

Die tiefe terrestrische Biosphäre der Erde beherbergt die Mehrheit der Prokaryoten, also Archaeen und Bakterien, auf unserem Planeten, und doch wissen wir sehr wenig darüber, wie diese Mikroben miteinander, mit ihrem Ökosystem und potenziellen Viren interagieren. Alexander Probst untersucht mit seiner Arbeitsgruppe die Wechselwirkungen von Mikroben in tiefen unterirdischen Ökosystemen, indem er deren Erbgut entschlüsselt.

Eine Reise zum Untergrund der Erde

Über die Interaktionen von Mikroorganismen
und ihre Infektionen in tiefen Regionen der Erdkruste

Von Alexander Probst

Obwohl die Mehrheit der Biomasse auf der Erde von Pflanzen und Tieren bereitgestellt wird¹, ist die Gruppe der Mikroorganismen genetisch am vielseitigsten. Nach wissenschaftlichen Hochrechnungen existieren etwa 260.000 Arten von Mikroben, die jedes denkbare Ökosystemen besiedeln². Die Mehrheit der Mikroorganismen gehört zu den Reichen der Bakterien und Archaeen – gemeinsam als Prokaryoten bezeichnet – aber auch mikroskopische Eukaryoten, wie das allgemein bekannte Pantoffeltierchen, werden zu dieser Gruppe gezählt. Mikroorganismen sind jedoch nicht

nur die diversesten Lebewesen auf unserem Planeten, sondern auch die häufigsten: Heutige Hochrechnungen gehen davon aus, dass die Erde mit ungefähr ein- bis zweimal 10^{30} Prokaryoten besiedelt ist³. Obwohl ihre Größe gerade mal zwischen einem knappen Millimeter (750 μm) und 0,2 μm im Durchmesser liegt, könnte man mit ihrer gesamten Anzahl nebeneinandergelegt die Erde circa zehnmal überziehen.

Mikroorganismen auf dem blauen Planeten sind sehr unregelmäßig verteilt. Während wir in unserem Lebensraum auf der Oberfläche, der sogenannten kritischen Zone, gerade

mal drei mal 10^{29} Mikroorganismen wiederfinden, beherbergen die Meere etwa ein mal 10^{29} mikrobielle Zellen. Die Mehrheit und damit etwa 70 Prozent aller Mikroben ist jedoch im Untergrund unseres Planeten beheimatet, also an Orten, die nur sehr schwer für uns Menschen zugänglich sind³. Die Gesamtheit der Organismen, die im Untergrund leben bezeichnet man als tiefe Biosphäre. Obwohl es vereinzelt Berichte von Nematoden (Fadenwürmern) in der tiefen Biosphäre gibt⁴, besteht sie unseres Wissens momentan fast ausschließlich aus Prokaryoten, also Archaeen und Bakterien. Aber nicht

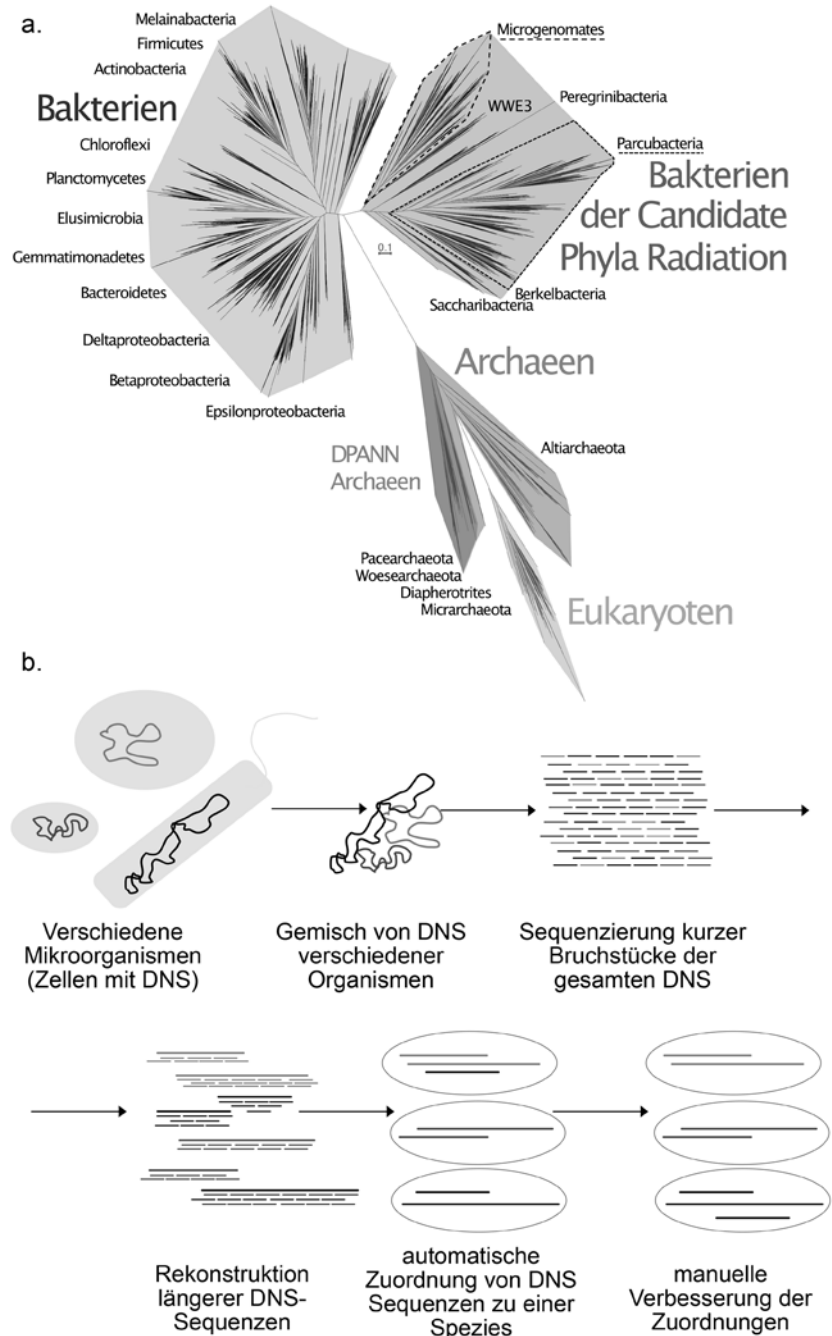


Alexander Probst. Foto: Vladimir Unkovic

nur darin unterscheidet sich die tiefe Biosphäre von der Biosphäre der kritischen Zone. Licht, wesentlicher Energielieferanten für viele Organismen auf der Erde, ist im Untergrund nicht vorhanden. Ebenso findet sich meist sehr wenig Sauerstoff, der für Lebewesen auf der Erde der beste Elektronenakzeptor für die Atmung ist.

