



Endbericht November 2012

Korrektur vom 24.01.2013

Rebecca Störmer

rebecca.stoermer@awi.de; 04725 819-3233

Dr. Gunnar Gerdts

gunnar.gerds@awi.de; 04725 819-3245

Alfred Wegener Institut für Polar- und Meeresforschung,

Biologische Anstalt Helgoland, 27483 Helgoland



Inhalt

Übersicht Teilprojekte	3
Analyse funktioneller Gene in bakteriellen Sedimentgemeinschaften im Bereich der Einbringungsstelle, Tonne E3 (Teilprojekt 1)	3
Molekularbiologische Fingerprints bakterieller Sedimentgemeinschaften im Bereich der Einbringungsstelle, Tonne E3 (Teilprojekt 2)	3
Molekularbiologische Fingerprints bakterieller Gemeinschaften im Bereich der Einbringungsstelle, Tonne E3: Baggergut und Wasserproben (Teilprojekt 3)	4
Molekularbiologische Fingerprints bakterieller Sedimentgemeinschaften im Strandbereich Duhnen/Cuxhaven (Teilprojekt 4)	4
Zusammenfassung	5
Geleistete Arbeiten	7
Probenahmen	7
I. Monitoring Umlagerungsstelle E3 (Teilprojekt 1-3)	8
II. Beprobung Elbmündung bei Cuxhaven und Strand in Duhnen (Teilprojekt 4)	8
III. Zusätzliche Beprobung der Deutschen Bucht	8
Analyse der Bakteriengemeinschaften	9
Probenaufbereitung	10
I. Monitoring Umlagerungsstelle E3 (Teilprojekt 1 und 2)	10
III. Zusätzliche Beprobung der Deutschen Bucht	10
Abschlussergebnisse	11
I. Monitoring Umlagerungsstelle E3 (Teilprojekt 1 - 3)	11
II. Beprobung Elbmündung bei Cuxhaven und Strand in Duhnen (Teilprojekt 4)	22
Fazit	23
Anhang	25
Referenzen	31



Übersicht Teilprojekte

Analyse funktioneller Gene in bakteriellen Sedimentgemeinschaften im Bereich der Einbringungsstelle, Tonne E3 (Teilprojekt 1)

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.

Molekularbiologische Fingerprints bakterieller Sedimentgemeinschaften im Bereich der Einbringungsstelle, Tonne E3 (Teilprojekt 2)

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.



Molekularbiologische Fingerprints bakterieller Gemeinschaften im Bereich der Einbringungsstelle, Tonne E3: Baggergut und Wasserproben (Teilprojekt 3)

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 geprüft, ob parallel erhobene physikalische und chemische Parameter Einfluss auf die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft ausüben.

Die direkte Beprobung des ausgehobenen Baggergutes bei einer Verklappungs-Kampagne konnte aufgrund einer Beschränkung der technischen Möglichkeiten nicht durchgeführt werden. Es wurden allerdings Sediment aus der Delegationsstrecke Köhlbrand detailliert analysiert (strukturelle und funktionelle Zusammensetzung).

Molekularbiologische Fingerprints bakterieller Sedimentgemeinschaften im Strandbereich Duhnen/Cuxhaven (Teilprojekt 4)

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 Wattes 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.



Zusammenfassung

Im Zuge der Instandhaltungsmaßnahmen des Hamburger Hafens sind seit 2005 etwa 6 Mio m³ Baggergut in die Nordsee umgelagert worden. Diese Umlagerung von Elbsedimenten ist an die Einhaltung verschiedener Maßgaben gebunden, welche unter anderem ein regelmäßiges Monitoring der Umlagerungsstelle E3 vorschreiben. Das Monitoringprogramm umfasst Peilungen sowie Untersuchungen des Wasserkörpers, der Sedimente, der Schadstoffanreicherung in Organismen, des Makrozoobenthos und der Fischfauna.

