



---

## Zwischenbericht Dezember 2009

Rebecca Störmer

[Rebecca.stoermer@awi.de](mailto:Rebecca.stoermer@awi.de); 04725 819 3233

Gunnar Gerdts

[Gunnar.gerds@awi.de](mailto:Gunnar.gerds@awi.de); 04725 819 3245

Alfred Wegener Institut für Polar- und Meeresforschung,  
Biologische Anstalt Helgoland, 27483 Helgoland

### Teilprojekt 1

Analyse funktioneller Gene in bakteriellen Sedimentgemeinschaften im Bereich der Einbringungsstelle, Tonne E3

Hamburg Port Authority (HPA), Neuer Wandrahm 4, 20457 Hamburg

In Teilprojekt 1 wird untersucht, ob im Bereich der Baggergut-Einbringungsstelle gegenüber dem Außengebiet und dem Referenzgebiet (siehe Abbildung 2) unterschiedliche bakterielle Schadstoff-Abbau oder -Transformations-Gene (Quecksilber Reduktase, Cadmium-Transporter, verschiedene Oxygenasen und Dioxygenasen) nachweisbar sind.

### Teilprojekt 2

Molekularbiologische Fingerprints bakterieller Sedimentgemeinschaften im Bereich der Einbringungsstelle, Tonne E3

Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR), Hamburger Chaussee 25, 24220 Flintbek

In Teilprojekt 2 wird untersucht, ob im Bereich der Baggergut-Einbringungsstelle gegenüber dem Außengebiet und dem Referenzgebiet (siehe Abbildung 2)



unterschiedliche bakterielle Gemeinschaften nachweisbar sind. Ferner wird mittels multivariater statistischer Methoden geprüft, ob parallel erhobene physikalische und chemische Parameter Einfluss auf die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft ausüben.

### **Teilprojekt 3**

Molekularbiologische Fingerprints bakterieller Gemeinschaften im Bereich der Einbringungsstelle, Tonne E3: Baggergut und Wasserproben

Bundesanstalt für Gewässerkunde, Am Mainzer Tor 1, 56068 Koblenz

In Teilprojekt 3 wird die bakterielle Gemeinschaft des jeweiligen Baggergutes bei einzelnen Verklappungs-Kampagnen analysiert. Ferner werden während der Kampagnen Wasserproben hinsichtlich ihrer Bakteriengemeinschaft analysiert.

Mittels multivariater statistischer Methoden wird geprüft, ob parallel erhobene physikalische und chemische Parameter Einfluss auf die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft ausüben.

### **Teilprojekt 4**

Molekularbiologische Fingerprints bakterieller Sedimentgemeinschaften im Strandbereich Duhnen/Cuxhaven

Nds. Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz (NLWKN-BSt Norden-Norderney), An der Mühle 5, 26548 Norderney/Ostfriesland

In Teilprojekt 4 wird die bakterielle Gemeinschaft des verschlickenden Bereiches des Duhner Strandes sowie eines Sand- und Schlickwatt Referenzgebietes bei Cuxhaven analysiert. Mittels multivariater statistischer Methoden wird geprüft, ob Rückschlüsse auf die Herkunft des Schlickmaterials gezogen werden können.



## Bisher geleisteten Arbeiten und Analysen

### Probennahmen

Zur Beobachtung ggf. mit der Umlagerung von Hamburger Hafensedimenten in Zusammenhang stehender ökosystemarer Auswirkungen im Verbringungsgebiet an E3 wurden im Rahmen der letzten Probennahme-Kampagne der HPA im Jahr 2009 vom 05. bis 09. August im Verbringungsgebiet, Außen- und Referenzgebiet Proben genommen. Das bislang durchgeführte Monitoring beinhaltete Analysen des Wasserkörpers, der Sedimente, des Makrozoobenthos, der Fischfauna etc. (siehe HPA-Bericht). Erstmalig wurden im August auch mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt um einen Einfluss der Verbringung der Hafensedimente auf die marine Bakteriengemeinschaft des Benthos zu untersuchen.