Entschlüsselung des Erbguts der tiefen Biosphäre

Die Diversität von Prokaryoten der tiefen Biosphäre innerhalb eines Ökosystems kann sehr eingeschränkt oder aber auch extrem groß sein (Abb. 1a). Zum Beispiel kann ein Grundwasserleiter fast alle bekannten bakteriellen Phyla enthalten⁵. Diese große Diversität kann man jedoch nur mit molekularen Methoden detektiert werden, da wir nur 0,1 bis ein Prozent aller Mikroben im Labor kultivieren können. Metagenomik ist eine dieser molekularen Methoden, bei welchen man das komplette Erbgut (DNS) einer mikrobiellen Gemeinschaft mittels Sequenzierung untersucht. Da das Erbgut nach einer Sequenzierung ungeordnet vorliegt, muss dieses zunächst in größere Bestandteile assembliert und schlussendlich zu Genomen, also DNS-Strängen eines Mikroorganismus, wieder gruppiert werden (Abb. 1b). Für beide Schritte sind relativ komplexe Algorithmen notwendig, trotzdem sind die Ergebnisse nicht immer perfekt. Wir konnten kürzlich zeigen, dass fast in 80 Prozent der Fälle rekonstruierte Genome durch menschliche Korrekturen substantiell verbessert werden können⁶. Dazu entwickelten wir eine interaktive Software, die wir sehr erfolgreich in verschiedenen Lehrveranstaltungen an der Universität Duisburg-Essen einsetzen und nun auch öffentlich anderen Wissenschaftler*innen zur Verfügung stellen⁶. Mit Hilfe dieser Software rekonstruierten wir hunderte von Genomen von Bakterien und Archaeen der tiefen Biosphäre (z.B. Borne-



(1) Stammbaum des Lebens basierend auf genomischen Daten und die Erzeugung von genomischen Daten aus Umweltpflanzen.
 a. Stammbaum basierend auf 3800 Genomen von Bakterien, Archaeen, und Eukaryoten. Einige Namen von Phyla und Klassen, die häufig in der tiefen Biosphäre vorkommen sind entsprechend angegeben. Die Bakterien der Candidate Phyla Radiation sowie DPANN Archaeen sind hervorgehoben. Bitte beachten, dass die tiefen Abzweigungen im Baum nicht aufgelöst sind, da noch Stand aktueller Forschung.
 b. Schematischer Ablauf der Methode (Genom-aufgelöste Metagenomik) zur Erstellung von Genomen aus Umweltpflanzen. Bitte beachten, dass der letzte Schritt hier einen Fehler des vorherigen ausbessert.

Quelle: eigene Darstellung. 1a abgeändert aus: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12268-019-1304-7>

mann⁷). Viele Gene dieser Genome zeigten wenig Verwandtschaft mit bereits bekannten Genen in Datenbanken und wurde kurzerhand als „dunkle Materie der Mikrobiologie“ bezeichnet⁸. Beispielsweise fanden wir neuartige CRISPR-Systeme (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) in noch unkultivierten, kleinen, symbiotischen Bakterien⁹. CRISPR-Systeme sind allgemein Immunsysteme von Prokaryoten gegen Viren oder andere mobile genetische Elemente, jedoch wird das System heutzutage massiv in der Erforschung des menschlichen Genoms eingesetzt. Dabei funktioniert das CRISPR-System als „Genschere“, um das menschliche Genom zu editieren. Die im Untergrund gefundenen CRISPR-Systeme waren kompakter als bisher bekannte Systeme und sind ein vielversprechender Kandidat für zukünftige biotechnologische Anwendungen⁹.

Entgasung aus dem Mantel als Antriebskraft für die tiefe Biosphäre

Bisher geht man davon aus, dass Mikroorganismen in tieferen Erdschichten meist relativ inaktiv sind, nur wenig Metabolismus betreiben und sich selten teilen. Dieser Frage gingen wir nach, indem wir bakterielle Genome von Proben aus verschiedenen Tiefen der Erdkruste analysierten. Dabei machten wir uns die Tatsache zu Nutze, dass Mikroben ihr Genom replizieren müssen, um sich zu teilen. Diese Replikation kann man über die Anzahl der Sequenzbruchstücke im Metagenom entsprechend abschätzen. Mit Hilfe unserer Analyse sagten wir vorher, dass mit zunehmender Tiefe die Teilung der Bakterien linear abnimmt⁷. Jedoch stellten Ökosysteme, die durch Entgasung von hohen Mengen von Kohlendioxid (CO₂) aus dem Mantel oder Kalkstein beeinflusst sind, eine Ausnahme dar. Hier sagten wir durchweg hohe Teilungsraten und Zellzahlen bis 5 mal 10⁶ Mik-