Im Jahre 2009 wurde ein interdisziplinäres Projekt zwischen der Biologischen Anstalt Helgoland, der Hamburg Port Authority, der Bundesanstalt für Gewässerkunde, dem Niedersächsischen Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz und dem Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein initiiert. Innerhalb dieses Projektes wurden die benthischen Bakteriengemeinschaften ab August 2009 bis einschließlich August 2011 in das Monitoring mit einbezogen. Das Projekt diente der Aufklärung, ob und inwiefern sich benthische Bakteriengemeinschaften bedingt durch die Umlagerungsprozesse verändern, beziehungsweise, Unterschiede in der Gemeinschaft im Vergleich zu einem ausgewiesenen Referenzgebietes nachweisbar sind. Die Analysen basieren auf einer molekularbiologischen Fingerprinttechnik, die ein Profil der bakteriellen Gemeinschaft generiert. In multivariaten Analysen wird das Profil einer Probe mit denen anderer Proben verglichen und ein Einfluss erhobener analytischer Daten auf die Bakteriengemeinschaften untersucht.

Insgesamt weisen unsere Analysen auf einen Einfluss der Umlagerungen auf die Bakteriengemeinschaften hin. Grundsätzlich unterschieden sich die Bakteriengemeinschaften des Umlagerungsgebietes und des Referenzgebietes in den Jahren 2009 und 2010 signifikant. Die Probennahmen in 2011 zielten vor allem auf die Ermessung des Einflusses der Sedimenteintrahlung auf die Bakteriengemeinschaften ab und weniger auf die detaillierte Aufnahme aller Bakteriengemeinschaften. Zu diesem Zweck wurden nur noch die 52 Stationen bebort, an denen gleichfalls Proben zur Korngrößenanalysen und chemischen Analyse des Sedimentes erfolgten. Alle Redundanzanalysen (2009 – 2011) wiesen auf einen starken Gradienten erzeugt durch die Negativkorrelation von sandigem



Sediment bzw. organischen Schadstoffen zu schlickigem Sediment und positiv korrelierten chemischen Elementen (Schwefel, Stickstoff, Kohlenstoff, Phosphor) und Schwermetallen hin, der die Ausbildung der Bakteriengemeinschaften stark prägt. Die Bakteriengemeinschaften wurden im Hinblick auf ihre Zusammensetzung und Funktionalität eingehender untersucht. Beide Untersuchungsansätze zeigten nennenswerte Unterschiede zwischen Bakteriengemeinschaften der Einbringungsstelle und des Referenzgebietes. An der Umlagerungsstelle konnten neun Monate nach der Einbringung von Sediment noch immer typische Süßwasserbakterien (*Betaproteobakterien*) detektiert werden. Darüber hinaus wurden scheinbar besonders schwefelreduzierende Gruppen und *Flavobakterien* an der Einbringungsstelle selektiert. Zusammengenommen führte dies zu einer an die durch die Sedimenteinkbringung angepasste Bakteriengemeinschaft. Die Untersuchung der Diversität dieser Gemeinschaft ergab, dass sowohl die Zusammensetzung als auch die Funktion durch die Umlagerung beeinflusst wurde. Im Vergleich zu Bakteriengemeinschaften im Referenzgebiet konnte eine geringere Diversität aufgezeigt werden. Die Auswirkungen der Umlagerung lassen sich anhand der bisherigen mikrobiologischen Untersuchungen auf die Einbringungsstelle eingrenzen.

In dieser Pilotstudie konnte gezeigt werden, dass sich Umweltveränderungen, wie die hier untersuchte Verbringung von Elbsedimenten, anhand von Bakteriengemeinschaftenanalysen nachweisen lassen. Die Baggerguteinbringungen führten zu einer fundamentalen Veränderung der Sedimentstruktur an der unmittelbaren Umlagerungsstelle, die sich in Veränderungen der Diversität und Gemeinschaftsstruktur der Bakterien widerspiegelten. Die Erwägung routinemäßiger Analysen würde allerdings eine Anpassung, beziehungsweise eine Erweiterung der Untersuchungen benötigen um die Einwirkungen einzelner Faktoren (u.a. Schadstoffe) näher bestimmen zu können.



Geleistete Arbeiten

Probenahmen

Flankierend zu den Probenahme-Kampagnen der HPA (siehe Jahresberichte HPA) wurden zusätzlichen Probenahme-Kampagnen seitens der Biologischen Anstalt Helgoland (BAH) in der Deutschen Bucht realisiert.

Alle Sedimentproben wurden mit einem van Veen Greifer mit Klappen entnommen. Anschließend wurde das Sediment homogenisiert. An jeder Station wurden vier Unterproben in sterile Plastikgefäße abgefüllt. Dies erfolgt parallel zur Beprobung durch die HPA (Abbildung 1). Die Proben wurden sofort gefroren und nach der Ausfahrt bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Wasserproben aus dem Elbmündung (II) wurden mit einem Schlauch in zwei 12l Gefäße abgefüllt und im Labor weiter verarbeitet.