Die Sedimentproben wurden mit einem Van Veen Greifer (mit Klappen) entnommen. Vor der Entnahme von Unterproben wurde das Sediment homogenisiert. Alle mikrobiologischen Unterproben wurden parallel zu denen der HPA genommen. Die Proben wurden an jeder Beprobungsstelle in drei Replikaten (Abb.1) genommen, in sterilen Plastikgefäßen (50ml) sofort gefroren und nach der Ausfahrt bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.



Abb.1: Probennahme für mikrobiologische Untersuchungen. Links: Sediment vor der Probenentnahme; Rechts: Replikate in sterilen 50 ml Falcon Tubes für mikrobiologische Untersuchungen



## Analyse der Bakteriengemeinschaft

Um zu überprüfen, ob die natürliche Benthos Bakteriengemeinschaft, von der Umlagerung der Hafensedimente beeinflusst wird, werden verschiedene mikrobiologische bzw. molekularbiologische Untersuchungsansätze verfolgt.

Die hier durchgeführte Analyse der Bakteriengemeinschaft basiert auf dem Fingerprintverfahren ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*). Diese Methode nutzt das Vorkommen hoch konservierter DNA-Sequenzen zwischen den ribosomalen Genorten (*intergenic spacer*), deren Länge für jede Bakterienspezies spezifisch ist. Diese DNA-Abschnitte werden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abb. 3). Das Resultat repräsentiert quasi einen Fingerabdruck der Bakteriengemeinschaft in der jeweiligen Probe. Vorab muss die DNA der Bakteriengemeinschaft allerdings aus dem Sediment extrahiert und aufgereinigt werden.

## Methodenetablierung zur DNA-Extraktion

Zur Gewinnung der DNA aus Mikroorganismen in Sedimenten sind in der Vergangenheit bereits eine Vielzahl von Methoden und Protokollen veröffentlicht worden, da die chemisch-physikalische Zusammensetzung von Sedimenten (beispielsweise hohes Vorkommen von Huminsäuren, sandige oder schlickige Sedimente) eine große Rolle bei der erfolgreichen Extraktion der DNA spielt. Deshalb wurden zu Beginn unserer Untersuchungen insgesamt sieben Methoden und Protokolle verglichen um ihre Effizienz im Hinblick auf die vorliegenden Sedimente im Verbringungs- und Referenzbereich zu testen. Hierfür wurden sowohl sandige (Verbringungsgebiet) als auch schlickige Sedimente (Referenzbereich) mit z.T. hohem Huminsäureaufkommen herangezogen. Die Methoden zur Extraktion der DNA basieren zum einen auf etablierten Protokollen aus der Literatur oder auf der Verwendung kommerzieller Kits (MOBIO, MPBIO, Qiagen).

Die verschiedenen Methoden zeigten Unterschiede in der Qualität und Quantität der extrahierten DNA. In Abbildung 2 ist die genomische DNA nach Anwendung von vier unterschiedlichen Extraktionsmethoden nach einer elektrophoretischen Auftrennung dargestellt. Während die Extraktion mit einigen Methoden gar keine oder stark verunreinigte DNA erbrachte, wurde die DNA bei anderer Methoden stark fragmentiert. Für die Tests der einzelnen Methoden wurden immer die gleichen Sedimentproben (hier Probennummern 344 und 61) verwendet, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Die erste Methode nach dem Kit UltraClean der Firma



