

# Mikrobiome – Wissensstand und Perspektiven

Michael Wagner

## Zusammenfassung

Wir leben auf einem mikrobiellen Planeten. Archaeen und Bakterien waren die ersten Lebewesen auf der Erde und haben diese über hunderte Millionen Jahre alleine bewohnt. Die Biodiversität dieser mikroskopisch kleinen Organismen übersteigt bei weitem die aller anderer Organismengruppen und ohne ihre Aktivität gäbe es kein Leben auf der Erde. Alle Ökosysteme, Pflanzen, Tiere und der Mensch, sind von Mikrobengemeinschaften besiedelt, deren Erforschung sich die Mikrobiomforschung zum Ziel gesetzt hat. Die Verwendung molekularer Methoden, von der 16S-rRNS-Genanalyse zu Meta-Omics-Technologien, hat unser Verständnis des Stammbaums des Lebens dabei grundlegend verändert. In den letzten Jahren entwickelte Einzelzellmethoden wie die Raman-Mikrospektroskopie zur *In-situ*-Funktionsanalyse von Mikroben in ihren natürlichen Ökosystemen haben unerwartete Einblicke z.B. in den biogeochemischen Stickstoffkreislauf ermöglicht. So können Nitrifizierer neben Harnstoff, Ammonium und Nitrit auch andere, unerwartete Substrate umsetzen und Nitritoxidierer können überraschenderweise die Nitrifizierung initiieren. Die von meiner Arbeitsgruppe neu entdeckten vollständigen Nitrifizierer (Comammox) wiederum wandeln Ammonium direkt in Nitrat um. Welchen Beitrag Comammox-Mikroben in der Umwelt an der Nitrifizierung haben und wie verbreitet sie sind, versuchen wir gerade erst zu verstehen.

## Summary

### Microbiomes: state of knowledge and perspectives

We live on a microbial planet. Archaea and Bacteria were the first organisms colonizing our planet and have lived there alone for many hundreds of millions of years. The biodiversity of these tiny little creatures by far exceeds those of all other life forms, and life on Earth would not be possible without their activity. Microbial communities colonize all ecosystems, plants, animals, and humans. Understanding the structure and function of these communities is the overarching goal of microbiome research. The development and application of molecular methods, ranging from the 16S rRNA gene approach to meta-omics technologies, have revolutionized our understanding of the tree of life. Single-cell techniques like Raman-microspectroscopy now allow researchers to study the function of individual microbial cells within their natural ecosystems. For example, the application of these methods have dramatically changed our perception of the key players and their physiologies in the global biogeochemical nitrogen cycle. Surprisingly, nitrifiers can use several other substrates than urea, ammonia and nitrite, and nitrite-oxidizers can initiate nitrification. The complete nitrifiers (comammox) recently discovered by my research group are able to metabolize ammonium directly to nitrate. We are currently investigating to what extent comammox contribute to the nitrification in natural and engineered ecosystems and how abundant they are in the environment.

✉ Prof. Dr. Dr. h.c. Michael Wagner, Universität Wien, Department für Mikrobiologie und Ökosystemforschung, Althanstraße 14, 1090 Wien, Österreich; wagner@microbial-ecology.net

## Einführung: Was ist ein Mikrobiom?

Die beiden wichtigsten Definitionen des Begriffs Mikrobiom wurden uns eben vorgestellt (vgl. S. 12, Beitrag Bauer [2019] in diesem Band). Auffallend ist dabei, dass der Begriff unterschiedlich verwendet wird: mit Betonung auf Mikro-*biom* oder auf Mikro-*bi-om*. Die einen sehen das Mikrobiom – wie ursprünglich 1988 von Whipps et al. definiert – als eine mikrobielle Lebensgemeinschaft, inklusive der Funktionen (»theatres of activities«): »Characteristic *microbial community* occupying a reasonably well defined habitat, which has distinct physico-chemical properties. The term thus not only refers to the microorganisms involved, but also encompasses their theatres of activity.« Die anderen um Lederberg (2004) definieren es als mit den »-omics«-Technologien vollständig erfassbar und betrachten darum mehr die Gene als die ganzen Lebensgemeinschaften: »Multitudes of bacteria and viruses occupy our skin, our mucous membranes and our intestinal tract. They are likely to play a much larger role in ... disease than we realize. Understanding this *cohabitation of genomes* within the human body – what I call the microbiome – is central to understanding the dynamics of health and disease.« Unsere Arbeitsgruppe in Wien versteht die Mikrobiomforschung eher in der ersten, umfassenden, ökologischen Definition, wie aus dem folgenden Beitrag hervorgehen wird.

## Kultivierung von Mikroorganismen

Wir haben auch schon gehört, dass die Mikrobiologie mit der mikroskopischen Beobachtung von Mikroben begann und dass dies auch lan-

**Tab. 1.** Kultivierbarkeit (in %) von Mikroorganismen im Labor. – Nach Amann et al. (1995).

Habitat	Kultivierbarkeit [%]
Meerwasser	0,001–0,1
Mesotrophe Seen	0,1–1
Mündungsgebiete	0,1–3
Sedimente	0,25
Boden	0,3
Belebtschlamm	1–15
Fäzes (Mensch)	20–40
Mundhöhle	< 50

ge Zeit ihre Beschränkung war (Bauer 2019): Bakterien in ihrer unspektakulären Morphologie konnte man in ihren natürlichen Ökosystemen nur durch Mikroskope betrachten. Auch wenn diese immer leistungsfähiger wurden, blieb die Frage offen, um welche Organismen es sich handelt und welche Funktion sie im jeweiligen Ökosystem haben. Dies hat sich etwas geändert mit der Anzucht von Mikroorganismen, die aber vor allem auf Pathogene fokussiert war und die, egal, welches Medium verwendet wird, immer dazu führt, dass die tatsächliche Anzahl und Diversität der Mikroorganismen dramatisch unterschätzt wird. Tabelle 1 zeigt die Kultivierbarkeit von Mikroorganismen aus einer Übersichtsarbeit von 1995 (Amann et al. 1995). Auch wenn bei Verwendung moderner Kultivierungsverfahren heute ein größerer Anteil der in der Umwelt vorkommenden Mikroben angezüchtet werden kann, gibt es immer noch eine riesige mikrobielle Diversität, die wir bislang über Kultivierung nicht erfassen und nicht beschreiben können, und die häufig als »microbial dark matter« bezeichnet wird.

## Sequenzierung ribosomaler 16S-RNA-Gene

Mit den molekularen Ansätzen zur Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften hat sich Ende der 1980er Jahre die Situation dann dramatisch geändert. Das Schlüsselmolekül war die ribosomale 16S-RNA (16S-rRNA), die in allen prokaryotischen Organismen vorkommt. Durch Vergleich der Sequenz der Gene, die die 16S-rRNA kodieren, lassen sich Bakterien und Archaeen in einem Stammbaum des Lebens einordnen, ohne dass sie je angezüchtet worden sind. Heute ist der 16S-rRNA-Datensatz der größte eines Gens in den Datenbanken, 2016 umfasste er über 6,3 Millionen Datenbankeinträge von 16S-rRNA-Gensequenzen.