Abbildung 1 Probennahme für mikrobiologische Untersuchungen
Links: Sediment vor der Probenentnahme; Mitte: Unterproben für mikrobiologische Untersuchungen;
Rechts: Transportgefäße Wasserproben



I. Monitoring Umlagerungsstelle E3 (Teilprojekt 1-3)

Insgesamt wurden fünf Monitoring Ausfahrten (August 2009 bis einschließlich August 2011) durch die BAH begleitet. 1229 Proben wurden entnommen und bearbeitet.

II. Beprobung Elbmündung bei Cuxhaven und Strand in Duhnen (Teilprojekt 4)

Im Zeitraum von Januar bis Dezember 2011 wurden im Duhner Watt an vier Stellen (siehe Anhang) insgesamt 126 Proben entnommen und bearbeitet. Erste Ergebnisse wurden im Zwischenbericht 2011 präsentiert, der abschließender Vergleich der Bakteriengemeinschaften aus dem Duhner Watt mit denen der Einbringungsstelle aus dem Jahr 2011 wird im Folgenden dargestellt.

III. Zusätzliche Beprobung der Deutschen Bucht

Von September 2010 bis Juli 2011 wurden monatlich 17 Proben zur Analyse der benthischen Bakteriengemeinschaften der Deutschen Bucht im Hinblick auf ihre jahreszeitliche Sukzession genommen. Hierbei wurden insgesamt 412 Proben an 17 Stationen mit einem van Veen Greifer (0,2dm³) Sedimentproben genommen. Diese wurden homogenisiert und in Unterproben sofort gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert. (Karte siehe Anhang). Parallel erfolgte die Aufnahme ausgewählte physico-chemischer und physikalischer Parameter.



Analyse der Bakteriengemeinschaften

Zur Überprüfung, ob die natürlichen bakteriellen Benthosgemeinschaften der Deutschen Bucht im Umlagerungsgebiet bereits von der Einbringung der Elbsedimente beeinflusst sind, werden Profile der Bakteriengemeinschaften als Basis für umfangreichere Untersuchungen, z.B. Sequenzierungen, erstellt. Die Erstellung der Profile erfolgt mittels Fingerprintverfahren ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*). Diese Methode nutzt das Vorkommen hoch variabler DNA-Sequenzen zwischen ribosomalen Genorten (*intergenic spacer*), deren Länge für jede Bakterienart spezifisch ist. Nachdem die DNA der im Sediment befindlichen Organismen extrahiert und aufgereinigt wurde, werden diese Sequenzen mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und anschließend in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel separiert. Diese spezifischen Fingerabdrücke bzw. Profile der Bakteriengemeinschaften werden von allen Gebieten generiert und in statistischen Verfahren verglichen und auch in Zusammenhang gesetzt zu physikalischen und chemischen Parametern, die von der HPA aufgenommen werden.



Probenaufbereitung

I. Monitoring Umlagerungsstelle E3 (Teilprojekt 1 und 2)

Monitoring April und August 2011 (312 Proben).

Amplifikation der DNA sowie Erstellung der Gemeinschaftsprofile und deren statistische Auswertung wurden in 2012 abgeschlossen.

III. Zusätzliche Beprobung der Deutschen Bucht

Analyse der 412 Sedimentproben der Deutschen Bucht wurde in 2012 komplett abgeschlossen.



Abschlussergebnisse

I. Monitoring Umlagerungsstelle E3 (Teilprojekt 1 - 3)

Probenahmekampagnen

Die Aufarbeitung der Proben sowie eine Darstellung erster Ergebnisse der Analysen erfolgten bereits in den Jahren 2009 - 2011. (siehe Zwischenbericht 2009- 2011).

Bakteriengemeinschaftsprofile

Die folgenden Analysen beziehen sich auf jeweils eine Unterprobe der jeweiligen Kampagne. Da die Ergebnisse der anderen Unterproben sehr ähnlich sind, wird auf ihre Darstellung verzichtet. Die Profile wurden qualitativ (Jaccard Index) ausgewertet. Die resultierenden Diagramme bilden die Ähnlichkeit der Beprobungsstationen aufgrund ihrer Bakteriengemeinschaften ab. Die Beprobungen der durchgeführten Kampagnen in April und August 2011 sind der Vollständigkeit halber in Abbildung 2 mit aufgeführt. Sie dienen allerdings, wegen der geringeren Datendichte, nicht dem direkten Vergleich mit den vorangegangenen Kampagnen in denen deutlich mehr Proben analysiert wurden. Die Kampagnen in 2011 dienten vorrangig der Verschneidung mit kontextuellen Daten (Korngrößen, chemische Parameter), weshalb nach Rücksprache, nur die entsprechenden 52 Stationen beprobt wurden(Anhang).