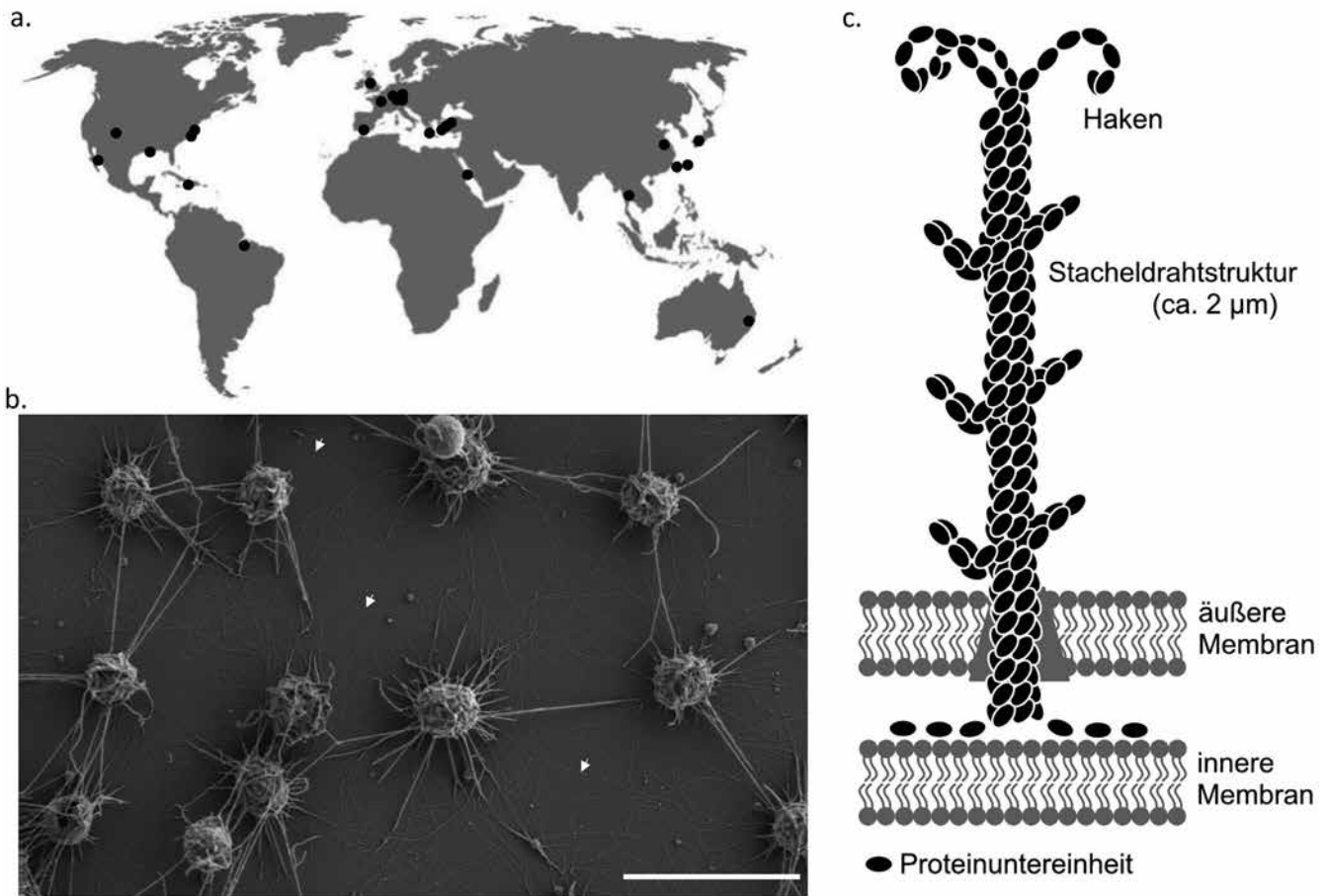
roben pro Milliliter vorher, sodass diese Ökosysteme zugänglich durch sogenannte CO₂-Geysire als „Hotspots“ der tiefen Biosphäre betrachtet werden können. CO₂-Geysire sind in der Regel Kaltwassergeysire und haben darüber hinaus den Vorteil, dass sie sehr einfachen Zugang zu Probenmaterial aus der Tiefe ermöglichen. Sie folgen meist einem regelmäßigen Zyklus, der sich zwischen einigen Minuten bis mehrere Tage strecken kann. Dabei wird Grundwasser aus tieferen Schichten durch aufsteigendes CO₂ (aus dem Mantel oder ausgewaschen aus Kalkstein) zur Oberfläche gedrückt. CO₂-Geysire erreichen erstaunliche Ausbruchshöhen; mit bis zu 70 Metern ist der Geysir Andernach nahe der Vulkaneifel der weltweite Spitzenreiter⁷.

Die mikrobiellen Gemeinschaften, die sich in Kaltwassergeysiren finden, können sehr einfach gestrickt⁷ oder aber auch relativ komplex sein und fast 1.000 verschiedene Spezies umfassen¹⁰. Obwohl die Organismen in diesen Geysiren extremen Druck ausgesetzt sind, unterscheiden sich die metabolischen Eigenschaften der mikrobiellen Gemeinschaften nicht unbedingt von jenen anderer Ökosysteme im Untergrund⁷. Allgemein besitzen alle Organismen der tiefen Biosphäre eine große Kapazität, Wasserstoff zu verstoffwechseln, der entweder durch fermentative Mikroorganismen gebildet wird oder aber geologischen Ursprungs ist. Gase aus dem Mantel enthalten zum Beispiel zu einem kleinen Prozentteil auch Wasserstoff und Schwefelwasserstoff, deren Oxidation die nötige Energie für das Leben in der Tiefe möglich macht. Zusammen mit der Fixierung von CO₂ ist diese Lebensweise als Chemolithoautotrophie bekannt. Je nach Konzentration von Sauerstoff herrschen innerhalb der CO₂-kontaminierten Grundwasserleiter verschiedene CO₂-Fixierungswege bei Mikroorganismen vor, was unter anderem an der Sensitivität der Enzyme gegenüber

Sauerstoff liegt¹¹. In der Tat konnten wir mittels Isotopenanalysen von Lipiden zeigen, dass die komplette Biozönose in CO₂-angereicherteren Grundwasserleitern über CO₂ als Kohlenstoffquelle angetrieben wird¹⁰. Somit ist Autotrophie, also anorganischen Kohlenstoff wie CO₂ als Kohlenstoffquelle zu verwenden, sehr weit in CO₂-reichen Ökosystemen verbreitet und man findet eine große Diversität an Mikroorganismen mit dieser Fähigkeit. Bestimmte Mikroorganismen, Archaeen der Candidatus-Gattung *Altiarchaeum*, können in diesen Grundwasserleitern als dominante Prokaryoten auftreten und circa 70 Prozent der Gemeinschaft ausmachen^{7,11,12}.

Mit Enterhaken und Stacheldraht in der Tiefe verankert

Organismen der Candidatus-Gattung *Altiarchaeum* (Plural *Altiarchaea*) sind unkultivierte Mikroorganismen und wurden nach dem lateinischen Adjektiv *altus* (tief) benannt, da sie in der Tiefe der Erdkruste vorkommen. Sie gehörten dem fast gleichnamigen Phylum *Altiarchaeota* an, das tief im Baum der Archaeen abzweigt¹³ und mit seiner globalen Verteilung (Abb. 2a) auch in marinen Sedimenten häufig vorkommt¹⁴. Der in seine Ökophysiologie am besten verstandene Organismus der *Altiarchaeota* ist der namensgebende Organismus *Candidatus Altiarchaeum hamiconexum*¹². Organismen der Gattung *Altiarchaeum* formen in den Ökosystemen oft sehr reine Biofilme, die nicht nur mit extrazellulären polymeren Substanzen, sondern auch mit speziellen Zellanhängen zusammengehalten werden¹⁵. Diese Zellanhänge haben eine Stacheldraht-Struktur und am Ende einen Enterhaken¹⁶ (Abb. 2b&c). Die Energie zum Wachstum dieses Organismus' kommt vermutlich aus geologisch freigesetztem Wasserstoff in diesen Regionen⁷ und somit fungiert dieser als Primärproduzent für einen Großteil der Biozönose.