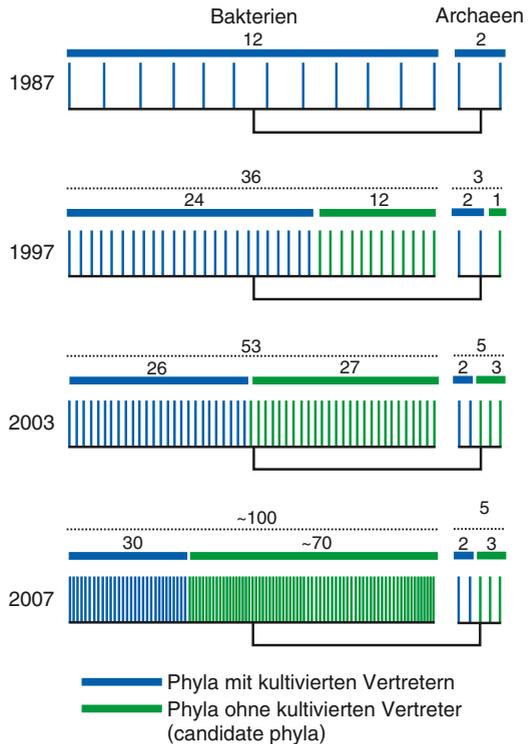
Das hat dazu geführt, dass sich der Stammbaum des Lebens bevölkert hat. In den 20 Jahren von 1987 bis 2007 stieg die Zahl der Bakterienphyla rapide an, von 12 auf etwa 100 (Abb. 1), und hinter jedem dieser Phyla (Stämme) verbergen sich abertausende Arten. Das heißt, in 20 Jahren wurden über 80 Stämme entdeckt – zum Vergleich: Bei den höheren Tieren bilden z.B. die Wirbeltiere »nur« einen Unterstamm innerhalb des Stammes der Chordata. Viele

dieser Mikrobenphyla enthalten keinen einzigen Vertreter, der sich bis heute im Labor anzüchten lässt und damit, zumindest bis vor kurzem, einer funktionellen Untersuchung zugänglich war. Diese dramatische Entdeckungsperiode in der Mikrobiologie wird jedoch in der Öffentlichkeit so gut wie gar nicht wahrgenommen. Wenn heute neue Wirbeltierarten entdeckt werden, wird darüber häufig in großen, überregionalen Zeitungen wie der New York Times berichtet, seien es neue Fisch-, Vogel- oder Affenarten. Dabei handelt es sich aber immer um Wirbeltiere und i. d. R. um Vertreter bereits bekannter Familien, also um nichts grundlegendes Neues. Was Mikrobiologen in den letzten Jahren beschrieben haben, sind hingegen neue grundlegende Entwicklungslinien, wir entdecken laufend ganz neue Stämme – also so etwas wie die Wirbeltiere! Der Öffentlichkeit ist dies jedoch kaum zu vermitteln, da die Mikroorganismen morphologisch alle sehr ähnlich aussehen. Wird eine neue Froschart mit einer auffälligen Färbung entdeckt, wird dies sofort als Diversität wahrgenommen, während hinter den neuen Bakterienstämmen ein Vielfaches mehr an Diversität steckt.

Diese Entdeckungsperiode hat zu einem ganz neuen Stammbaum des Lebens geführt, der aktuell aus 92 Bakterienstämmen, 26 Archaeenstämmen und 5 eukaryotischen »Supergruppen« besteht (Hug et al. 2016). Die Distanz zwischen den Organismen in einem Stammbaum besitzt einen gewissen Informationsgehalt über den Verwandtschaftsgrad. Vergleicht man diese Verwandtschaft innerhalb der Eukaryoten mit der innerhalb der Bakterien, so sind Letztere oft wesentlich weniger miteinander verwandt als z. B. eine Pflanze und der Mensch. Zusammenfassend ist es nicht übertrieben festzuhalten, dass wir auf einem mikrobiellen Planeten mit einer enormen mikrobiellen Diversität leben. Wir haben gerade erst angefangen, diese zu beschreiben, und sind noch sehr weit weg davon, sie funktionell zu verstehen. Hier müssen noch enorme Forschungsanstrengungen geleistet werden.

### Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Anhand der 16S-rRNA-Gensequenzen ist es nicht nur möglich geworden, die Diversität der Mikroorganismen zu beschreiben, sondern man kann sie nun mithilfe kleiner DNA-Sonden, die Fluoreszenzfarbstoffe tragen, auch visualisieren und



**Abb. 1.** Entwicklung der bekannten Phyla von Archaeen und Bakterien zwischen 1987 und 2007. Phyla, die kultivierte Vertreter enthalten, sind in schematischen Stammbäumen blau dargestellt, Phyla, die ausschließlich aus bislang nicht anzüchtbaren Organismen bestehen, sind grün markiert. – Nach Achtmann & Wagner (2008), © die Autoren.

quantifizieren (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung [FISH]). Das hat Mikrobiologen vergleichbar zu Botanikern oder Zoologen in die Lage gebracht, z. B. die Abundanz von bestimmten Bakterien im Jahresverlauf zu verfolgen und räumliche Beziehungen zwischen ihnen festzuhalten. Über ihre Funktion im jeweiligen Ökosystem sagt dies aber bestenfalls nur sehr indirekt etwas aus.

Mit den neuen molekularen Verfahren hat man erstmals festgestellt, welche unfassbare Diversität an Mikroben Umweltproben enthalten. In einem Gramm Erde befinden sich etwa eine Milliarde ( $10^9$ ) Zellen und geschätzt 100 000 Bakterienarten (Gans et al. 2005). Mit anderen Worten: Sieben Teelöffel Erde enthalten in etwa so viele Zellen, wie es (Stand Februar 2018) Menschen auf der Erde gibt. Alle diese Organismen haben noch nicht erforschte Gene und Eigenschaften, pro-

duzieren vielleicht neue Antibiotika oder neue Enzyme – ein unglaublicher Schatz an Biodiversität, der täglich um uns herum ist und der dringend untersucht werden muss.

Dies gilt auch für uns selbst. Unser Körper besteht aus mehr bakteriellen als menschlichen Zellen und aus mehr bakteriellen als menschlichen Genen. Allein 500–1000 Bakterienarten kolonisieren unseren Darmtrakt und beeinflussen so unser Immunsystem (vgl. Beitrag Haller [2019] in diesem Band) und auch die Mundhöhle wird von mehr als 600 Bakterienarten besiedelt. Alle höheren Lebewesen haben sich zusammen mit diesen Mikroben, die die Erde schon viel länger bewohnen, erst entwickelt und so ist im Laufe der Evolution ein unglaublich komplexes Netzwerk an Interaktionen entstanden. Dieses verstehen zu lernen, gehört zu den Grundlagen, wenn wir im nächsten Schritt ein Verständnis von Krankheit und Gesundheit erreichen wollen.