Auswirkungen von Baggerguteinbringungen auf bakterielle Sedimentgemeinschaften der Deutschen Bucht

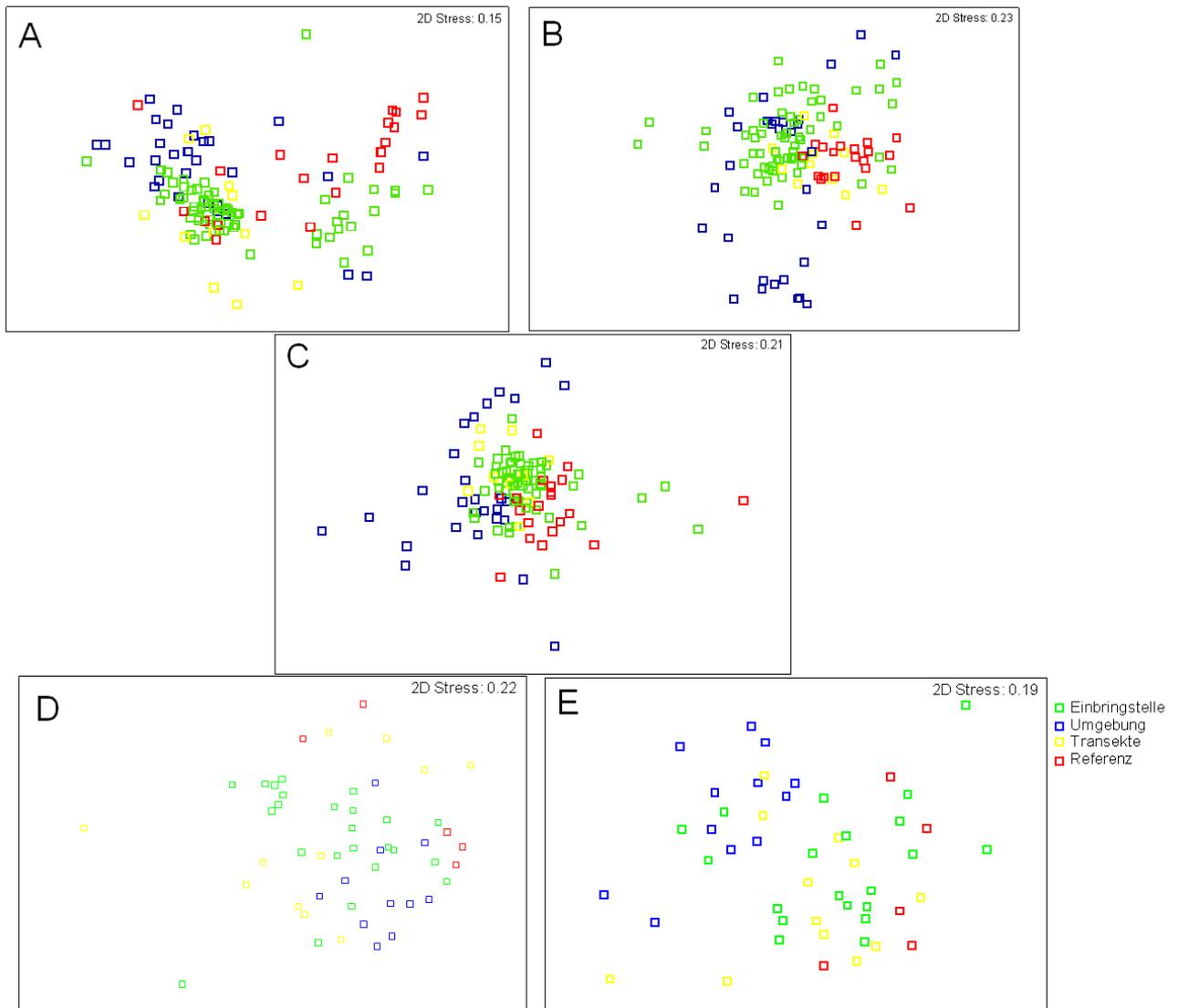


Abbildung 2 NMDS Plots der Bakteriengemeinschaften im August 2009 (A), April (B) und August (C) 2010 und April (D) und August (E) 2011.