(2) Globale Verbreitung von Altiarchaeota und ihre Ultrastruktur.

a. Verteilung von Altiarchaeota basierend auf 16S rRNA-Genen und Metagenomen (nach: Bird JT, Baker BJ, Probst AJ, Podar M, Lloyd KG. Culture independent genomic comparisons reveal environmental adaptations for Altiarchaeales. *Front Microbiol* 2016; 7: 1221.

b. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Altiarchaeota Zellen. Die Verbindungen zwischen den Zellen sind durch Hami aufgebaut. Weiße Pfeile zeigen auf einzelne Hami. (Bildnachweis: Christine Moissl-Eichinger, TU Graz, und Gerhard Wanner, LMU München)

c. Schematischer Aufbau des Hamus aus einer Proteinuntereinheit. Der Hamus wird zwischen der inneren und der äußeren Membran der Zelle zusammengebaut und bildet eine basale Stacheldraht-ähnliche Struktur mit einem terminalen Haken.

Quelle: Nachempfindung aus: Probst AJ, Weinmaier T, Raymann K, Perras A, Emerson JB, Rattei T, et al. Biology of a widespread uncultivated archaeon that contributes to carbon fixation in the subsurface. *Nat Commun* 2014; 5: 5497.

Altiarchaea kommen in tiefen Grundwasserleitern auf fast jedem Kontinent vor. Die Spezies sind sehr nah verwandt und tragen einen sehr ähnlichen genetischen Anteil, das man als Pangenom bezeichnet. Rekonstruktion von Verwandtschaften der Genome zeigen, dass die Arten sich in Abhängigkeit der geographischen Distanz unabhängig voneinander entwickelt haben (Abb. 2c). Je geringer dabei die geographische Distanz zwischen den Grundwasserleitern der Altiarchaea ist, desto näher sind die Organis-

men auch verwandt⁷. Diese strikte Biogeographie gilt von Europa über Asien nach Amerika. Aufgrund der hohen Verwandtschaft und tiefen Abzweigung im Baum der Archaeen konnten wir schlussfolgern, dass die evolutionäre Rate der Altiarchaea sehr gering ist⁷ auch wenn sie sich ständig in Teilung befinden¹². Man kann spekulieren, dass sich Altiarchaea mit Enterhaken in den Sedimenten der Grundwasserleiter festhalten und aufgrund ihrer Sauerstoffsensitivität nicht überirdisch verbreitet werden. Auf der Oberflä-

che können Altiarchaea nur maximal drei Tage in Symbiose mit schwefeloxidierenden Bakterien überleben, die sie ummanteln und dabei für ein anaerobes Milieu sorgen¹⁷.

Symbionten mit minimalem Metabolismus erzeugen enge mikrobielle Interaktionen

Obwohl Organismen der Gattung Altiarchaeum oft ihre Ökosysteme dominieren, gibt es andere Mikroorganismen, die sehr eng mit ihnen zusammenleben. Diese

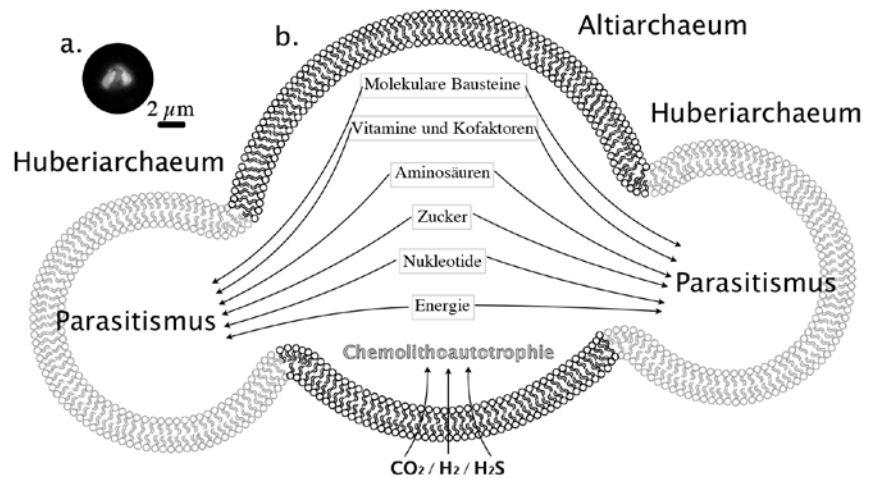
Organismen wurden nach Prof. Dr. Robert Huber benannt, dem Entdecker der Altiarchaeota und heißen somit Huberarchaeota (die Candidatus Spezies *Huberiarchaum crystalense*¹¹). *Huberiarchaea* wurden bisher in zwei Ökosystemen der tiefen Biosphäre gefunden, in einem CO₂-getriebenen Geysir in den USA (Crystal Geysir, Utah), dessen Wasser aus mehreren hundert Metern Tiefe kommt¹¹ und in einem Untergrund-Wissenschaftslabor in Japan auf 250 Meter Tiefe¹⁹. Beide Systeme haben eine komplett unterschiedliche Geologie und es besteht kein Austausch zwischen den Systemen, sodass hier eine getrennte Evolution der Systeme stattgefunden hat. Bisher ist nur das Zusammenleben von *Huberiarchaum crystalense* und *Altiarchaea* beschrieben²⁰. Beide Organismen treten dabei oft direkt miteinander assoziiert auf, das heißt, das kleinere *H. crystalense* sitzt auf den *Altiarchaea* (Abb. 3a). Nachdem die Genome beider Organismen rekonstruiert wurden, konnte man das metabolische Potential ermitteln. Die Ergebnisse deuten auf direkte Abhängigkeit von *H. crystalense* von *Altiarchaeum* hin. Im Detail kann *H. crystalense* die meisten Bausteine für die Synthese von DNS, RNS und Proteine nicht selbst herstellen. Diese bezieht es vermutlich von den *Altiarchaea*. Gleichzeitig kann es keine reduzierten Redoxäquivalente herstellen, was darauf hindeutet, dass es einen direkten Austausch der Zellinhalte geben muss (Abb. 3b²⁰). Dieser Aspekt spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen oft eine Überlappung der Signale von *H. crystalense* und *Altiarchaea* darstellen²⁰. Wie der Austausch von Metaboliten zwischen den Organismen jedoch stattfindet, ist Bestandteil der aktuellen Forschung.