## Genomanalysen, Metagenomik

Nach der Entdeckung und der mikroskopischen Betrachtung – van Leeuwenhoek mit seinen genialen Linsen – kam die Kultivierung – Pasteur und Koch –, es folgten die molekularen Verfahren wie 16S-rRNA-Genanalysen und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und dann kam die Ära der Metagenomik, in der man nicht nur ein Gen betrachtet hat, sondern begonnen hat, ganze Genome aus komplexen Umweltproben zu rekonstruieren, ohne die Organismen anzuzüchten. In Zusammenarbeit mit Genoscope und holländischen Forschern hat meine Arbeitsgruppe 2006 das Genom von *Kuenenia stuttgartiensis* – eines anaeroben Ammoniumoxidierers (Anammox) – mit 4 218 325 Basenpaaren aus einer komplexen Probe mit etwa 100 Spezies veröffentlicht (Strous et al. 2006). Inzwischen ist es mehr oder weniger Routine geworden, aus Umweltproben fast geschlossene oder geschlossene Genome von Organismen zu rekonstruieren.

Wenn wir ein ganzes Genom kennen, ist das nächste Ziel, auch das Transkriptom, d.h. die Gesamtheit aller in einer Zelle hergestellten RNA-Moleküle, und das Proteom, d.h. die Gesamtheit aller in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegenden Proteine, zu bestimmen, um damit die Funktion der Mikroben besser verstehen zu können. Werden nicht einzelne Bakterien analysiert, sondern komplexe Proben

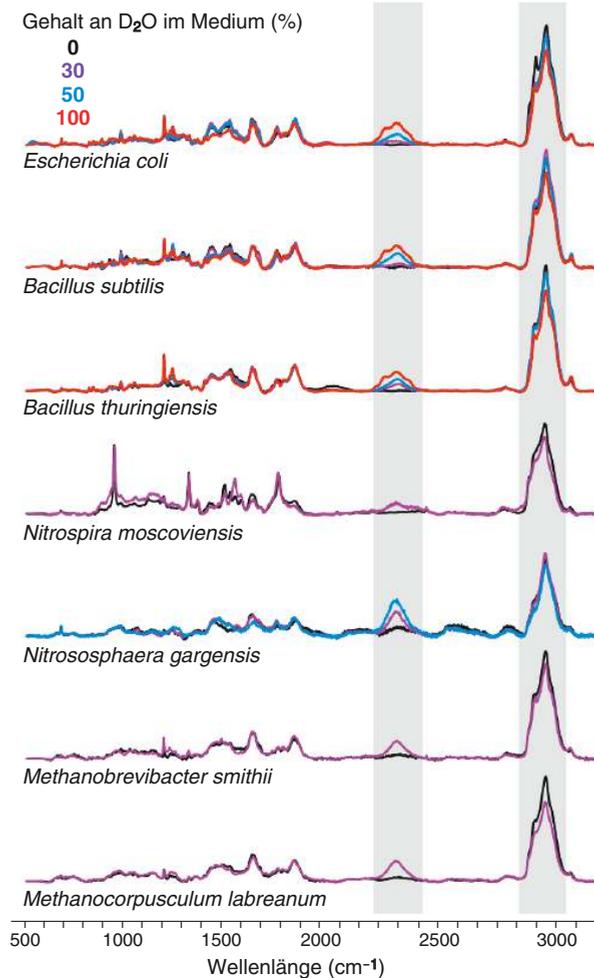
aus Umwelt oder Medizin, wird das Präfix Meta- vorangestellt: Metagenomik, Metatranskriptomik, Metaproteomik.

## Zuweisung von Annotationen

Erinnern wir uns an den Stammbaum des Lebens, in dem es viele Organismen gibt, die nur sehr entfernt verwandt zu bereits funktionell charakterisierten Vertretern sind. Ein Großteil der Gene in den Genomen solcher Organismen hat keine interpretierbare Homologie zu Genen mit bekannter Funktion. In der Datenbank Pfam (protein sequence family database), in der maschinell Proteindomänen kategorisiert werden und die alle bekannten Proteine einschließt, haben die Proteine mit unbekannter Funktion von 1999 bis 2016 dramatisch zugenommen (Baric et al. 2016). Man schätzt, dass es in dieser Datenbank bald mehr Proteine mit unbekannter als mit bekannter Funktion geben wird.

Wird einem Gen in einem Genom mithilfe der Bioinformatik eine Funktion durch Vergleich zugewiesen (Homologiesuche), sprechen wir von Annotation. Diese Zuweisung beruht aber auf der Annahme, dass bei einer bestimmten Ähnlichkeit zweier Gene das Enzym, das diese Gene kodieren, dieselbe Funktion hat. Viele Gene haben jedoch keine Ähnlichkeit mit bereits bekannten und so können wir diesen Ansatz in vielen Fällen nicht anwenden.

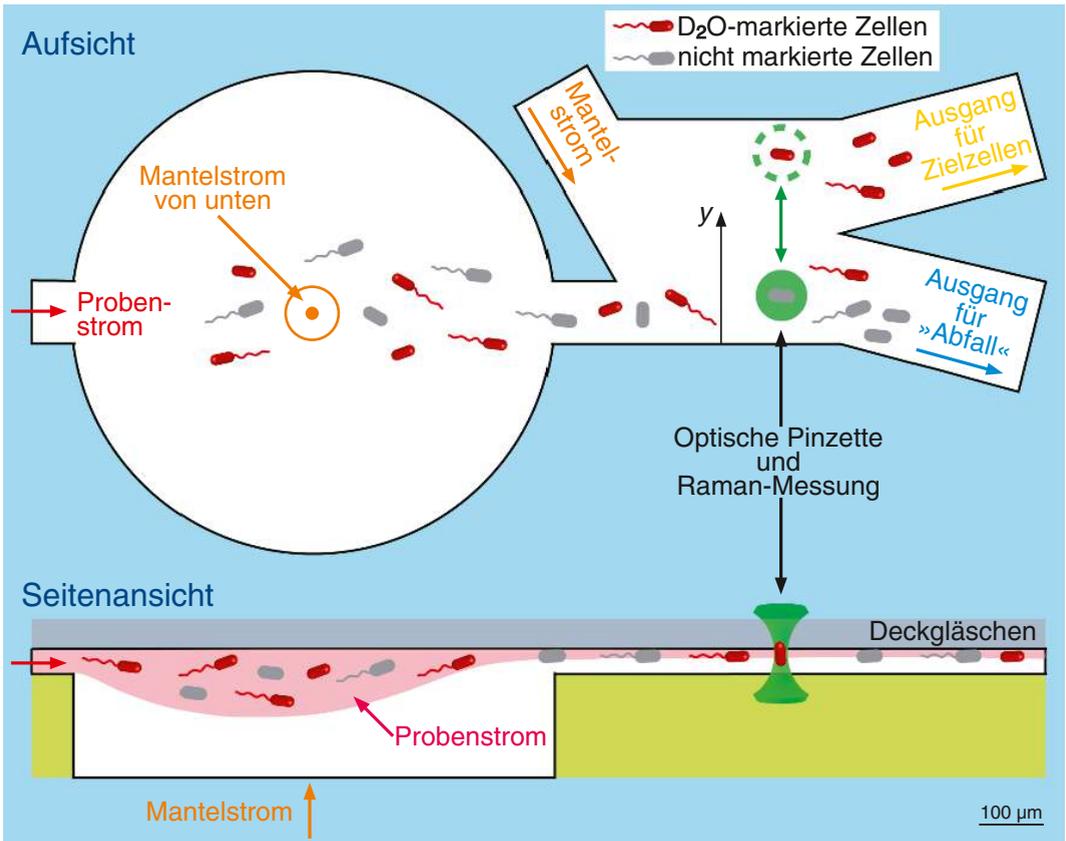
Aber auch bei Genen, die einem Gen ähneln, das ein Enzym mit bekannter Funktion kodiert, muss eine Annotation immer kritisch hinterfragt werden. Francis Arnold beschäftigt sich am Caltech in Kalifornien mit experimenteller Proteinevolution, um für die Biotechnologie Proteine mit neuen Funktionen zu schaffen. Sie hat u. a. ein Enzym, Cytochrom P450 von einem *Bacillus*, verwendet, das langkettige Fettsäuren hydroxyliert. Wenn sie an diesem Enzym nur 2 % der Aminosäuresequenz (23 Aminosäuren) ändert, hydroxyliert das Enzym keine Fettsäuren mehr, sondern Propan (Fasan et al. 2007). Das bedeutet eine völlige Änderung der Funktion und die Umsetzung eines ganz anderen Substrats, bei nur 2 % Aminosäureänderung. Bisweilen reicht es sogar aus, nur eine Aminosäure zu ändern, um ein komplett verschiedenes Substratspektrum zu erhalten. F. Arnold fasst ihre Arbeiten mit einem Zitat aus Zuckerkandl & Pauling (1965) folgendermaßen zusammen:



**Abb. 2.** Raman-Spektren verschiedener Mikroorganismen, die in mit D<sub>2</sub>O versetztem Medium (% D<sub>2</sub>O) kultiviert wurden. Grau hinterlegt: charakteristische C-D- (links) und C-H- (rechts) Regionen. – Berry et al. (2015), © die Autoren.

»There is no reason to expect that the extent of functional change in a polypeptide chain is proportional to the number of amino acid substitutions in the chain. Many such substitutions may lead to relatively little functional change, whereas at other times the replacement of one single amino acid residue by another may lead to a radical functional change.« (Bloom & Arnold 2009). Sie konnte auch zeigen, dass nicht nur Veränderungen im aktiven Zentrum, sondern häufig auch Veränderungen in der Peripherie eines Enzyms ein anderes Substratspektrum und eine andere Aktivität bewirken. Ich denke,

hier liegt eine der größten Herausforderungen in der Interpretation der Genome. Häufig sagt eine Ähnlichkeit (Homologie) zwischen Genen etwas aus, man kann sich aber nie sicher sein. Dies ist folglich ein Aufruf zu einem verstärkten Einsatz von Biochemie und (*in situ*) Physiologie für die Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften: Wir müssen Metagenomik, Metatranskriptomik und Metaproteomik stärker mit physiologischen und biochemischen Analysen verbinden, um Hypothesen, die mittels der Omics-Ansätze entwickelt wurden, auch experimentell überprüfen zu können.



**Abb. 3.** Microfluidic Raman Activated Cell Sorting (RACS): schematische Darstellung der Zellanalyse. Erläuterungen s. Text. – Abbildung zur Verfügung gestellt von Kang Soo Lee und Roman Stocker (ETH Zürich).

## Raman-Mikrospektroskopie

Unsere Arbeitsgruppe versucht, dazu ein wenig beizutragen, indem wir die Funktionsanalyse mit den Meta-omics-Technologien koppeln. Wir markieren dafür einzelne Zellen in einem komplexen Ökosystem (z. B. im Boden), die eine bestimmte Funktion haben. Zunächst inkubieren wir die Probe mit den Mikroorganismen unter möglichst natürlichen Bedingungen und möglichst kurz mit Substraten, die mit stabilen Isotopen markiert sind. Dann führen wir zur Identifizierung der Bakterien eine FISH durch und in derselben Analyse verwenden wir moderne Verfahren der chemischen Bildgebung wie Raman-Mikrospektroskopie oder NanoSIMS (Nano Sekundärionen-Massenspektrometer) (Wagner 2009, Wang et al. 2016). So können wir für die über FISH identifizierten Bakterien gleichzeitig

die Frage beantworten, ob und, wenn ja, wie viel stabiles Isotop während der Inkubierung eingebaut worden ist. Dieser Versuchsansatz folgt dem Prinzip »you are what you eat« – Mikroben, die das zugesetzte, markierte Substrat verstoffwechselt haben, bestehen danach zum Teil aus dessen stabilen Isotopen.

Die Aufnahme eines Raman-Spektrums dauert nur einige Sekunden und diese Technologie hat eine räumliche Auflösung von ca. 1 µm. Die Bakterien müssen dafür nicht präpariert werden und die Analyse kann in Wasser durchgeführt werden. Die Spektren geben Aufschluss über die chemische Zusammensetzung der Zellen und der Einbau eines stabilen Isotops in die Biomasse einer Zelle führt zu charakteristischen Peakverschiebungen. Bei Inkubierung von Mikroben in einem wässrigen Medium erscheint z. B. bei allen physiologisch aktiven Bakterien

ein neuer Peak – der sogenannte Kohlenstoff-Deuterium-Peak –, wenn wir »schweres Wasser« (Deuterium-markiertes Wasser,  $D_2O$ ) zugeben, da das Deuterium aus dem Wasser über  $NADPH/H^+$  aufgrund der Stoffwechselaktivität der Zelle in deren Biomasse eingebaut wird (Abb. 2, linke graue Hinterlegung; Berry et al. 2015). Wir können aus den Spektren also innerhalb weniger Minuten auslesen, ob eine Zelle unter den gegebenen Umweltbedingungen aktiv war oder nicht. Im Gegensatz zur Raman-Mikrospektroskopie ist die NanoSIMS-Technologie technisch wesentlich aufwendiger und teurer, hat aber den Vorteil, dass der Isotopennachweis in den Zellen mit deutlich höherer Sensitivität und räumlicher Auflösung (bis zu 35 nm) durchgeführt werden kann. Andererseits zerstören NanoSIMS-Messungen die untersuchten Zellen, sodass im Gegensatz zur nicht destruktiven Raman-Spektroskopie die Zellen nach der Messung nicht mehr mit anderen Verfahren untersucht werden können.

