

Vibrio community response to a heatwave scenario in a
marine mesocosm experiment:
Quantification (qPCR of *16S rRNA*) and Community
Analysis (HRM of *hsp60* gene)

Bachelor's thesis

in the single-subject bachelor program

Biochemistry and molecular Biology

of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences

of the Christian-Albrecht-University of Kiel

submitted by

Lea Blum

First examiner: Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit

Second examiner: Dr. Antje Wichels

Kiel, December 2022

The experimental work for the bachelor's thesis was done from May 2022 until July 2022 in the working group *Microbial Ecology* at the Alfred-Wegener-Institute Helmholtz Centre for Polar- and Marine Research on Helgoland.

First examiner: Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit

Second examiner: Dr. Antje Wichels

ZUSAMMENFASSUNG

Die Nordsee ist dem Klimawandel und häufiger auftretenden extremen Klimaereignissen wie z.B. marinen Hitzewellen (MHWs) ausgesetzt. In Zusammenarbeit wurde ein Mesokosmenexperiment entwickelt, um die Auswirkungen dieser Veränderungen in der Nordsee auf Planktongemeinschaften zu untersuchen. Da die Gattung *Vibrio* spp. von wärmeren Wassertemperaturen profitiert, werden in dieser Studie die Auswirkungen von MHWs und zukünftigen Bedingungen in der Nordsee auf das Vorkommen von Vibrionen mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR), welche das *16S rRNA* Gen amplifiziert, untersucht. Im Hinblick auf den Klimawandel ist eine spezifische Gruppe von Vibrionen, die potentiell pathogenen Vibrionen (z.B. *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*), aufgrund ihres Risikos für die menschliche Gesundheit von besonderem Interesse. Bisher gibt es nur wenige Studien über die Anzahl von *Vibrionen* in der Nordsee, die als Krankheitserreger in Frage kommen. Somit ist ein weiteres Ziel dieser Studie, die Entwicklung einer hochauflösenden Schmelzanalyse (High Resolution Melt, HRM), welche auf das *hsp60* Gen dieser Gruppe abzielt. Dieses funktionelle Gen bietet im Vergleich zum ribosomal phylogenetischen Markergen, mit 96-100 % Sequenzidentität innerhalb einer Art und 71-82 % Sequenzidentität zwischen verschiedenen *Vibrio* Arten, ein hohes Auflösungspotenzial für die Gattung *Vibrio*. In dieser Studie wurden 10 verschiedene *Vibrio* Arten für die Entwicklung der Methode ausgewählt. Aus diesen wurden fünf Mischkulturen entworfen und weiter wurden vier exemplarische Mesokosmosproben ausgewählt, um zu untersuchen, ob die HRM Analyse des *hsp60* Gens in der Lage ist, gemischte Proben aufzulösen und Unterschiede in *Vibrio* Gemeinschaften darzustellen, wobei der Schwerpunkt auf potenziell pathogenen Arten liegt.

Die Quantifizierung auf Gattungsebene, in den untersuchten Mesokosmenproben, zeigt eine Korrelation zwischen der Vibrionenanzahl und der Temperatur, mit Gesamtzahlen von 1×10^5 n / L im Szenario ESSP 8.5 MHW und 2.4×10^4 n / L im Szenario ambient MHW, während der MHW. Dies unterstützt die Hypothese einer Zunahme dieser Gattung in der Nordsee während MHWs und steigenden Temperaturen.