Das Zusammenleben der beiden Organismen in mehreren hundert Meter Tiefe wirft natürlich die Frage auf, ob es sich um eine direkte Symbiose handelt. Im klassischen Sinne ist eine Symbiose als

ein Zusammenleben zweier Organismen mit beiderseitigem Nutzen definiert (Mutualismus). Bisher wurde kein Nutzen für *Altiarchaea* in diesem Zusammenleben in den Daten entdeckt, sodass durchaus ein Kommensalismus denkbar ist (eine Art hat einen Vorteil durch das Zusammenleben, die andere keinen Vor- oder Nachteil). Jedoch bereichert sich *H. crystalense* durchaus an den Nährstoffen der *Altiarchaea*, sodass *H. crystalense* auch als Parasit betrachtet werden kann. Die englischsprachige Definition von Symbiose (engl. symbiosis) ist hierbei viel zutreffender, denn sie beschreibt das Zusammenleben zweier Organismen ungeachtet der Tatsache ob Mutualismus, Kommensalismus oder Parasitismus vorliegt. Aus diesen Gründen wird auch im fortlaufenden Text die englischsprachige Definition von Symbiose angewendet.

Huberarchaeota sind aber nicht die einzigen Symbionten der tiefen Biosphäre. Es gibt viele weitere kleine Archaeen der sogenannten DPANN-Superphylums²¹. Dieser

Zweig des archaeellen Baum des Lebens wurde nach den initialen Phyla benannt, die bei deren Definition bekannt waren, nämlich *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota* und *Nanohaloarchaeota*⁸. Mittlerweile sind aber schon viele weitere Phyla in diesem Zweig bekannt^{21,22,23}, der auch die oben genannten *Huberarchaeota* beinhaltet²⁰. Interessanterweise haben alle Organismen einen sehr minimalen Metabolismus und sind vermutlich alle Symbionten. Bis auf eine Ausnahme, Organismen der *Diapherotrites*. Diese haben vermutlich durch horizontalen Gentransfer Gene von Bakterien aufgenommen und so ihr Genrepertoire erweitert um wieder unabhängig von anderen Organismen leben zu können²⁴. Lange war man auf der Suche nach einem Organismus der *Diapherotrites*, der ebenfalls nur die rudimentären, reduzierten metabolischen Eigenschaften besaß. Aus einem CO₂-getriebenen Geysir konnte man ein komplettes Genom eines solchen *Diapherotrites* rekon-



(3) Symbiose zwischen *Altiarchaeum* und *Huberiarchaum*.

a. Fluoreszenz in-situ Hybridisierung, die das *Altiarchaeum* in der Mitte (dunkles Grau) flankiert von zwei *Huberarchaeota* Zellen zeigt (helles Grau²⁰).

b. Metabolische Modellierung der Stoffwechselwege der beiden Organismen. Das *Altiarchaeum* produziert Energie und Zellbausteine mittels seiner chemolithoautotrophen Lebensweise; *Huberiarchaea* greifen diese Nährstoffe entsprechend ab, wobei *Altiarchaea* keinen ersichtlichen Nutzen daraus ziehen. Für *Altiarchaeota* ergibt sich daraus der Nachteil von Nährstoffverlust (Parasitismus der *Huberiarchaea*²⁰).

Quelle: Probst AJ (2020). Zusammen in Dunkelheit - mikrobielle Interaktionen in der Erdkruste. *BIOSpektrum* 26:255-258

struieren und dessen metabolische Einschränkungen ähnlich anderer DPANN-Archaeen beweisen. Das Genom dieses Organismus, der nach dem bekannten Archaeenforscher Dr. Patrick Forterre benannt wurde (Candidatus Forterrea multitransosorum), enthielt sehr viele mobile genetische Elemente, genauer Transposons²⁵. Diese wanderten innerhalb des Genomes und vermutlich der Population hin und her, was die ursprüngliche Rekonstruktion erschwerte. Phylogenetisch betrachtet war *F. multitransosorum* basierend auf ribosomaler RNA das tiefabzweigendste Archaeum innerhalb der bisher bekannten Diapherotrites, und man hatte somit deren ursprüngliche Reduziertheit der Genome bewiesen²⁵.

Die tiefe Biosphäre ist voll von kleinen Symbionten

Innerhalb der Domäne der Bakterien existiert ein Pendant zu den DPANN-Archaeen, die sogenannte Candidate Phyla Radiation²². Diese umfasst je nach Studie zwischen 15 Prozent und 30 Prozent der gesamten Diversität aller Bakterien auf unserem Planeten und ist somit um ein Vielfaches diverser als das DPANN-Superphylum der Archaeen. Organismen der CPR sind in der Regel sehr kleine kokkoide Zellen mit einem Durchmesser von 0,2–0,3 μm ²⁶. Diese kleine Zellgröße ist auch dafür verantwortlich, dass sie bei einer Sterilfiltration von Lösungen (die standardmäßig mit einem 0,22 μm Filter durchgeführt wird) nicht entfernt werden. Der dabei verwendete Druck reicht aus, die Zellen durch die Poren des Filters zu quetschen. CPR-Bakterien kommen in fast allen denkbaren Habitaten vor. Man findet sie in normalen Böden²⁷, im Mikrobiom der menschlichen Mundschleimhaut²⁸ und sogar in extrem trockenen Habitaten der Atacama-Wüste²⁹. Die größte Diversität von CPR existiert jedoch in aquatischen Systemen³⁰ wie Grundwasser⁵. Zum Beispiel ist

mehr als die Hälfte der Diversität des Mikrobioms des CO₂-getriebenen Kaltwassergeysirs Crystal Geyser aus CPR-Organismen zusammengesetzt¹¹.

Hinsichtlich ihres Metabolismus besitzen CPR-Organismen eine ähnlich reduzierte Kapazität wie DPANN-Archaeen. Sie können de novo keine Nukleotide, Fettsäure-basierte Lipide oder Aminosäuren synthetisieren und auch die Biosynthese der meisten Co-Faktoren und Vitamine sind nicht in deren Genome kodiert. Die externe Aufnahme von Nukleotiden wurde zum Beispiel für ein CPR-Bakterium des Phylums Saccharibacteria gezeigt²⁷. Saccharibacteria sind auch die einzigen Vertreter der CPR, die bereits unter Laborbedingungen über längere Zeit hinweg gezüchtet werden können. Sie sind dabei von der Anwesenheit eines anderen Bakteriums, ihres Wirtes, abhängig und können somit nur in Ko-Kultur gehalten werden²⁸. Wird ein anderer Stamm der gleichen Spezies als Wirt verwendet, so kann es vorkommen, dass die Saccharibacteria mit diesem dann nicht mehr in einer Gemeinschaft leben, sondern diesen töten, also die Zellen lysieren³¹. Somit können CPR-Bakterien nach der englischsprachigen Definition als Symbionten betrachtet werden, die manchmal auch parasitär sind.

