

Die mikrobielle Biodiversität für die Land- und Ernährungswirtschaft nutzbar machen

Autoren: Corinne Jud und Franco Widmer

Frühjahr 2019

Neue Erkenntnisse und Fortschritte

Die Analyse von Bodenmikrobiomen hat gezeigt, dass die mikrobiellen Gemeinschaften für einen Standort charakteristisch und über die Zeit sehr stabil sind. In einer Zusammenarbeit mit der Nationalen Bodenbeobachtung eröffnet dies die Möglichkeit, die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden für das Monitoring der Bodenqualität zu nutzen. In einer Untersuchung, welche an gut 250 Standorten des Biodiversitätsmonitorings der Schweiz durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass unterschiedlichen Nutzungstypen (z.B. Acker, Grasland und Wald) aber auch biogeographische Regionen (z.B. Jura, Mittelland und Voralpen) charakteristische mikrobielle Gemeinschaften aufweisen. Insgesamt wurden bei diesen Untersuchungen mehrere zehntausend unterschiedliche mikrobielle Gruppen (Taxen) beschrieben, was die enorme Biodiversität im Ökosystem Boden verdeutlicht. Die Empfindlichkeit von mikrobiellen Gemeinschaften gegenüber Veränderungen haben wir vorgängig im DOK-Versuch gezeigt. Jetzt haben wir in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe Agrarlandschaft und Biodiversität in temporär vernässten Ackerböden gezeigt, dass die Bodenmikrobiologie die Vernässungs-Geschichte eines Bodens, auch nach dessen Abtrocknen, besser widerspiegelt, als bodenchemische Untersuchungen. In einer weiteren Studie haben wir untersucht, ob das massive Ausbringen von Pilzen der Gattung *Metarhizium*, welche zur biologischen Kontrolle von Insekten eingesetzt werden, eine Veränderung des Bodenmikrobioms bewirkt. In Feld und Topfversuchen konnten wir zeigen, dass es keine nachweisbaren Effekte gab.

Im Aufbaubereich Funktionelle Genomik und Bioinformatik wurden die Ansätze zur kompletten Beschreibung der gesamten Erbsubstanz (der Genome) von Mikroorganismen weiter verbessert um auch sehr komplexe Bakteriengenome komplett zusammensetzen zu können. Solche komplexen Genome sind wesentlich häufiger als bisher angenommen. Ebenso wurde eine Methode für vergleichende Genomanalysen etabliert und an drei *Lactobacillus helveticus* Stämmen der Agroscope Stammsammlung angewendet. Diese Methode wurde auch an neun *Pseudomonas* Stämmen angewendet, die aus dem Wurzelbereich oder von der Pflanzenoberfläche von Kartoffelpflanzen isoliert wurden, und die eine unterschiedlich stark ausgeprägte Schutzfunktion gegen den Oomyceten *Phytophthora infestans*, einen der Hauptschädlinge dieser wichtigen Kulturpflanze, ausüben. Die Genome der drei *L. helveticus* Stämme wurden mit öffentlich verfügbaren Genomen anderer Stämme dieser Spezies verglichen, um die Gene zu identifizieren, die in allen Stämmen vorkommen (das sogenannte «core Genom»), sowie diejenigen die stammspezifisch sind und potentiell die unterschiedlichen Eigenschaften der Stämme erklären können. Mithilfe der neuen Genome konnte zudem ein grösserer Anteil Sequenzen von Fettsirtekulturen (Käsestarterkulturen) eindeutig zugewiesen werden. Bei den *Pseudomonas* Stämmen wird zurzeit an einer Korrelation der stammspezifischen Gene mit phänotypischen Merkmalen gearbeitet, um potentielle Wirkmechanismen der unterschiedlichen Schutzfunktionen gegenüber verschiedenen Stadien im Lebenszyklus des Pathogens zu identifizieren. Zudem wurde das Genom eines neu isolierten *Pseudomonas* Stammes aus Apfelblüten assembliert und bezüglich der Eignung als Antagonist gegen den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* sowie anderer Pflanzenpathogene untersucht. Die Aufschlüsselung moderat komplexer Metagenome mittels der Sequenzierung gesamter Genome wurde anhand von Fettsirtekulturen als Modell etabliert. Solche Analysen gehen weit über die typisch verfolgte Amplicon-basierte Sequenzierung von Markergenen hinaus und erlauben es, Aussagen darüber zu machen, ob bestimmte Bakteriophagen und/oder Plasmide in den Kulturen vorkommen.