Die Bakteriengemeinschaften der Untersuchungsgebiete untereinander (Einbringungsstelle, Zentrum, 1 km, etc.) wiesen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Variabilität im Hinblick auf die jeweilige Beprobungskampagne auf (Zwischenberichte 2009- 2011; Abbildung 2). Die größte Variabilität innerhalb der Untersuchungsgebiete wurde in der im August 2009 durchgeführten Kampagne



ermittelt. Diese Variabilität ging in den nachfolgenden Kampagnen zurück (Zwischenbericht 2011). Zudem konnte herausgestellt werden, dass die Diversität der Bakteriengemeinschaften in den Beprobungskampagnen die im August durchgeführt wurden deutlich höher war als die der Kampagnen im April. Unsere Zusatzuntersuchung (III S.8), zeigte, dass benthische Bakteriengemeinschaften im Umlagerungsgebiet sehr stark von saisonalen und auch räumlichen Faktoren abhängen. Temperatureffekte sowie die Zusammensetzung des Sediments (sandig oder schlickig) nahmen in den durchgeführten multivariaten Analysen einen signifikanten Einfluss auf die Gemeinschaftsstruktur der Bakterien (Dissertation R. Störmer). Desweiteren konnte herausgestellt werden, dass die Diversität der Bakteriengemeinschaften dem saisonalen Temperaturverlauf folgte und die größte Diversität im Juni auftrat. Diese Ergebnisse unterstützen unsere Vermutung, dass die beobachteten Diversitätsschwankungen (geringere Diversität im April im Vergleich zu August) an der Umlagerungsstelle auf saisonale Einflüsse zurückzuführen sind. Der Rückgang der Variabilität der Bakteriengemeinschaft hingegen ist nicht vollständig geklärt. Wir vermuten, dass der in der Deutschen Bucht auftretende Oberflächensedimenttransport dazu führt, dass sich die Variabilität der Bakteriengemeinschaften im Vergleich der untersuchten Gebieten im Zuge der veränderten Sedimentstruktur anpasst (OSPAR 2000). Die Auswertung der Korngrößenanalysen aus dem Umlagerungsgebiet weisen darauf hin, dass sich die Sedimentstruktur im Umlagerungsgebiet über die Zeit verändert (Störmer et al 2012). Diese eher geringeren Veränderungen könnten die Ursache für die unterschiedliche Variabilität der Bakteriengemeinschaft sein. Diese These wird auch durch unsere Beobachtungen im Zuge der Beprobungskampagnen in April und August 2010 gestützt. Wir konnten feststellen, dass sich die Gemeinschaftsstrukturen an der Einbringungsstelle nach einer erneuten Sedimentverbringung veränderten (Zwischenbericht 2011). Diese Veränderung ist höchstwahrscheinlich mit dem Eintrag von sandigem Material in Verbindung zu bringen. Mehrfach wurden in der Literatur Veränderungen der Bakteriengemeinschaft auch im Hinblick auf Störungen, auch physikalischer Art, die dem Eintrag von Sediment am nächsten kommen, beobachtet (Findlay et al 1990).



Gradientenanalysen

Detaillierte Hintergrundinformationen zur Gradientenanalyse sind dem Zwischenbericht 2011 zu entnehmen. Prinzipiell dienen Gradientenanalysen dem Zweck, mit Hilfe von kontextuellen oder Umwelt-Daten (hier: Schadstoffe und Korngrößen) Varianzen der biologischen Daten (Bakteriengemeinschaften) zu erklären.

Aus unseren ersten Analysen aus 2010 (Zwischenbericht 2010), ging hervor, dass viele der aufgenommenen Parameter stark mit einander korrelieren. Um diese Korrelationen zu minimieren, bzw. Effekte zusammen zu fassen, wurden einzelne Schadstoffe nach Rücksprache mit HPA in Stoffgruppen eingeteilt (siehe Anhang). Basierend auf diesen Daten wurden die Gradientenanalysen erneut durchgeführt.

