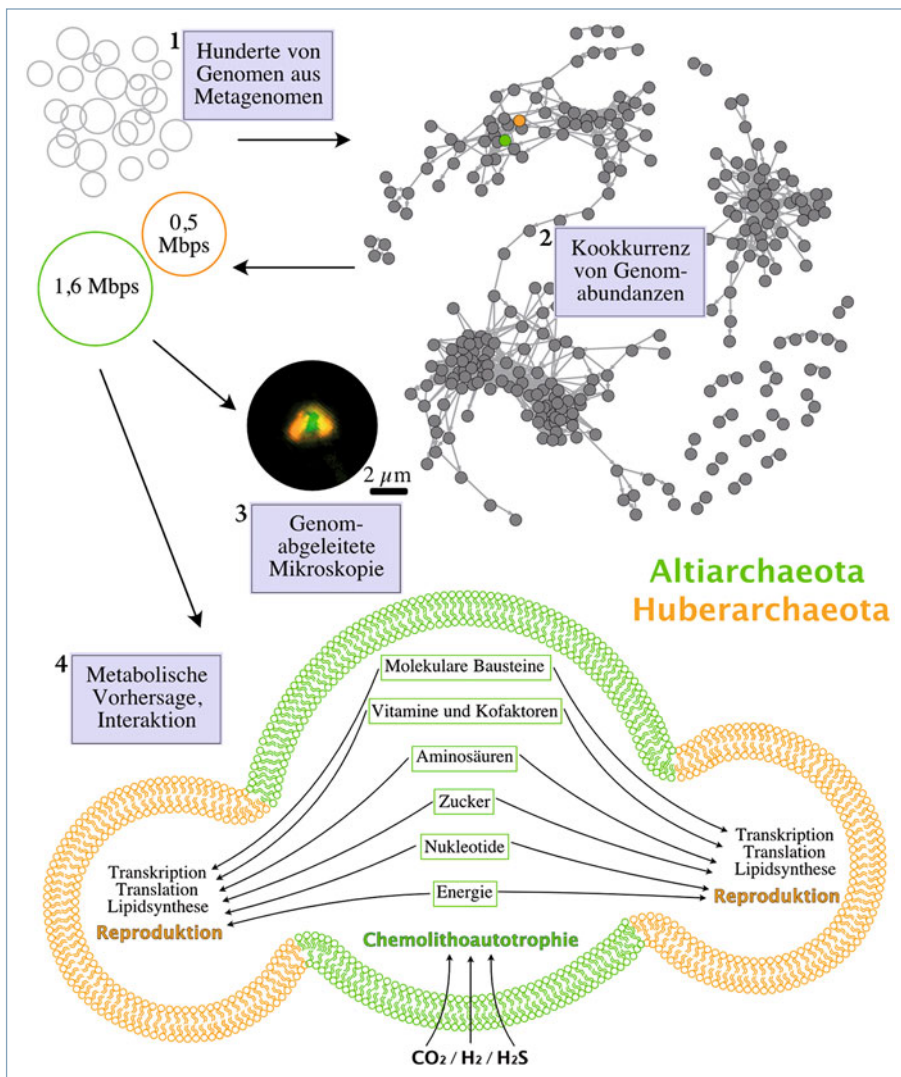
Symbionten von Altiarchaeota in der tiefen Biosphäre

Als dominante Primärproduzenten nehmen Altiarchaeota eine natürliche Schlüsselfunktion innerhalb ihrer Ökosysteme ein. Da diese Organismen den größten Teil an organi-

chem Kohlenstoff bereitstellen [2], folgten wir der Hypothese, dass diese Organismen direkt mit anderen Mikroorganismen interagieren. Eine Netzwerkanalyse von 67 Metagenomen über sechs Jahre hinweg (**Abb. 2**, [7]) und elektronenmikroskopische Aufnahmen [3] lieferten erste Hinweise, dass Organismen des unkultivierten Phylums Huberarchaeota (*Huberarchaeum crystalense*, benannt nach Robert Huber, dem Entdecker der Altiarchaeota) Symbionten von Altiarchaeota in einem Kaltwassergeysir sein könnten. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), basierend auf 16S-rRNA-Genen der beiden Organismen, lieferten den finalen Beweis (**Abb. 2**), dass Huberarchaeota direkt mit Altiarchaeota als Episymbionten interagieren [7]. Metabolische Rekonstruktion von *Huberarchaeum crystalense* zeigen einen minimalen Metabolismus und das Fehlen der Kapazität, Aminosäuren oder Nukleotide zu synthetisieren. Ribosomen sowie die Möglichkeit zur Synthese von DNA und RNA aus Nucleotiden sowie Enzyme zur Synthese von Lipiden aus Isopentenylpyrophosphat sind jedoch in *H. crystalense* vorhanden. Vermutlich stellt *Altiarchaeum* als Wirt dieser Archaeen viele molekulare Bausteine zur Verfügung (**Abb. 2**, [7]), was sehr stark an die Beziehung von *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* [8] erinnert. Interessanterweise benötigt *H. crystalense*, basierend auf metabolischen Vorhersagen, reduziertes Ferredoxin, das es nur von seinem Wirt *Altiarchaeum* erhalten kann. Ähnlich wie bei *I. hospitalis* und *N. equitans* könnte der Austausch von Metaboliten durch eine Fusion der Zellmembranen erfolgen [9]; diese Theorie unterstützt auch die häufige Kolo-kalisation von FISH-Signalen von Altiarchaeota und Huberarchaeota [7]. Die Ähnlichkeit des reduzierten Metabolismus von *H. crystalense* in einem Kaltwassergeysir und *N. equitans* von einem Tiefseevulkan lassen die Schlussfolgerung zu, dass sowohl unter heißen als auch unter kalten Bedingungen archaeelle Symbionten einen ähnlichen evolutionären Prozess durchlaufen [7].