MOBIO zeigt im oberen Teil des Bildes zwei schwache Banden. Diese Banden stellen die unfragmentierte, hochmolekulare genomische DNA der Proben dar. Die zweite Methode, von der gleichen Firma, aber einem anderen Kit (PowerSoil), zeigt ebenfalls die gewünschten Banden, allerdings mit mehr Intensität, also einer größeren Menge DNA, für Probe 61. Das Kit der Firma MPBIO FastDNA lässt erkennen, dass die DNA stark fragmentiert wurde. Es fehlt die definierte hochmolekulare Bande, stattdessen ist ein niedermolekularer Schmier im unteren Teil des Gelbildes zu sehen, der auf eine Fragmentierung der DNA in kleinere Moleküle schließen lässt. Nach der Verwendung des Stool Kits der Firma Qiagen, das nach Auskunft von Qiagen auch für die Extraktion bakterieller DNA aus Böden und Sedimenten verwendet werden kann, konnte mittels Gelelektrophorese keine extrahierte DNA nachgewiesen werden. Um die Effizienz der Methoden zu beurteilen, wurde die DNA der spezifischen Sequenzen nach Anwendung der verschiedenen Methoden mittels PCR amplifiziert und ein ARISA-Profil der konservierten Sequenzen der Gemeinschaftsstruktur erstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die starke Fragmentierung genomischer DNA dazu führt, dass längere Sequenzen nicht amplifiziert werden können, was bedeutet, dass einige Bakterienspezies dann nicht erfasst und nicht in die Analysen einfließen können. Die Methode basierend auf dem PowerSoil Kit der Firma MOBIO erzielte hingegen sehr saubere unfragmentierte DNA, die keiner weiteren Aufreinigung unterzogen werden musste und direkt in die PCR eingesetzt werden konnte. Die ARISA Profile basierend auf der mit dieser Methode extrahierten DNA bildete das größte Zahl an unterschiedlich großen Banden ab. Infolgedessen ist davon auszugehen, dass die Bakteriengemeinschaft komplett erfasst wurde. Alle weiteren DNA-Extraktionen werden daher mit Hilfe des PowerSoil Kits durchgeführt.

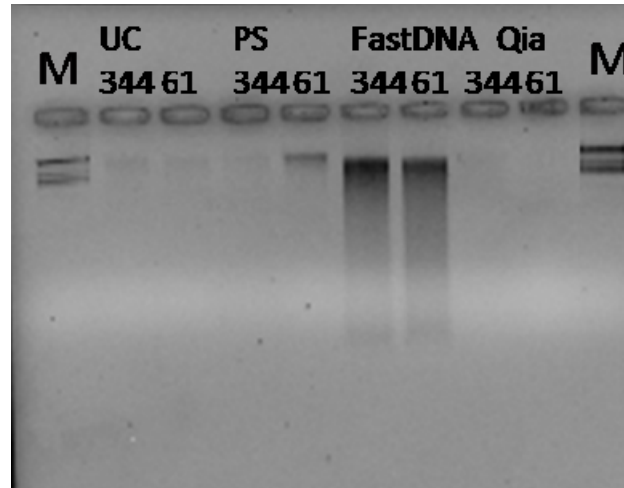


Abb.2: 0,8% Agarosegel zur Auftrennung genomischer DNA. Die Abbildung zeigt die genomische DNA der Proben 344 und 61 nach der Anwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden. Auf diesem Gel ist die DNA nach Anwendung von vier Methoden dargestellt. UC: UltraClean (MOBIO); PS: PowerSoil (MOBIO); FastDNA (MPBIO); Qia: Qiagen. Proben: 344; 61; Marker: M

### Etablierung der DNA Konzentration

Im nächsten Schritt musste geprüft werden, inwiefern der Einsatz unterschiedlicher DNA-Konzentrationen bei der PCR einen Einfluss auf die Profile der Bakteriengemeinschaft hat. Wird für den Amplifizierungsprozess mittels PCR zu wenig DNA eingesetzt, kann es passieren, dass nicht alle präsenten Bakterienspezies erfasst werden können. Der Einsatz einer zu großen Menge von DNA kann in manchen Fällen zu Inhibitionen während des Vorgangs führen, weshalb ebenfalls nicht alle Sequenzen abgebildet werden können, und somit ebenfalls Sequenzen fehlen. Um die Auswirkungen verschiedener DNA Konzentrationen bei der PCR auf die Darstellung der Bakteriengemeinschaft zu beurteilen, wurde die DNA Konzentration zuvor photometrisch bestimmt und in unterschiedlichen Mengen in die PCR eingesetzt. Die amplifizierten DNA-Sequenzen wurden danach auf ein spezielles Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses Gel ermöglicht eine hoch auflösende Darstellung der unterschiedlich langen PCR Fragmente in einer Probe. Das digitale Bild des Gels kann in Folge weiter bearbeitet und die resultierenden Informationen statistisch ausgewertet werden. In Abbildung 3 sind die ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*)-Profile der Proben 2 und 4 nach dem Einsatz unterschiedlicher DNA-Konzentrationen bei der PCR. In jeder Probe ist eine Vielzahl von Banden zu erkennen, wobei generell jede Bande eine