Eine große Frage hinsichtlich der Zellbiologie von CPR-Bakterien betrifft die Quelle ihrer Lipide für ihren Membranaufbau. Während bekannt ist, dass manche Archaeen Lipide aus der Umgebung recyceln können³², ist es unklar woher CPR-Bakterien ihre Lipide bekommen. Eine erste Hypothese war, dass CPR-Bakterien keine Lipide haben, die aus Fettsäuren aufgebaut sind, sondern aus Isoprenoid-Untereinheiten, ähnlich der Archaeen. Diese Hypothese wurde durch die Tatsache unterstützt, dass manche CPR-Bakterien das genetische Potential zur Isoprenoidsynthese besitzen²². Jedoch kann der Biosyntheseweg auch für andere Stoff-

wechselwege essentiell sein. In einer Studie, in welcher wir Genom-auflösende Metagenomik mit Lipidomik auf Proben eines Kaltwassergeysirs anwendeten, konnten wir CPR-Bakterien gezielt Lipide zuweisen¹⁰. Dabei nutzten wir eine korrelative Analyse der Metagenom- und Lipidomdaten, die CPR-Bakterien eindeutig Fettsäure-basierte Lipide zuwies. Kausalität zwischen den Fettsäure-basierten Lipiden und CPR-Bakterien erlangten wir durch Abtrennung der CPR-Bakterien mittels eines 0,2 μm -Porenfilters und folgender Infrarotspektromikroskopie¹⁰. Interessanterweise besitzen CPR-Bakterien aber auch einen großen Anteil an Lysolipiden, das sind Lipide mit einer Glyceringrundstruktur und nur einer veresterten Fettsäure (anstatt zwei Fettsäuren). Bisher dachte man, dass Lysolipide vor allen Dingen Abbauprodukte in der Natur sind, jedoch wurden sie hier als intakte polare Lipide in den CPR-Bakterien entdeckt. Welche genaue Funktion sie haben, ist momentan aktueller Forschungsgegenstand, jedoch gibt es die Vermutung, dass die Lysolipide vielleicht für die Krümmung der Membranen der kleinen Zellen notwendig sind¹⁰.

Obwohl vermutet wird, dass die meisten CPR-Bakterien Symbionten sind, bleibt es unklar, was ihre wirkliche Funktion in Ökosystemen ist. Aufgrund der Tatsache, dass manche Ökosysteme eine größere Diversität von CPR-Bakterien als potentielle Wirte (andere Bakterien) haben¹¹, kommt man zur Schlussfolgerung, dass entweder ein Wirt mehrere Symbionten haben kann oder aber auch manche CPR eine relativ unabhängige Lebensweise besitzen. In der Tat kommen sie zum Beispiel in Crystal Geyser vor allen Dingen in anoxischem Grundwasser vor, das gerade atmosphärischem Sauerstoff ausgesetzt wurde¹¹. In diesem Übergangsbereich erfahren Mikroorganismen viel Stress und viele Mikroben lysieren und setzen dabei deren Zellinhalt als Nährstoffe frei. Davon können sich theoretisch viele

CPR-Bakterien ernähren und somit würde ihnen die Funktion des Recyclens von Nährstoffen im Ökosystem zufallen. Diese Lebensweise kann gerade in der tiefen Biosphäre, wo oft Nährstoffknappheit herrscht, durchaus Vorteile bringen und stellt mit Sicherheit eine wichtige biologische Nische dar.

Vireinfektionen setzen organischen Kohlenstoff der tiefen Biosphäre frei

Die Lyse von Zellen kann allgemein in Ökosystemen sehr viele Nährstoffe freisetzen und somit Heterotrophie (das Wachstum auf organischem Kohlenstoff) fördern. Bisher wurde angenommen, dass Viren in der tiefen Biosphäre vor allen Dingen mit lysogener Lebensstrategie existieren³³. Als lysogen bezeichnet man einen Virus, der sich nach der Infektion in das Genom des Wirtes integriert und dort verweilt und mitrepliziert wird. Erst unter bestimmten Umständen tritt der lysogene Virus in den lytischen Zyklus ein, repliziert sich damit unabhängig vom Wirt und lysiert die Zelle um viele Nachkommen freizusetzen. Im Gegensatz dazu steht die rein lytische Lebensweise von Viren, die die Fähigkeit zur Integration in das Wirtsgenom nicht besitzen und ausschließlich den lytischen Zyklus durchläuft.

Mittels genom-auflösender Metagenomik von Grundwasserproben, in welchen Altiarchaeota sehr abundant sind, identifizierten wir neue Viren, die keine Verwandtschaft zu bisherigen Viren in öffentlichen Datenbanken hatten¹⁸. Wir nutzten kurze DNS-Abschnitte in CRISPR-Systemen der Altiarchaeota um festzustellen, ob diese Viren in der Vergangenheit diese Organismen bereits infizierten. Bei einigen, teils sehr abundanten neuartigen Viren war dies auch der Fall. Um zu beweisen, dass es sich dabei wirklich um Viren und nicht um anderweitig unbekannte DNS-Stücke aus der Umwelt handelte,

benutzten wir ein Verfahren, das wir virus-targeted genome FISH nennen (FISH für Fluoreszenz in situ Hybridisierung). Dieses Verfahren basiert auf dem Design von doppelsträngigen DNS-Sonden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, und gegen die DNS in Umweltproben hybridisiert werden. Dabei konnten wir spezifisch die bislang unbekanntenen Viren markieren und visualisieren. Eine Gegenfärbung der Ribosome von Altiarchaeota in der Probe ermöglichte es dann die Lokalisation der Viren im Vergleich zu den Wirten zu identifizieren¹⁸. Interessanterweise zeigte eine statistische Analyse von mehr als 18.000 Zellen, dass es sich um einen Virus mit lytischer Infektion handelt, was die bisherigen Annahmen der vorwiegenden lysogenen Lebensweise von Viren im Untergrund³³ ins Wanken brachte.