Weitere unerforschte Symbionten in der tiefen Biosphäre

Über Huberarchaeota hinaus existieren andere bioinformatisch vorhergesagte Symbionten in der tiefen Biosphäre, die entweder wie Huberarchaeota zu den DPANN-Archaea (Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota, Nanohaloarchaea) oder zu den Bakterien der *Candidate Phyla*



▲ **Abb. 2:** Analyseweg, wie die Interaktion von Altiarchaeota und Huberarchaeota entdeckt wurde [7]. Basierend auf Hunderten Organismen aus einem Geysir [3] und deren zeitlichem Auftreten in Metagenomen (1) wird eine Netzwerkanalyse vorgenommen, um potenzielle Symbionten von Altiarchaeota zu identifizieren (2). Abgeleitet von den Genomen wird die Interaktion der beiden Organismen mittels FISH visualisiert und damit verifiziert (3). Basierend auf Stoffwechselvorhersagen wird die Art der Interaktion der beiden Organismen formuliert (4): Während Altiarchaeota einen chemolithoautotrophen Stoffwechselweg besitzen, verfügen Huberarchaeota nicht über die Kapazität, molekulare Bausteine selbst zu synthetisieren. Diese werden basierend auf diesem Symbiosemodell von den Altiarchaeota zur Verfügung gestellt [7].

Radiation (CPR) zählen [10]. Ein weiteres Beispiel von DPANN-Archaeen ist Forsterrea multitransposorum, das zum unkultivierten Phylum Diapherotrites gehört [11]. Diese Spezies zeigt eine hohe Genomfluidität aufgrund homologer Rekombination, die durch das Wandern von Transposons innerhalb der Population und eines Genoms entsteht [11]. Ebenso wie alle entdeckten Bakterien der CPR sind die Wirte dieser Organismen im Untergrund nicht bekannt.

Genome fast aller Organismen der CPR beinhalten keine Gene zur fettsäurebasierten Lipidsynthese, doch ihre Membranen beste-

hen aus derartigen Lipiden [2]. Interessanterweise enthalten diese Membranen auch einen hohen Anteil an Lysolipiden (Lipide mit nur einer Fettsäure), die bislang als Abbauprodukt galten. Warum diese Organismen Lysolipide in der Membran tragen, ist Gegenstand momentaner Forschung, genauso wie die Frage, woher die Lipide stammen. Klar ist, dass diese auf irgendeine Art und Weise aus der Umwelt aufgenommen werden müssen, entweder direkt von ihren Wirten oder aber von abgestorbenen Zellen. DPANN-Archaeen und CPR-Bakterien stellen somit eine diverse und verbreitete Kohlenstoffs-

ke in Kaltwassergeysiren und generell in den Ökosystemen der tiefen Biosphäre dar.

Virenbefall von Mikroorganismen im Untergrund

Aufgrund der Kohlenstoffisotopenverteilung in archaellen und bakteriellen Lipiden sowie in gelösten organischen und anorganischen Verbindungen im Wasser von CO_2 -getriebenen Geysiren ist mittlerweile klar, dass deren gesamte Biozönose durch Kohlenstoffdioxidfixierung getrieben wird. Wie jedoch die Freisetzung von organischem Kohlenstoff für heterotrophe Organismen erfolgt, bleibt weitestgehend für alle Ökosysteme in der tiefen Biosphäre unklar. Virenbefall von Primärproduzenten, gefolgt von Zellyse ist durchaus ein denkbare Szenario, da Tausende von Viren bereits im Grundwasser entdeckt wurden [12]. Jedoch konnten diese Viren über CRISPR-Systeme keinen Wirten zugeordnet werden. Sehr große Phagen Genome (über 250 Kilobasenpaare) deuten auf physiologisch sehr große Phagen hin, die komplexe Strategien besitzen, die biochemische Maschinerie der Wirtszelle für sich zu gewinnen und andere Viren im Kampf um Wirte auszustechen [13]. Zunächst galten CPR-Bakterien als weitgehend frei von CRISPR-Cas-Systemen [12], doch genauere Analysen zeigen bislang unbekannte CRISPR-Cas-Systeme in diesen Bakterien [14]. Die Interaktion Virus-Mikroorganismus und deren Auswirkungen auf die Ökosysteme in der tiefen Biosphäre sind noch gänzlich unverstanden.