Generell beziehen sich unsere Berechnungen auf Gehalte, die in der Gesamtfraktion ermittelt wurden. Wie bereits im Jahresbericht 2011 erwähnt, ist eine Korngrößenfraktionierung im Zusammenhang mit Bakteriengemeinschaftsanalysen unüblich (Cao et al 2006, Edlund & Jansson 2006, Vishnivetskaya et al 2011).

Zusammenfassend lassen sich aus unseren Redundanzanalysen folgende Erkenntnisse ableiten:

Das Umlagerungsgebiet wird maßgeblich durch einen starken Gradienten, der aus der Negativkorrelation zwischen bestimmten Korngrößen (u.a. 100-200µm) und organischen Schadstoffen zu feinkörnigem Sediment korreliert mit „Nährstoffen“ (Stickstoff, Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel) und Schwermetallen geprägt. In der Regel beobachteten wir starke Korrelationen zwischen Bakteriengemeinschaften an der Einbringungsstelle mit der Korngrößenfraktion 100-200µm bzw. organischen Schadstoffen. Die anderen Bakteriengemeinschaften korrelierten eher mit anderen Faktoren (Abbildung 3). Im Allgemeinen ist die Zusammensetzung bakterieller Sedimentgemeinschaften sehr stark von sediment-geologischen Gegebenheiten abhängig. Vor allem Faktoren wie die Sedimentzusammensetzung

Auswirkungen von Baggerguteinbringungen auf bakterielle Sedimentgemeinschaften der Deutschen Bucht