Viren von Altiarchaeota wurden bislang in Proben von drei verschiedenen Kontinenten der Erde entdeckt und besitzen teilweise verwandte Proteine¹⁸. Diese weite Verbreitung deutet auf einen wesentlichen Einfluss der Viren auf den Kohlenstoffkreislauf der Ökosysteme in der tiefen Biosphäre hin. Altiarchaeota sind in diesen Ökosystemen Kohlendioxid-fixierende Primärproduzenten und ihre Lyse durch Viren stellt der mikrobiellen Gemeinschaft viele reduzierte organische Kohlenstoffverbindungen als Nahrung zur Verfügung. In der Tat wurde gezeigt, dass die Kohlendioxidfixierung in Altiarchaeota-dominierten Ökosystemen in der Tiefe des Colorado Plateaus eine gesamte mikrobielle Gemeinschaft von hunderten von Mikroorganismen ernähren kann¹⁰.

Wohin geht die Reise in der Zukunft?

Für die weitere Forschung an der tiefen Biosphäre ist der Zugang zu mehr Probenmaterial aus unterschiedlichen geologischen Schichten

und damit Ökosystemen nötig um ein systematisches Verständnis für die Diversität und Metabolismus zu erreichen. Dabei gilt auch zu beachten, dass neue Bohrungen in tiefe Erdschichten oft mit erheblichem (finanziellen) Aufwand einhergehen und die dabei angebohrten Ökosysteme ge- oder gar zerstört werden. Die Kontaminationskontrolle von Sedimentproben ist nach wie vor eine große Herausforderung um zu vermeiden, dass man Oberflächenmikroorganismen mit der Bohrflüssigkeit einbringt oder die Sedimentproben untereinander kontaminiert. Dabei könnte zum Beispiel verstanden werden, welche Auswirkungen Entgasungen aus dem Mantel auf unterschiedliche Ökosysteme in der Tiefe haben.

Das genetische Potential der tiefen Biosphäre beinhaltet hunderttausende von unbekanntenen Genen, die auch sehr großes Potential für biotechnologische Anwendungen beinhalten können. Dies wurde unter anderem durch die Entdeckung neuer CRISPR-Systeme klar, jedoch benötigt die Analyse immer noch extrem aufwendige biochemische Verfahren zur Proteincharakterisierung.

Hinsichtlich der Viren müssen in Zukunft sensitivere Methoden entwickelt werden, um divergierende Viren besser zu detektieren. Unser Ansatz mit virus-targeted genome-FISH war dabei erst der Anfang. Es müssen hochauflösende Methoden wie Cryoelektronenmikroskopie mit Metagenomik im Hochdurchsatzverfahren gekoppelt werden, um die große Diversität von Viren in der tiefen Biosphäre systematisch zu entschlüsseln. In manchen Ökosystemen mit zum Beispiel dominierenden Altiarchaeota findet man entsprechende aktive CRISPR-Systeme, jedoch sind keine zugehörigen Viren, gegen die diese Immunität wirken soll, bei bioinformatischen Analysen entdeckt worden. Das deutet auf eine sehr große Lücke in Datenbanken hin, die Schritt für Schritt geschlossen werden muss. Zu

guter Letzt bleibt die Auswirkung von Viren auf die Nahrungsnetze der tiefen Biosphäre zu erwähnen. Hier ist eine strategische Analyse des Kohlenstoffflusses der mikrobiellen Gemeinschaft der tiefen Biosphäre nötig.

Konsortien von hunderten von Wissenschaftler*innen wie im Deep Carbon Observatory (DCO, <https://deepcarbon.net/>) sind nötig, um geologische und biologische Zusammenhänge in Kontext zu bringen. Das DCO forschte über eine Dekade lang am Kohlenstoffkreislauf des terrestrischen und marinen Untergrundes und wurde von der Sloan Foundation gefördert. Dabei wurden unter anderem auch explizit Finanzmittel in Nachwuchsgruppen investiert – Teile der hier zusammengefassten Forschung wurden darüber finanziert.

Sicher ist, dass wir gerade erst am Anfang sind, die tiefe Biosphäre zu verstehen und wir vor noch aufregenden Dekaden der Forschung mit vielen Überraschungen stehen.

Summary

Earth's deep terrestrial biosphere is home to the majority of prokaryotes — archaea and bacteria — on our planet, yet we have little knowledge on how these microbes interact with each other, with their ecosystem and with potential viruses. In our recently published research, which I summarize in this review, we investigated the interactions of microbes in deep subsurface ecosystems of suboxic and anoxic groundwater aquifers using genome-resolved metagenomics. During our research, we developed a new platform called uBin that enables researchers to curate reconstructed genomes of bacteria and archaea. We used a large database of curated bacterial genomes to deduce that microbial replication linearly declines with

ecosystem depth. However, subsurface ecosystems impacted by geological degassing showed a high overall replication index of bacteria. These ecosystems can vary greatly in microbial diversity with a high incidence of bacteria of the Candidate Phyla Radiation, which have little metabolic capacity and are presumably episymbionts or scavengers. Using a combination of metagenomics and metalipidomics, we inferred that these organisms cannot synthesize their own lipids but instead retrieve these essential biomolecules from their surroundings. We also found that organisms of the phylum Altiarchaeota are prevalent in these carbon-dioxide contaminated groundwaters and that their lifestyle is chemolithoautotrophic. Interactions of Altiarchaeota with other biological entities are complex and span episymbionts of the phylum Huberarchaeota as well as hitherto unknown viruses, the lifestyle of which is likely lysogenic. Overall, I conclude that the deep biosphere has great genetic potential that remains to be explored and humanity is just beginning to understand the complexity of life below Earth's critical zone.

Anmerkungen/Literatur

1) Bar-On YM, Phillips R, Milo R. The biomass distribution on Earth. *Proc Natl Acad Sci* 2018; 115: 6506–6511.
 2) Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12: 635–645.
 3) Flemming H-C, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17: 247.
 4) Borgonie G, García-Moyano A, Litthauer D, Bert W, Bester A, van Heerden E, et al. Nematoda from the terrestrial deep subsurface of South Africa. *Nature* 2011; 474: 79–82.
 5) Anantharaman K, Brown CT, Hug LA, Sharon I, Castelle CJ, Probst AJ, et al. Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nat Commun* 2016; 7: 13219.