Wie auf der VAAM-Jahrestagung 2020 vorgestellt, arbeitet meine Gruppe unter anderem an der Detektion von Virenbefall der Primärproduzenten der tiefen Biosphäre, um den dortigen Nährstoffkreislauf direkt am Ansatz verstehen zu können. Weiterhin werden nach wie vor mehr Proben aus der tiefen Biosphäre benötigt, um das Bild dieser riesigen und noch unerforschten Biotope zu festigen und deren Einfluss auf globale biogeochemische Stoffwechselprozesse besser zu verstehen.

Danksagung

Mein Dank gilt primär den Mitarbeiter/inne/n meiner Arbeitsgruppe für ihren stetigen und sehr hohen Einsatz, ihre langwährende Motivation und die anregenden Diskussionen. Ich danke auch meinen Mentor/in/nen, die mich in meiner Karriere unterstützten, vor allem Reinhard Wirth und Jillian Banfield. Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem

Ministerium für Kultur und Wissenschaft des Landes Nordrhein-Westfalen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Sloan Foundation, dem Deutschen Luft- und Raumfahrtzentrum sowie dem Bundesministerium für Bildung und Forschung. Andreas Klingl danke ich für die elektronenmikroskopische Aufnahme in Abbildung 2D. ■

Literatur

- [1] Anantharaman K, Brown CT, Hug LA et al. (2016) Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nat Commun* 7:13219
- [2] Probst AJ, Elling FJ, Castelle CJ et al. (2020) Lipid analysis of CO₂-rich subsurface aquifers suggests an autotrophy-based deep biosphere with lysolipids enriched in CPR bacteria. *ISME J*, doi: 10.1038/s41396-020-0624-4
- [3] Probst AJ, Ladd B, Jarett JK et al. (2018) Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. *Nat Microbiol* 3:328–336
- [4] Bornemann TL, Adam PS, Turzynski V et al. (2020) Geological degassing enhances microbial metabolism in the continental subsurface. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.07.980714
- [5] Probst AJ, Weinmaier T, Raymann K et al. (2014) Biology of a widespread uncultivated archaeon that contributes to carbon fixation in the subsurface. *Nat Commun* 5:5497
- [6] Bird JT, Baker BJ, Probst AJ et al. (2016) Culture independent genomic comparisons reveal environmental adaptations for Altiaarchaeales. *Front Microbiol* 7:1221
- [7] Schwank K, Bornemann TL, Dombrowski N et al. (2019) An archaeal symbiont-host association from the deep terrestrial subsurface. *ISME J* 13:2135–2139
- [8] Huber H, Hohn MJ, Rachel R et al. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417:63–67
- [9] Heimerl T, Flechsler J, Pickl C et al. (2017) A complex endomembrane system in the archaeon *Ignicoccus hospitalis* tapped by *Nanoarchaeum equitans*. *Front Microbiol* 8:1072
- [10] Monsees I, Klingl A, Probst AJ (2019) Kleine Zellen, große Wirkung – Bakterien der *Candidate Phyla Radiation*. *BIOspektrum* 25:719–721
- [11] Probst AJ, Banfield JF (2018) Homologous recombination and transposon propagation shape the population structure of an organism from the deep subsurface with minimal metabolism. *Genome Biol Evol* 10:1115–1119
- [12] Burstein D, Sun CL, Brown CT et al. (2016) Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems. *Nat Commun* 7:10613
- [13] Al-Shayeb B, Sachdeva R, Chen L-X et al. (2020) Clades of huge phages from across Earth's ecosystems. *Nature* 578:425–431
- [14] Burstein D, Harrington LB, Strutt SC et al. (2017) New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature* 542:237

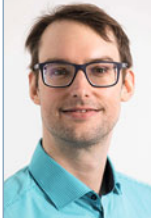
Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Alexander J. Probst
Umweltmikrobiologie und Biotechnologie (UMB)
Aquatische Mikrobielle Ökologie
Fakultät für Chemie
Universität Duisburg-Essen
Universitätsstraße 5
D-45 141 Essen
alexander.probst@uni-due.de

AUTOR



Alexander J. Probst

2004–2010 Biologiestudium an der Universität Regensburg. 2010 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lawrence Berkeley National Laboratory, CA, USA. 2011–2014 Promotion an der Universität Regensburg, jeweils unterstützt durch ein Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes. 2010–2014 Bioinformatiker bei Second Genome. 2015 VAAM-Promotionspreis. 2014–2017 Postdoc an der University of California, Berkeley, USA, unterstützt durch ein Stipendium der DFG. 2017–2018 Arbeitsgruppenleiter, „NRW Rückkehrer“ und Vertretungsprofessor an der Universität Duisburg-Essen, seit 2018 als W2-Professor. 2020 VAAM-Forschungspreis.

Hier steht eine Anzeige.