Ziel des Projekts «Nutzung der genetischen und metabolischen Vielfalt von Mikroorganismen für fermentierte Lebensmittel» (MikBiodivFood) ist es, die umfangreiche Liebefelder Stammsammlung von über 10'000 Isolaten besser zu verstehen, und für die Ernährung ideal nutzbar zu machen. Wir nutzen hierfür Labormethoden und

Genomdaten, um einzelne Stämme zu charakterisieren und zu verstehen, was sie von anderen Vertretern der gleichen Spezies unterscheidet. Als Beispiel sei hier die Autolyse von *Lactobacillus helveticus* aufgeführt. Schnell lysierende Stämme sind für die Käseherstellung von Interesse, da durch diesen Prozess Peptidasen freigesetzt werden, die den Proteinabbau während der Käsereifung beschleunigen. Hier konnten wir im Labor zeigen, dass das Vorhandensein von Prophagen einen Zusammenhang mit schneller Autolyse darstellt. Zurzeit laufen Käseversuche, um den Effekt *in situ* zu studieren. Weitere Forschungsthemen sind der Aminosäuremetabolismus von *Pediococcus acidilactici* und die Aspartaseaktivität von Propionibakterien. Es sind Bakterien die u.a. als Zusatzkulturen in der Käseherstellung zugegeben werden. Da die Arbeiten zu diesen Themen erst begonnen haben, wird im nächsten Reporting ausführlicher darauf eingegangen.

Ebenso nutzen wir die Genomik, um phänotypische Labordaten mit dem Erbgut in Verbindung zu bringen. So konnten wir Erkenntnisse gewinnen, wie sich verschiedene Stämme von *Lactobacillus paracasei* in ihrem Nährstoffprofil unterscheiden, und was die genetischen Voraussetzungen dafür sind. Diese Arbeit soll Ende Jahr publiziert werden. Dadurch, dass von uns inzwischen über 750 Stämme sequenziert wurden, können wir auch gezielt nach An- und Abwesenheit von erwünschten oder nicht erwünschten Eigenschaften suchen. Dies ist schliesslich auch für die Sicherheit der eingesetzten Bakterienstämme essentiell, da wir über die Bestimmung der Antibiotikaprofile im Labor uns auch bioinformatisch weiter absichern können, dass wir nur Stämme für Lebensmittel einsetzen, welche nicht antibiotikaresistent sind. Schliesslich nutzen wir aber auch gezielt konservierte genetische Sequenzen, um die mikrobielle Biodiversität in unbekanntem Mischungen zu untersuchen. Die Publikation der Dairy Database 2018 legt den Grundstein für eine speziesgenaue Klassifizierung solcher 16S-Sequenzen. Zuvor waren Untersuchungen in dieser Genauigkeit nicht möglich.

Nutzen für die Praxis

Die Analysen des Bodenmikrobioms liefern einen Nutzen für die Praxis in verschiedenen Bereichen. Zum einen wird die vorhandene mikrobielle Biodiversität in Schweizer Böden erfasst und beschrieben, was die 'Strategie Biodiversität Schweiz' und das 'Biodiversitätsmonitoring Schweiz' unterstützt. Die Erkenntnisse zu den spezifischen Eigenschaften der Bodenmikrobiologie in Bezug auf Veränderungen der Bodenqualität wird von der Nationalen Bodenbeobachtung bereits in ihrem Monitoring genutzt. Die Möglichkeit, Auswirkungen von bestimmten landwirtschaftlichen Massnahmen, wie z.B. das Ausbringen von Pilzen für die biologische Schädlingsbekämpfung, im Boden zu erfassen, ermöglicht die Entwicklung von nachhaltigen Ansätzen im Pflanzenschutz. Nicht zuletzt ermöglicht die Analyse von Bodenmikrobiomen auch Aussagen über das Vorhandensein von unerwünschten Mikroorganismen (z.B. Pathogenen) im Boden zu machen und so die Anbaustrategie auf Nachhaltigkeit hin zu optimieren. Dies wird der Landwirtschaft einen direkten Nutzen bringen.

Die Möglichkeit zur Beschreibung kompletter Genome bietet die optimale Grundlage um nachfolgend Untersuchungen einzelner, funktionell relevanter Mikroorganismen durchführen zu können. Dies beinhaltet zum Beispiel den Vergleich mit bisher beschriebenen Genomen, um Rückschlüsse der verschiedenen Genomsequenzen auf unterschiedliche Eigenschaften machen zu können, oder um zum Beispiel Phagen in Käsekulturen nachzuweisen, die dort sehr grosse Schäden hervorrufen können. Ein Verständnis der Wirkmechanismen, die Antagonisten anwenden, um pflanzenschädigende Mikroorganismen zu bekämpfen, soll langfristig einen Beitrag zur Reduktion des Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln leisten. Somit soll das riesige Potential natürlich vorkommender Mikroorganismen aus Mikrobiomen, wie zum Beispiel dem Mikrobiom des Kompostes, gezielt in der Praxis nutzbar gemacht werden.