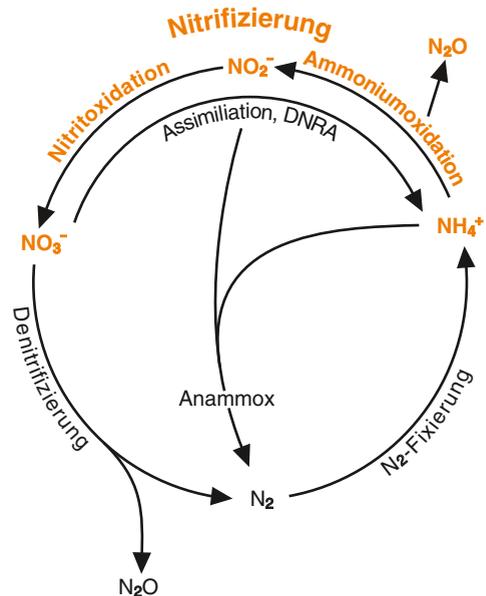
Wir können sogar einen Schritt weitergehen und die Raman-Technologie zum Sortieren isotonenmarkierter Zellen verwenden (Microfluidic Raman Activated Cell Sorting [RACS]). Dafür werden speziell entworfene Mikrofluidik-Kammern, kleine Labore auf Chipgröße, eingesetzt. Die Zellen werden nach der Inkubierung hydrodynamisch fokussiert, in einer optischen Pinzette, einem stark fokussierten Laserstrahl, gefangen und aus dem Flüssigkeitsstrahl herausgezogen. Das Raman-Spektrum wird gemessen und die Zelle, wenn sie mit dem nachzuweisenden stabilen Isotop markiert ist, wird aussortiert; ist sie nicht markiert, fährt das Gerät die Zelle zurück und sie wird verworfen (Abb. 3). Das heißt, Zellen werden im Gegensatz zur konventionellen Sortierung mittels eines Fluorescence Activated Cell Sorters (FACS) nicht nach Größe oder Fluoreszenz, sondern nach ihrer Aktivität sortiert (Berry et al. 2015). Das Gerät ist bei uns routinemäßig im Einsatz, wir sortieren damit z. B. Darmbakterien oder Zellen aus Bodenproben, die nach Zugabe eines bestimmten Substrats aktiv geworden sind. Die Genauigkeit der Analyse liegt bei 98 %, d. h., nur 2 von 100 sortierten Zellen weisen keine Isotopenmarkierung auf. Die Zellen leben nach der Sortierung noch und wir können sie anschließend kultivieren oder mit ihnen genomische Analysen durchführen.

Wie diese neuen Techniken selbst bei so gut untersuchten Prozessen wie dem Stickstoffkreislauf noch für große Überraschungen sorgen können, möchte ich im Rest dieses Beitrags vorstellen.

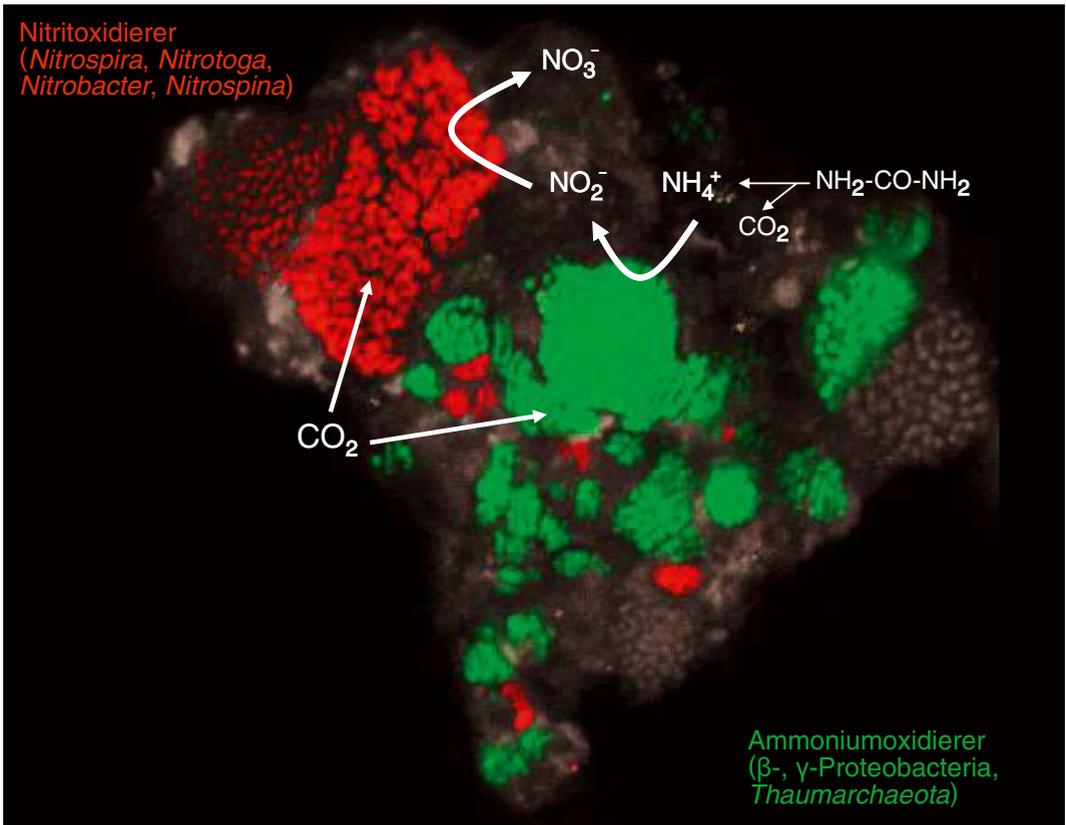
## Der biogeochemische Stickstoffkreislauf

Auf der Erde werden Stickstoffverbindungen in einem biogeochemischen Kreislauf rezykliert (Abb. 4), bei dem die Oxidationen und Reduktionen größtenteils von Mikroorganismen katalysiert werden. Das Funktionieren dieser großen Stoffkreisläufe ist die Grundlage alles Lebens auf der Erde; würden sie zum Erliegen kommen, weil es die Bakterien und Archaeen nicht gäbe, gäbe es auf der Erde kein Leben.

Im Stickstoffkreislauf interessieren wir uns v. a. für die Nitrifizierung, d. h. die Oxidation von Ammonium über Nitrit zu Nitrat ( $NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ ). Sie ist deshalb so wichtig, weil die Hälfte aller Menschen auf der Welt auf künstliche Düngung mit künstlichen Stickstoffverbindungen (Harnstoff oder Ammonium), die über das Haber-Bosch-Verfahren ( $N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$ )



**Abb. 4.** Schematische Darstellung des biogeochemischen Stickstoffkreislaufs. DNRA: dissimilatorische Reduktion zu Ammonium. Erläuterungen s. Text.



**Abb. 5.** Nitrifizierung: Ammonium- und Nitrit-oxidierende Bakterien (angefärbt über Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) und zugehörige chemische Umsetzungen. – Foto: Holger Daims, DOME.

hergestellt werden, angewiesen sind (Erisman et al. 2008). Leider ist diese Düngung extrem ineffizient. Man schätzt, dass von den 100 Tonnen Stickstoff (in gebundener Form im Dünger), die jährlich in der industrialisierten Landwirtschaft ausgebracht werden, umgerechnet nur 17 % vom Menschen in Form von Nahrung aufgenommen werden. Der Rest geht verloren, wird aus den Böden ausgewaschen, gelangt in Gewässer und führt dort zu Eutrophierung, Algenblüten und sauerstoffarmen Todeszonen. An dieser Auswaschung sind Nitrifizierer wesentlich beteiligt, die das positiv geladene Ammonium aus dem Dünger in negativ geladenes Nitrat umwandeln, das viel leichter aus dem Boden ausgewaschen wird (vgl. Beitrag Lüders [2019], S. 48 in diesem Band). Damit sind Nitrifizierer eine Hauptursache für die Eutrophierungsprobleme, während wir sie z. B. in Kläranlagen zur Abwasserreinigung nüt-

zen, um Stickstoffverschmutzungen der Umwelt zu verringern.