Bakterienspezies repräsentiert. Bei den Banden handelt es sich um die Intergenic Spacer Region zwischen den 16S und den 23S rRNA Genen, die in den verschiedenen Spezies unterschiedlich lang sind. Je nach Länge wandern diese in einem elektrischen Feld unterschiedlich weit. Dabei wandern größere Moleküle weniger weit als kleiner Moleküle. Für dieses Gel wurden die Konzentrationen 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 75 und 100ng DNA bei der PCR eingesetzt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei Erhöhung der Konzentration viele Banden während des Amplifikationsprozesses verloren gehen, bzw. nicht amplifiziert werden und dann nicht mehr im Profil nachzuweisen sind. Die besten Ergebnisse wurden für DNA Konzentrationen von 5-10ng DNA erzielt.

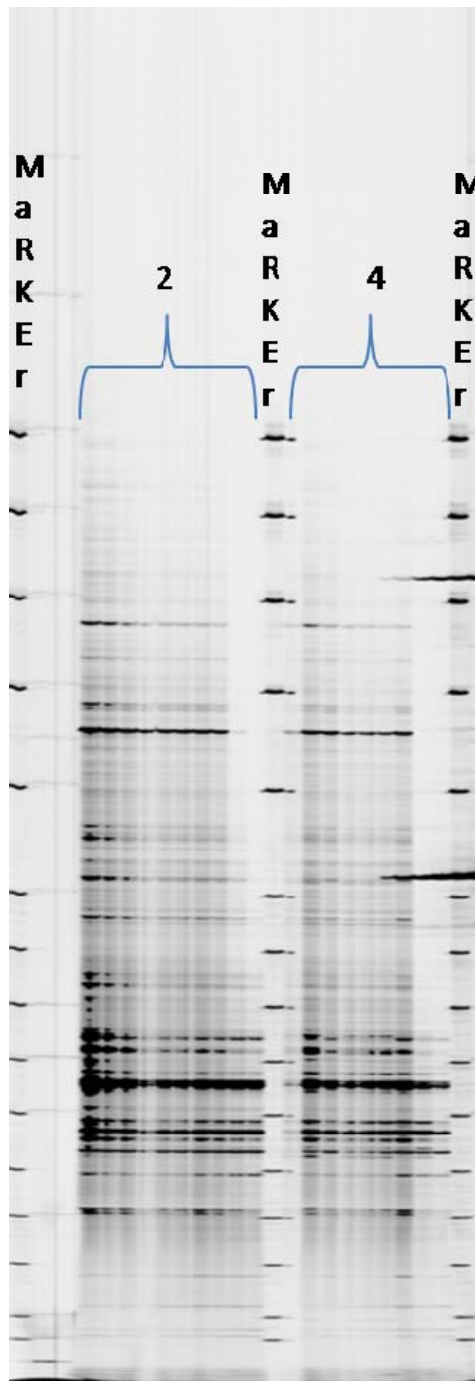


Abb.3: Digitales Bild eines Polyacrylamidgels. Diese Abbildung zeigt die ARISA-Profile der Proben 2 und 4. Die erste Hälfte dieses Gels zeigt den Einsatz unterschiedlicher DNA-Konzentrationen für Probe 2, die zweite Hälfte den gleichen





Vorgang für Probe 4. Es wurden von links nach rechts jeweils die DNA-Konzentrationen (ng): 5,10, 15,25,30,35,75,100 bei der PCR eingesetzt

### **Probenbearbeitung**

Es wurde von den Replikaten aller Probenahmestellen (390 Proben) die DNA der Mikroorganismen mit Erfolg extrahiert. Extraktionskits für weitere 1600 Proben sind bestellt worden und stehen für die Bearbeitung der nächsten Proben zur Verfügung.

Die Amplifizierung der DNA-Sequenzen wurde ebenfalls für alle Proben durchgeführt.