Fermentierte Lebensmittel gewinnen wieder vermehrt an Bedeutung, insbesondere dadurch, dass deren Wichtigkeit für ein gesundes Darmmikrobiom erkannt ist. Ausserdem bieten sie eine hochwertigere Nährstoffversorgung und erschliessen auch die Verwendung neuer Proteinquellen. Um fermentierte Lebensmittel gleichbleibender Qualität herzustellen, ist es von grösster Bedeutung, die Biodiversität der natürlich vorkommenden Keime zu verstehen, und aus diesen Gemeinschaften, die für uns nützlichsten Organismen auszuwählen. Unsere Forschung erarbeitet die Grundlagen, um so in Zukunft gesündere, hochwertigere und sicherere Nahrungsmittel in der Schweizer Lebensmittelversorgung zu etablieren.

Publikationen

Hug A.S. et al. NABO Bio - Bodenbiologie in der Nationalen Bodenbeobachtung. Ergebnisse 2012-2016, Handlungsempfehlungen und Indikatoren. (2018)

Huntscha, S. et al. Seasonal Dynamics of Glyphosate and AMPA in Lake Greifensee: Rapid Microbial Degradation in the Epilimnion During Summer. *Environmental Science & Technology* **52**, 4641-4649, (2018).

Mayerhofer J. et al. A species-specific multiplexed PCR amplicon assay for distinguishing between *Metarhizium pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, and *M. brunneum*. *Journal of Invertebrate Pathology* **161**: 23-28, doi.org/10.1016/j.jip.2019.01.002, (2019).

- Mayerhofer J. et al. Response of soil microbial communities to the application of a formulated *Metarhizium brunneum* biocontrol strain. *Biocontrol Science and Technology* **29**: 547-564, doi: 10.1080/09583157.2019.1566953, (2019).
- Schmid, M. et al. Comparative Genomics of Completely Sequenced *Lactobacillus helveticus* Genomes Provides Insights into Strain-Specific Genes and Resolves Metagenomics Data Down to the Strain Level. *Frontiers in Microbiology* **9**, 63, (2018).
- Schmid, M. et al. Pushing the limits of de novo genome assembly for complex prokaryotic genomes harboring very long, near identical repeats. *Nucleic Acids Research* **46**, 8953-8965, (2018).
- Zengerer, V. et al. *Pseudomonas orientalis* F9: A Potent Antagonist against Phytopathogens with Phytotoxic Effect in the Apple Flower. *Frontiers in Microbiology* **9**, 145, (2018).
- Fröhlich-Wyder, M.-T. et al. Cheese Yeasts. *Yeast* **36**, no. 3: 129-41, (2019).
- Lüdin, P. et al. Update on Tetracycline Susceptibility of *Pediococcus Acidilactici* Based on Strains Isolated from Swiss Cheese and Whey. *J Food Prot* **81**, no. 10: 1582-89, (2018).
- Meola, M. et al. Dairydb: A Manually Curated Gold Standard Reference Database for Improved Taxonomy Annotation of 16s Rrna Gene Sequences from Dairy Products." bioRxiv: 1-12 (2018).
- Moser, A. et al. Population Dynamics of *Lactobacillus Helveticus* in Swiss Gruyère-Type Cheese Manufactured with Natural Whey Cultures. *Frontiers in Microbiology* **9**, no. 637: 1-8, (2018).
- Shani, N. et al. Milchrelevante Milchsäurebakterien. Behr's, 2019.
- Wenzel, C. et al. The effect of starters with a functional arginine deiminase pathway on cheese ripening and quality. *International Dairy Journal* **85**: 191-200, (2018).
- Wüthrich, D. et al. Conversion of methionine to cysteine in *Lactobacillus paracasei* depends on the highly mobile *cysK-ctl-cysE* gene cluster. *Frontiers in Microbiology* **9**(2415), (2018).
- Wüthrich, D. et al. Transcriptional regulation of cysteine and methionine metabolism in *Lactobacillus paracasei* FAM18149. *Frontiers in Microbiology* **9**(1261) (2018).