Vielen Menschen ist nicht bewusst, wie dramatisch der Einfluss des Menschen in den Stickstoffkreislauf ist. Nach Steffen et al. (2015) sind die menschlichen Eingriffe in den Stickstoff- und den Phosphorkreislauf sowie der Verlust der genetischen Diversität inzwischen die größten Gefahren für die Stabilität des Lebens auf der Erde. Dennoch bekommt die Überdüngung bei weitem nicht die Aufmerksamkeit, wie sie z. B. der Klimawandel erfährt.

### Ammoniumoxidierer, Nitritoxidierer – und Comammox

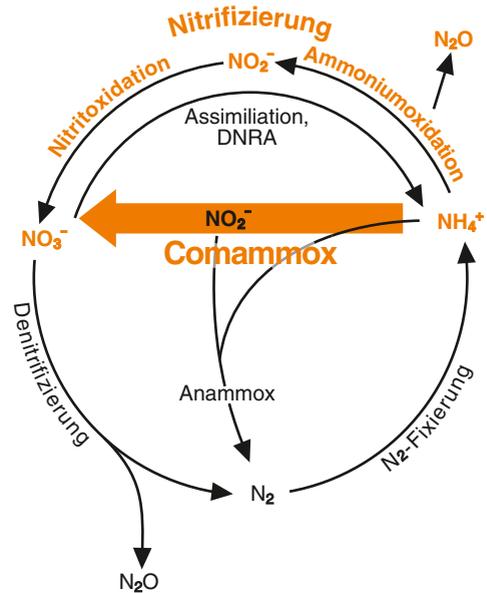
Abbildung 5 zeigt die beiden Gruppen von Nitrifizierern: Ammoniumoxidierer (grün), die Ammonium oder Harnstoff zu Nitrit umsetzen,

und Nitritoxidierer (rot), die aus Nitrit Nitrat bilden. In Lehrbüchern werden sie als Spezialisten beschrieben, die im Labor nur sehr schwer anzüchtbar sind. Die Nitrifizierer wurden bereits 1890 von Sergej Winogradsky beschrieben (Winogradsky 1890, 1891, 1892) und seitdem ist man davon ausgegangen, dass die beiden Reaktionen der Nitrifizierung in enger räumlicher Nachbarschaft, aber getrennt voneinander in verschiedenen Organismen ablaufen.

Wir haben diese Organismen mit den eingangs vorgestellten Techniken näher erforscht und herausgefunden, dass die Umsetzungen wesentlich komplexer sind als bisher angenommen. Wie viele andere Bakteriengruppen auch, sind Nitrifizierer erstaunlich vielfältig in ihrer Funktion. Sie können neben Ammonium und Nitrit auch Wasserstoff, Cyanat oder Formiat umsetzen (Koch et al. 2014, 2015, Palatinszky et al. 2015). Diese Vielfalt an Funktionen hat enorme Folgen, da man in Umweltproben Nitrifizierer aufgrund ihres langsamen Wachstums im Labor fast ausschließlich molekular nachweist. Immer, wenn man die entsprechenden Gene, Transkripte oder Proteine findet, geht man davon aus, dass die Organismen Ammonium zu Nitrit oder Nitrit zu Nitrat umsetzen. Aber wie wir nun wissen, ist dies eine unzulässige Vereinfachung und die Funktion der entsprechenden Zellen muss vielmehr einzeln und in jeder Umweltprobe spezifisch nachgewiesen werden.

Die Nitrifizierung kann auch umgekehrt ablaufen: Nitritoxidierer können aus Cyanat oder Harnstoff Ammonium bilden und damit die Ammoniumoxidierer füttern, die dann wiederum die Nitritoxidierer mit dem gebildeten Nitrit füttern, wie wir experimentell nachweisen konnten (Koch et al. 2015, Palatinszky et al. 2015). Die Nitrifizierung beginnt also keineswegs immer mit der Ammoniumoxidation.

Zu unserer großen Überraschung konnten wir kürzlich zeigen, dass die Nitrifizierung nicht ausschließlich von zwei getrennten Organismengruppen durchgeführt wird. Es gelang uns, aus einer heißen Wasserquelle in Russland erstmals sogenannte Comammox-Mikroben (*complete ammonia oxidiser*) anzuzüchten, die beide Schritte katalysieren und aus Ammonium Nitrat bilden (Daims et al. 2015, Kits et



**Abb. 6.** Schematische Darstellung des biogeochemischen Stickstoffkreislaufs, unter Berücksichtigung der direkten Umwandlung von Ammonium zu Nitrat durch Comammox.

al. 2017). Wir sind bisher weltweit das einzige Labor, die diesen Organismus in Reinkultur hat. Damit haben wir einen neuen Schritt im Stickstoffkreislauf entdeckt, nämlich die direkte Umwandlung von Ammonium in Nitrat (Abb. 6). Comammox-Organismen zeigen auch eine ganz neue Biochemie, z. B. eine andere Atmungskette mit einem äußerst ungewöhnlichen Komplex I und IV. Wir sind gerade dabei zu untersuchen, wie verbreitet Comammox-Mikroben sind, und wir versuchen zu verstehen, welchen Beitrag Comammox in der Umwelt an der Nitrifizierung hat.

Diese Beispiele zeigen, was mit den vorgestellten Methoden – Meta-omik und funktionelle Analyse von Organismen in der Umwelt – selbst bei Stoffkreisläufen, die seit Jahrzehnten durchdrungen und verstanden zu sein scheinen, noch an Neuem entdecken werden kann. Wir leben also in spannenden Zeiten in der Mikrobiomforschung, und die neuen Methoden werden uns noch viele unerwartete Einblicke in die Welt der Mikroben ermöglichen.

## Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Departments für Mikrobiologie und Ökosystemforschung für ihr Engagement, ihre Kreativität und die wunderbare Zusammenarbeit. Zudem gilt mein Dank allen Kooperationspartnern im In- und Ausland und ganz besonders der Gruppe um Prof. Per Nielsen an der Aalborg University in Dänemark, an der ich seit vielen Jahren als Gastprofessor tätig bin. Meine Forschung während der letzten Jahre wurde vor allem durch einen Advanced Grant des European Research Council (ERC) gefördert, bei dem ich mich ebenfalls sehr bedanken möchte.