Im nächsten Schritt werden die Profile der Bakteriengemeinschaft der verschiedenen Proben erstellt. Für die Erstellung der ARISA-Profile ist es notwendig, dass ein adäquater Größenstandard zur Verfügung steht. Der Standard, den wir bisher genutzt haben, bildet nur Fragmentgrößen bis 1000 Basenpaare (bp) ab. Allerdings erwarten wir im Zuge unserer Untersuchungen auch Sequenzen die größer als 1000 bp sind. Wir testen gegenwärtig einen neuen Standard der von der vertreibenden Firma (Licor) zeitnah in ausreichender Menge und Qualität geliefert werden kann. Dieser Standard bildet dann auch Fragmentgrößen bis 1500 bp ab. Die Erstellung der Profile steht deshalb momentan noch aus und wird ab Januar 2010 durchgeführt.

Mittels multivariater Statistik erfolgen die Auswertung und der Vergleich der Gemeinschaft der verschiedenen Standorte (beispielsweise Verbringungsstelle-Referenzgebiet etc.). Diese Auswertungen sollen auch im Hinblick auf diverse Parameter, die durch HPA (Korngröße, Chemikalienbelastung etc.) und BfG (u.a. Toxizitätstests) erhoben wurden analysiert werden. Hierbei werden auftretende Bakterienspezies mit diesen Parametern in Zusammenhang gesetzt und ermittelt, ob das Auftreten bestimmter Spezies von diesen Parametern beeinflusst wird.

### **Ausblick**

Im nächsten Jahr soll die Erstellung der ARISA-Profile der Bakteriengemeinschaft erfolgen. Diese werden im Anschluss ausgewertet, um eventuelle Unterschiede in der Gemeinschaft im Vergleich zu Außenbereich und Referenzgebiet und dem eventuellen Einfluss parallel erhobener Parameter (beispielsweise Schwermetalle) auf die Bakteriengemeinschaft zu zeigen. Später werden die Proben dann auch auf Ebene funktioneller Gene untersucht. Damit soll ermittelt werden, ob unterschiedliche bakterielle Schadstoff-Abbau oder -Transformations-Gene (Quecksilber Reduktase, Cadmium-Transporter, verschiedene Oxygenasen und Dioxygenasen) in der



Gemeinschaft an der Verbringungsstelle im Vergleich zu Außenbereich und Referenzgebiet vorliegen.

Soweit bekannt ist im Zeitraum März-April die nächste Probennahmekampagne geplant bei der auch wieder Beprobungen der Bakteriengemeinschaft durchgeführt werden sollen. Hier sind wieder Profile der Gemeinschaft geplant, die Auskunft darüber geben sollen, ob die Gemeinschaft an der Verbringungsstelle im Vergleich zum Referenzgebiet verschieden ist. Parallel erhobene Daten zu physikalischen und chemischen Parametern werden ebenfalls analysiert um einen eventuellen Zusammenhang mit einer Veränderung in der Gemeinschaft zu zeigen.

Bei der nächsten anstehenden Verklappungen soll das Baggergut beprobt werden. Auch hier wird die Bakteriengemeinschaft im Hinblick auf parallel erhobene Daten zu physikalischen und chemischen Parametern analysiert.

Im Hinblick auf die Untersuchung der Bakteriengemeinschaft am Strand in Duhnen wurden alle Vorbereitungen getroffen die Probennahmen 2010 zu beginnen. Wir erhielten bereits die Standorte der Probennahmen durch die NLWKN, so dass wir unsere Probenahmestellen mit Hilfe von GPS angleichen werden. In diesem Zusammenhang soll dann auch das Elbewasser monatlich im Umfang von ca. 20 Litern beprobt werden. Das Seston soll in einem Teflontrichter absedimentieren (siehe beiliegende Literatur) und eine Analyse der Bakteriengemeinschaft des Sestons der Elbe stattfinden. Es soll die Bakteriengemeinschaft des Strandes und die des Sestons der Elbe analysiert und gegebenenfalls der Ursprung des Schlickmaterials anhand der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft ermittelt werden.