Die HRM Analyse auf Grundlage des *hsp60* Gens ist in der Lage Veränderungen innerhalb einer Vibrionengemeinschaft darzustellen. Die Analyse einzelner *Vibrio* Arten weist eine klare Unterscheidung der einzelnen Schmelzpunkte auf. Diese reichen von 85,15°C (*V. aestuarianus*) bis 88,94°C (*V. cholerae*). Die Analyse der Mischkulturen zeigte weiter, dass Unterschiede innerhalb einer Gemeinschaft mittels HRM nachweisbar sind. Zuletzt wurden exemplarisch vier Mesokosmenproben analysiert. Die Schmelzkurven unterschieden sich in

Bezug auf Höhe und Breite der Peaks. Die MHW Szenarioanalyse der Schmelzdiagramme zeigt Plateaus und unklare Schmelzpeaks, welche auf eine komplexe Gemeinschaft verschiedener Arten hinweisen. Ein ausgeprägter Schmelzpeak bei 88,9°C im Zukunftsszenario ESSP 8.5 deutet auf eine Zunahme von *V. cholerae* (Schmelzpunkt 88,94°C) hin, welches bei wärmeren Wassertemperaturen und MHWs in größerer Menge auftritt. Dennoch werden weitere Studien empfohlen, in denen Sequenzierungsansätze mit den erstellten Schmelzkurven verglichen werden, um eine sicherere Identifizierung von potenziell pathogenen Vibrionen zu ermöglichen. Dies ist eine Voraussetzung für das Erfassen von *Vibrio* Zunahmen, welche eine potentielle Gefahr für die menschliche Gesundheit in zukünftigen Szenarien und insbesondere während MHWs darstellen.

ABSTRACT

The North Sea is subjected to Climate Change and more frequent extreme climate events, such as marine heatwaves (MHWs). A mesocosm experiment was designed in cooperation to investigate their effects on the planktonic community. As the genus *Vibrio* spp. profits from warmer water temperatures, the effects of MHWs and future conditions in North Sea waters on the *Vibrio* abundance are examined in this study applying a quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) targeting the *16S rRNA* gene. Regarding Climate Change, a specific group of *Vibrio*, the potentially pathogenic *Vibrio* spp. (e.g., *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*) are of particular interest due to their risk for human health. So far, there are only few studies on the *Vibrio* abundance of potentially pathogen species in the North Sea. One aim in this study is therefore to develop a High Resolution Melt (HRM) analysis targeting the *hsp60* gene for this important group. This functional gene provides high resolution potential for the genus *Vibrio* as compared to the ribosomal phylogenetic marker gene with 96-100 % sequence identity within a species and 71-82 % sequence identity among different *Vibrio* species. In this study 10 *Vibrio* species were selected for the method development, five designed mock communities and exemplarily four mesocosm samples were used to investigate whether the HRM analysis of the *hsp60* gene is able to resolve mixed samples and if shifts of the *Vibrio* community can be visualized focussing on potentially pathogenic species.

The quantification on the genus level shows a correlation of *Vibrio* abundance and temperature in the analyzed mesocosm samples, with total counts of 1×10^5 [n / L] in the treatment ESSP 8.5 MHW and 2.4×10^4 [n / L] in the treatment ambient MHW, during the MHW. This supports the hypothesis of an increase in abundance of this genus in North Sea waters during MHWs and rising temperatures.

Concentrating on the HRM analysis based on *hsp60* gene, shifts within the *Vibrio* community are shown. The initial analysis of single *Vibrio* species clearly distinguished melting points of the different species. These range from 85.15°C (*V. aestuarianus*) to 88.94°C (*V. cholerae*). The analysis of mock communities proved that differences within the community are detectable. Finally, four exemplary mesocosm samples were analyzed. The profiles of these melting curves showed differences with respect to height and width of the peaks. However, the MHW scenario analysis of the melting plots displays plateaus and unclear melting peaks, which indicates a complex community of various species. A prominent melting peak at 88.9°C, in the future scenario ESSP 8.5 hints to an increase of *V. cholerae* (melting point 88.94°C), which might occur in higher abundance during warmer water temperatures and MHWs. Nonetheless,

further studies, comparing sequencing assays with the generated melting curves, are recommended for a more secure identification of potentially pathogenic *Vibrio* spp.. This is a prerequisite for the detection of increasing *Vibrio* abundances in future scenarios and specifically during MHWs which potentially cause a risk to human health.