## Literatur

- Achtman, M. & M. Wagner. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. – *Nature Reviews Microbiology*, 6(6): 431–440.
- Amann, R. L., W. Ludwig & K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. – *Microbiological Reviews*, 59(1): 143–169.
- Baric, R. S., S. Crosson, B. Damania, S. I. Miller & E. J. Rubin. 2016. Next-generation high-throughput functional annotation of microbial genomes. – *mBio*, 7(5): e01245-16, doi: 10.1128/mBio.01245-16.
- Bauer, J. 2019. Die unbekannte Welt der Mikrobiome. Einführung in das Rundgespräch. – In: Bayer. Akademie der Wissenschaften (Hrsg.): Die unbekannte Welt der Mikrobiome. Pfeil, München: 11–15.
- Berry, D., E. Mader, T. K. Lee, D. Woebken, Y. Wang, D. Zhu, M. Palatinszky, A. Schintlmeister, M. C. Schmid, B. T. Hanson, N. Shterzer, I. Mizrahi, I. Rauch, T. Decker, T. Bocklitz, J. Popp, C. M. Gibson, P. W. Fowler, W. E. Huang & M. Wagner. 2015. Tracking heavy water (D<sub>2</sub>O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 112(2): E194–E203, doi: 10.1073/pnas.1420406112.
- Bloom, J. D. & F. H. Arnold. 2009. In the light of directed evolution: Pathways of adaptive protein evolution. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106 (Suppl. 1): 9995–10000.
- Daims, H., E. V. Lebedeva, P. Pjevac, P. Han, C. Herbold, M. Albertsen, N. Jehmlich, M. Palatinszky, J. Vierheilig, A. Bulaev, R. H. Kirkegaard, M. von Bergen, T. Rattei, B. Bendinger, P. H. Nielsen & M. Wagner. 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. – *Nature*, 528(7583): 504–509.
- Erisman, J. W., M. A. Sutton, J. Galloway, Z. Klimont & W. Winarwarter. 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. – *Nature Geoscience*, 1(10): 636–639.
- Fasan, R., M. M. Chen, N. C. Crook & F. H. Arnold. 2007. Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450(BM3) exhibiting natively catalytic properties. – *Angewandte Chemie International Edition*, 46(44): 8414–8418.
- Gans, J., M. Wolinsky & J. Dunbar. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. – *Science*, 309(5739): 1387–1390.
- Haller, D. 2019. Mikrobiom-Signaturen und ihre funktionale Bedeutung in der Medizin. – In: Bayer. Akademie der Wissenschaften (Hrsg.): Die unbekannte Welt der Mikrobiome. Pfeil, München: 101–108.
- Hug, L. A., J. Brett, K. A. Baker, C. T. Brown, A. J. Probst, C. J. Castelle, C. N. Butterfield, A. W. Hersendorf, Y. Amano, K. Ise, Y. Suzuki, N. Dudek, D. A. Relman, K. M. Finstad, R. Amundson, B. C. Thomas & J. F. Banfield. 2016. A new view of the tree of life. – *Nature Microbiology*, 1: 16048, doi:10.1038/nmicrol.2016.48.
- Kits, K. D., C. J. Sedlacek, E. V. Lebedeva, P. Han, A. Bulaev, P. Pjevac, A. Daebeler, S. Romano, M. Albertsen, L. Y. Stein, H. Daims & M. Wagner. 2017. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. – *Nature*, 549(7671): 269–272.
- Koch, H., A. Galushko, M. Albertsen, A. Schintlmeister, C. Gruber-Dorninger, S. Lüscher, E. Pelletier, D. Le Paslier, E. Spieck, A. Richter, P. H. Nielsen, M. Wagner & H. Daims. 2014. Growth of nitrite-oxidizing bacteria by aerobic hydrogen oxidation. – *Science*, 345(6200): 1052–1054.
- Koch, H., S. Lüscher, M. Albertsen, K. Kitzinger, C. Herbold, E. Spieck, P. H. Nielsen, M. Wagner & H. Daims. 2015. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 112(36): 11371–11376.
- Lederberg, J. 2004. Of men and microbes. – *New Perspectives Quarterly*, 20(3): 52–55.
- Lüders, T. 2019. Aquatische Mikrobiome und ihre Bedeutung für die Wasserqualität. – In: Bayer. Akademie der Wissenschaften (Hrsg.): Die unbekannte Welt der Mikrobiome. Pfeil, München: 45–56.
- Palatinszky, M., C. Herbold, N. Jehmlich, M. Pogoda, P. Han, M. von Bergen, I. Lagkouvardos, S. M. Karst, A. Galushko, H. Koch, D. Berry, H. Daims & M. Wagner. 2015. Cyanate as an energy source for nitrifiers. – *Nature*, 524(7563): 105–108.
- Steffen, W., K. Richardson, J. Rockström, S. E. Cornell, I. Fetzer, E. M. Bennett, R. Biggs, S. R. Carpenter, W. de Vries, C. A. de Wit, C. Folke, D. Gerten, J. Heinke, G. M. Mace, L. M. Persson, V. Ramanathan, B. Reyers & S. Sörlin. 2015. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. – *Science*, 347(6223): 1259855, doi: 10.1126/science.1259855.

- Strous, M., E. Pelletier, S. Manganot, T. Rattei, A. Lehner, M. W. Taylor, M. Horn, H. Daims, D. Bartol-Mavel, P. Wincker, V. Barbe, N. Fonknechten, D. Vallenet, B. Segurens, C. Schenowitz-Truong, C. Médigue, A. Collingro, B. Snel, B. E. Dutilh, H. J. Op den Camp, C. van der Drift, I. Cirpus, K. T. van de Pas-Schoonen, H. R. Harhangi, L. van Niftrik, M. Schmid, J. Keltjens, J. van de Vossenberg, B. Kartal, H. Meier, D. Frishman, M. A. Huynen, H. W. Mewes, J. Weissenbach, M. S. Jetten, M. Wagner & D. Le Paslier. 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. – *Nature*, 440 (7085): 790–794.
- Wagner, M. 2009. Single-cell ecophysiology of microbes as revealed by Raman microspectroscopy or secondary ion mass spectrometry imaging. – *Annual Review of Microbiology*, 63: 411–429.
- Wang, Y., W. E. Huang, L. Cui & M. Wagner. 2016. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy. – *Current Opinion in Biotechnology*, 41: 34–42.
- Whipps, J. M., K. Lewis & R. C. Cooke. 1988. Mycoparasitism and plant disease control. – In: Burge, N. M. (ed.): *Fungi in Biological Control Systems*. Manchester University Press: 161–187.
- Winogradsky, S. 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. – *Ann. Inst. Pasteur*, 1: 213–231, 2: 257–275, 3: 760–777, 4: 92–100.
- 1891. Recherches sur les organismes de la nitrification. – *Ann. Inst. Pasteur*, 5: 577–616.
- 1892. Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification. – *Archives de Sciences Biologiques*, 1: 87–137.
- Zuckermandl, E. & L. Pauling. 1965. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. – In: Bryson, V. & H. J. Vogel (eds.): *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York: 97–166.

## Diskussion

**E. von Mutius:** Vielen Dank für diese wunderbare Einführung in die unbekannte Welt der Mikrobiome. Zu Beginn gleich eine Frage zu der Funktionsforschung: Wo sehen Sie die Zukunft in diesem Bereich? Brauchen wir einfach noch mehr Forscher? Oder müssen wir das Forschungsfeld noch mehr ausweiten?