6) Bornemann TL, Esser SP, Stach TL, Burg T, Probst AJ. uBin—a manual refining tool for metagenomic bins designed for educational purposes. *bioRxiv* 2020.
 7) Bornemann TL, Adam PS, Turzynski V, Schreiber U, Figueroa-Gonzalez PA, Rahlff J, et al. Geological degassing enhances microbial metabolism in the continental subsurface. *bioRxiv* 2020.
 8) Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng J-F, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 2013; 499: 431–437.
 9) Burstein D, Harrington LB, Strutt SC, Probst AJ, Anantharaman K, Thomas BC, et al. New CRISPR? Cas systems from uncultivated microbes. *Nature* 2017; 542: 237.
 10) Probst AJ, Elling FJ, Castelle CJ, Zhu Q, Elvert M, Birarda G, et al. Lipid analysis of CO₂-rich subsurface aquifers suggests an autotrophy-based deep biosphere with lysolipids enriched in CPR bacteria. *ISME J* 2020; 1–14.
 11) 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: 328–336.
 12) Probst AJ, Weinmaier T, Raymann K, Perras A, Emerson JB, Rattei T, et al. Biology of a widespread uncultivated archaeon that contributes to carbon fixation in the subsurface. *Nat Commun* 2014; 5: 5497.
 13) Adam PS, Borrel G, Brochier-Armanet C, Gribaldo S. The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *ISME J* 2017; 11: 2407–2425.
 14) Bird JT, Baker BJ, Probst AJ, Podar M, Lloyd KG. Culture independent genomic comparisons reveal environmental adaptations for Altiarchaeales. *Front Microbiol* 2016; 7: 1221.
 15) Henneberger R, Moissl C, Amann T, Rudolph C, Huber R. New insights into the lifestyle of the cold-loving SM1 euryarchaeon: natural growth as a monospecies biofilm in the subsurface. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 192–199.
 16) Moissl C, Rachel R, Briegel A, Engelhardt H, Huber R. The unique structure of archaeal 'hami', highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. *Mol Microbiol* 2005; 56: 361–70.
 17) Rudolph C, Wanner G, Huber R. Natural communities of novel archaea and bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2336–2344.
 18) Rahlff J, Turzynski V, Esser SP, Monsees I, Bornemann TL, Figueroa-Gonzalez PA, et al. Genome-informed microscopy reveals infections of uncultivated carbon-fixing archaea by lytic viruses in Earth's crust. *bioRxiv* 2020.
 19) HERNSDORF AW, AMANO Y, MIYAKAWA K, ISE, KOTARO, SUZUKI Y, ANANTHARAMAN K, et al. Potential for microbial H₂ and metal transformations associated with novel bacteria and archaea in deep terrestrial subsurface sediments. *ISME J*; in press.
 20) Schwank K, Bornemann TL, Dombrowski N, Spang A, Banfield JF, Probst AJ. An

archaeal symbiont-host association from the deep terrestrial subsurface. *ISME J* 2019; 13: 2135–2139.

21) Castelle CJ, Wrighton KC, Thomas BC, Hug LA, Brown CT, Wilkins MJ, et al. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr Biol CB* 2015; 25: 690–701.

22) Castelle CJ, Brown CT, Anantharaman K, Probst AJ, Huang RH, Banfield JF. Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16: 629–645.

23) Castelle CJ, Banfield JF. Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life. *Cell* 2018; 172: 1181–1197.

24) Youssef NH, Rinke C, Stepanauskas R, Farag I, Woyke T, Elshahed MS. Insights into the metabolism, lifestyle and putative evolutionary history of the novel archaeal phylum ?Diapherotrites?. *ISME J* 2015; 9: 447–460.

25) Probst AJ, Banfield JF. Homologous recombination and transposon propagation shape the population structure of an organism from the deep subsurface with minimal metabolism. *Genome Biol Evol* 2018; 10: 1115–1119.

26) Luef B, Frischkorn KR, Wrighton KC, Holman H-YN, Birarda G, Thomas BC, et al. Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater. *Nat Commun* 2015; 6: 6372.

27) Starr EP, Shi S, Blazewicz SJ, Probst AJ, Herman DJ, Firestone MK, et al. Stable isotope informed genome-resolved metagenomics reveals that Saccharibacteria utilize microbially-processed plant-derived carbon. *Microbiome* 2018; 6: 122.

28) He X, McLean JS, Edlund A, Yooseph S, Hall AP, Liu S-Y, et al. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic life. *Front Microbiol* 2011; 2: 219. *estyle*. *Proc Natl Acad Sci* 2015; 112: 244–249.

29) Schulze-Makuch D, Wagner D, Kounaves SP, Mangelsdorf K, Devine KG, de Vera J-P, et al. Transitory microbial habitat in the hyperarid Atacama Desert. *Proc Natl Acad Sci* 2018; 115: 2670–2675.

30) Proctor CR, Besmer MD, Langenegger T, Beck K, Walser J-C, Ackermann M, et al. Phylogenetic clustering of small low nucleic acid-content bacteria across diverse freshwater ecosystems. *ISME J* 2018; 12: 1344.

31) Bor B, McLean JS, Foster KR, Cen L, To TT, Serrato-Guillen A, et al. Rapid evolution of decreased host susceptibility drives a stable relationship between ultrasmall parasite TM7x and its bacterial host. *Proc Natl Acad Sci* 2018; 115: 12277–12282.

32) Takano Y, Chikaraishi Y, Ogawa NO, Nomaki H, Morono Y, Inagaki F, et al. Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nat Geosci* 2010; 3: 858–861.

33) Anderson RE, Brazelton WJ, Baross JA. Is the genetic landscape of the deep subsurface biosphere affected by viruses? *Front Microbiol* 2011; 2: 219.

Der Autor

Alexander Probst studierte Biologie an der Universität in Regensburg und promovierte 2014 dort am Archaeenzentrum bei Christine Moissl-Eichinger und Reinhard Wirth, seinem Doktorvater. Vor, während und nach der Promotion arbeitete er als Bioinformatiker in einem Unternehmen, wo er an mehr als 100 verschiedenen Mikrobiomstudien mit Schwerpunkt auf das menschliche Mikrobiom mitwirkte. Nach einem Postdoc-Aufenthalt von 2014 bis 2017 im Labor von Jill Banfield an der UC Berkeley, wo er seine Kenntnisse in der tiefen unterirdischen Mikrobiologie vertiefte, wurde Alexander Probst 2017 als Interimsprofessor für aquatische mikrobielle Ökologie an die Universität Duisburg-Essen berufen. Seit Mai 2018 ist er, finanziert durch ein NRW-Rückkehrstipendium, außerordentlicher Professor für „Aquatische Mikrobielle Ökologie“ und leitet ein Team von Wissenschaftler*innen, das sich mit Kohlenstoffrecycling im tiefen Untergrund befasst.