**M. Wagner:** Ich denke, die Zukunft liegt in der Synergie der verschiedenen Ansätze. Es handelt sich um so komplexe Fragestellungen, dass wir sie nur gemeinsam zwischen verschiedenen Disziplinen bearbeiten können. Wir brauchen dazu eine starke Bioinformatik und molekulare Ökologen, aber auch – und da müssen wir in der Ausbildung einen weiteren Schwerpunkt legen – Biochemiker und Physiologen. Das sind Disziplinen, die oft nicht ganz die Aufmerksamkeit erfahren, die sie verdienen, auch weil man in ihnen nicht so schnell publizieren kann. Um ein Gen eines unkultivierten Mikroorganismus zu verstehen, muss man es heterolog, das heißt in einem anderen Wirt, exprimieren, das Protein aufreinigen und dann die Funktion untersuchen – da geht schnell eine ganze Doktorarbeit ins Land, bis man ein Gen, ein Protein versteht. Es wird aber meiner Meinung nach nicht anders gehen als hier in die Tiefe zu gehen. Es wird daher in diesem Bereich zu einer gewissen Verlangsamung kommen, aber ich denke, das ist letztlich spannender als noch Hunderte neuer Genome zu sequenzieren – was nicht heißt, dass wir das nicht auch tun sollten. Aber Genomforschung bedeutet eigentlich, Hypothesen zu generieren, und ich plädiere dafür, diese Hypothesen dann auch zu testen, und das kann die Mikrobiomforschung durchaus leisten.

**E. Grill:** Sie haben gesagt, dass nur 17 % des Düngemiteleinsatzes letztlich beim Menschen auf den Tisch ankommen und dass es daher günstig wäre, die Umwandlung von Ammoniak in Nitrit und Nitrat zu verhindern, damit nicht so viel ausgewaschen wird. Soweit ich aber weiß, ist Ammoniak für Pflanzen relativ toxisch und Dünger, die auf Ammoniak basieren, sind problematisch. Nitrat ist für die Pflanzen sehr viel besser nutzbar. Ist es unter diesem Aspekt

wirklich so problematisch, wenn Ammoniak von Mikroorganismen in Nitrat umgewandelt wird – einmal davon abgesehen, dass sehr oft zu viel gedüngt und daher auch zu viel ausgewaschen wird?

**M. Wagner:** Die Auswaschung ist tatsächlich ein großes Problem. Sie haben natürlich recht, dass die Pflanze sowohl Ammonium als auch Nitrat assimilieren kann. Die Frage ist vielmehr, wie lange der Stickstoff im Boden bleibt. Das negativ geladene Nitrat wird wesentlich schneller ausgewaschen als das positiv geladene Ammonium und gelangt so in das Grundwasser, in die Flüsse und in das Meer. Zu den sogenannten Todeszonen im Meer kommt es zum großen Teil über Stickstoffeintrag. Dazu kommt, dass Nitrat der Elektronenakzeptor für die anaerobe Atmung der Denitrifizierer ist. Es wird auf diese Weise wieder in Stickstoff ( $N_2$ ) umgewandelt und steht den Pflanzen dann nicht mehr zur Verfügung. Das kann bei Ammonium nicht passieren. Gerade in staunassen Böden, wo es zu anaeroben Bedingungen kommt, wird auf diese Weise im Prinzip der Haber-Bosch-Prozess umgedreht: Erst produzieren wir mit viel Energieaufwand aus Stickstoff Dünger und dann setzen ihn die Bakterien wieder zu Stickstoff um. Dass es für Pflanzen durchaus gut sein kann, die Nitrifizierung zu hemmen und damit die Ammoniumkonzentration im Boden zu erhöhen, sieht man daran, dass es sehr viele Pflanzen gibt, die natürliche Nitrifizierungsinhibitoren produzieren und im Wurzelbereich ausscheiden. Nur sind das in der Regel keine landwirtschaftlichen Nutzpflanzen. Von der Evolution her ist das aber sehr spannend. Die Inhibitor-produzierenden Pflanzen haben nämlich »gelernt«, dass ihnen der Stickstoff länger erhalten bleibt, wenn sie die Nitrifizierung hemmen, indem sie Chemikalien in der Rhizosphäre ausscheiden. Diese natürlichen Nitrifizierungsinhibitoren besser verstehen zu lernen, ist einer der Ansätze, der derzeit verfolgt wird. Man will z. B. versuchen, Pflanzen gentechnisch so zu modifizieren, dass sie solche Inhibitoren natürlicherweise in Konzentrationen produzieren, die notwendig sind, um in ihrer Umgebung die Nitrifizierung einzudämmen. Zum Teil werden

andere, künstlich produzierte Inhibitoren der Nitrifizierung jetzt schon den Düngemitteln künstlich zugesetzt.

**E. Grill:** Was sind das für Inhibitoren?

**M. Wagner:** Als synthetische Düngemittelzusätze werden eine Reihe von Verbindungen, wie zum Beispiel 3,4-Dimethylpyrazolphosphat (DMPP), Nitrapyrin, Dicyandiamid und Thioharnstoff verwendet. In den letzten Jahren wurde die Forschung im Bereich der sogenannten biologischen Nitrifizierungsinhibitoren, die von Pflanzen produziert werden, intensiviert. So produziert beispielsweise das tropische Gras *Brachiaria humidicola* Brachialacton, das effektiv die Nitrifizierung hemmt. Viele dieser Hemmstoffe inhibieren die Ammoniummonooxygenase, das Schlüsselenzym der Nitrifizierung. Es sind relativ hydrophobe Verbindungen, die in das aktive Zentrum des Enzyms gehen und es dort als kompetitive Inhibitoren ausschalten. Die Pflanzen nützen dabei sozusagen aus, dass das Enzym relativ viele verschiedene Substrate umsetzen kann und somit auch durch eine Reihe kompetitiver Inhibitoren beeinflusst wird.

**T. Gschlößl:** Sie haben kurz auf die Bedeutung von Mikrobiomen bei der biologischen Abwasserreinigung hingewiesen. Wie beurteilen Sie die

möglichen und klimarelevanten Emissionen von Lachgas bei einer unvollständigen Nitrifizierung und Denitrifizierung z. B. in Abwasserteich-Anlagen?

**M. Wagner:** Für den Klima-Footprint einer Kläranlage ist die Lachgasproduktion durchaus relevant, aber global betrachtet sind die Beiträge aus den Kläranlagen gegenüber anderen Quellen, vor allem der Landwirtschaft, relativ gering. Lachgas wird allerdings nicht nur bei der Denitrifizierung gebildet, sondern auch als Nebenprodukt bei der Nitrifizierung. Hier ist die Entdeckung des Comammox, der übrigens in Kläranlagen gar nicht so selten vorkommt, besonders interessant. Wir haben noch nicht publizierte Daten, nach denen Comammox viel weniger Lachgas als Nebenprodukt bildet als die konventionellen Nitrifizierer. Wir würden natürlich gerne herausfinden, welche Faktoren dazu führen, dass manche Kläranlagen voller »Comammöxe« sind und andere überhaupt keine haben. Wenn man Lachgas sparen will, könnte man Comammox anstelle der klassischen Nitrifizierer etablieren und so die Lachgasemission senken. Das gilt übrigens auch für die Landwirtschaft, der Comammox kommt ja auch in Böden vor. Wenn man herausfinden würde, welche Maßnahmen den Comammox fördern, könnte man damit die Lachgasemission aus der Nitrifizierung senken.