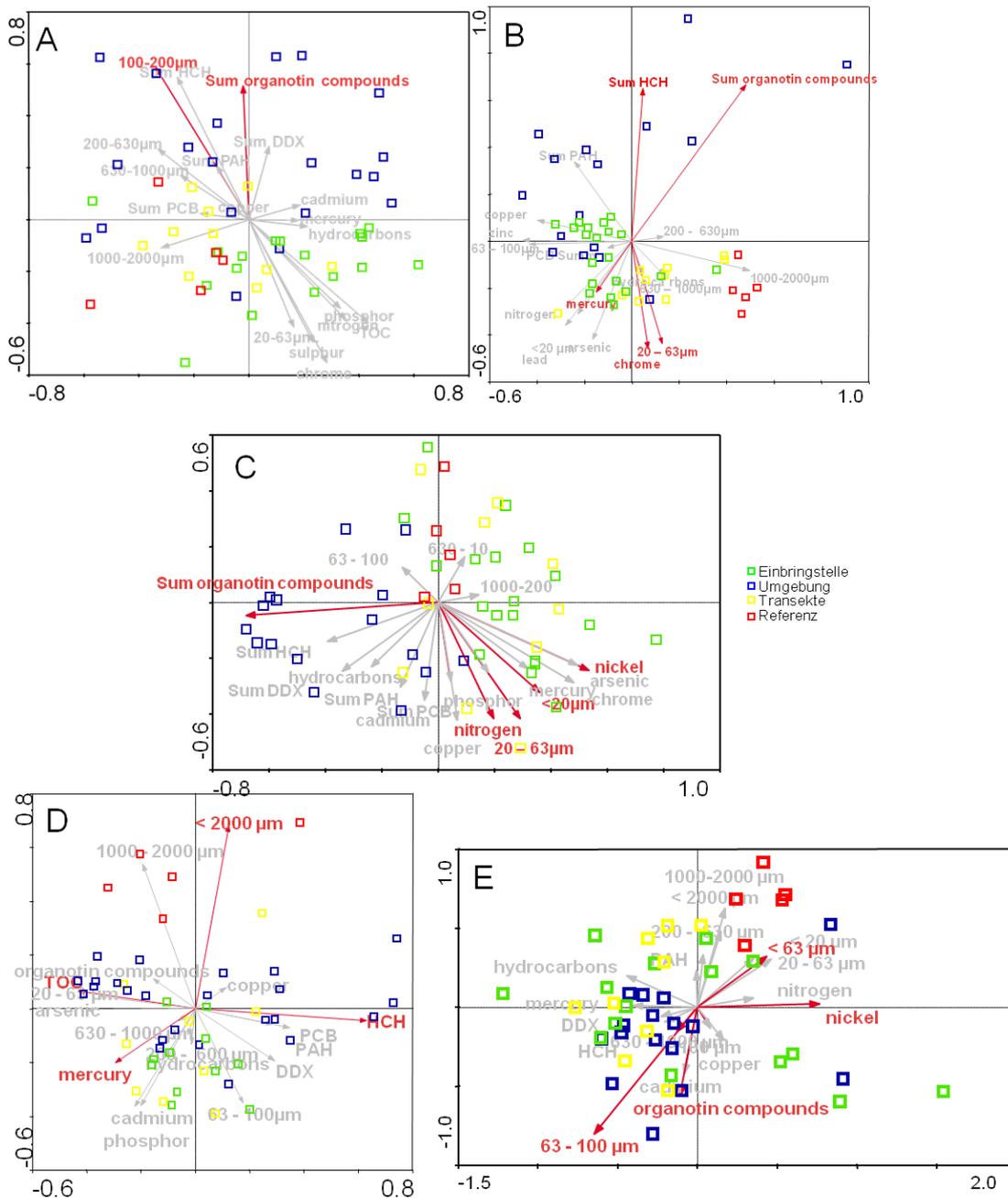


Abbildung 3. Redundanzanalysen der Bakteriengemeinschaften des Untersuchungsgebietes im August 2009 (A), April (B) und August (C) 2010 und April (D) und August (E) 2010.



(Korngrößenverteilungen) und mit ihnen in Verbindung stehende Faktoren wie Nährstoffe spielen eine entscheidende Rolle. Sandige Sedimente sind nährstoffärmer und bieten damit einen anderen Lebensraum als schlickige, nährstoffreichere Sedimente. Die beobachteten Unterschiede könnten daher durch unterschiedliche geochemischen Bedingungen des Gebietes zu erklären sein. Allerdings wurden auch in allen Redundanzanalysen organische Schadstoffe als signifikant ausgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt an, dass ein starker Gradient, resultierend aus den Verteilungen der Korngrößen und Schadstoffe im Sediment, im Untersuchungsgebiet vorherrscht. Die Bakteriengemeinschaften der Einbringungsstelle korrelierten dabei eher mit sandigem Sediment und organischen Schadstoffen (Abbildung 3). Die Analyse lässt an dieser Stelle keine Möglichkeit über Aussagen von kausalen Zusammenhängen zwischen dem Ausbilden der Bakteriengemeinschaften und Schadstoffen zu. Lediglich die Aussage, dass bestimmte Bakteriengemeinschaften im Einbringgebiet mit den für dieses Gebiet charakteristischen Faktoren korrelieren, kann getroffen werden.

Der mögliche Einfluss von Schadstoffen auf die Ausbildung der Bakteriengemeinschaften kann nur anhand von kontrollierten Experimenten näher untersucht werden. So wurde in anderen Studien bereits der Einfluss von Kohlenwasserstoffen untersucht und eine Veränderung in den Bakteriengemeinschaften ermittelt (Kniemeyer et al 2007, Perez-Jimenez & Kerkhof 2005, Suarez-Suarez et al 2011). Über die Einflussnahme von Organozinnverbindungen auf Bakteriengemeinschaften ist, nach unserer Kenntnis, noch nichts bekannt.



Phylogenetische Analysen (Teilprojekt 2 und 3)

Wie bereits im Zwischenbericht 2011 dokumentiert wies die Bakteriengemeinschaft der Einbringungsstelle einen höheren Anteil der Gruppen *Flavobacteriaceae* und *Desulfuromonadaceae* im Vergleich mit den anderen untersuchten Proben auf. Diese Bakteriengruppen konnten in den vergangenen Jahren bereits im Rahmen anderer Arbeiten mit Schadstoffen in Verbindung gebracht werden (Zwischenbericht 2011). Diese ersten Ergebnisse bezüglich der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften ausgewählter Proben aus 2009 (Zwischenbericht 2011) können noch mit folgenden Informationen vervollständigt werden:

Abbildung 4 zeigt einen Ausschnitt der phylogenetische Klassifizierung der von uns erhobenen DNA-Sequenzen repräsentativer Proben (siehe Anhang; teilweise entnommen aus unserem Manuskript *Impact of ocean dumping on bacterial communities I: Fine-scale investigations at a dumping site*, kürzlich eingereicht bei: Journal Marine Pollution Bulletin). Abbildung 4A bildet die Gesamtanzahl der sogenannten OTUs (*operational taxonomic units*) für die einzelnen Proben ab. OTUs repräsentieren Einheiten, in denen in diesem Fall DNA-Sequenzen einer bestimmten Ähnlichkeit (hier 97%) zusammengefasst werden und damit repräsentativ sind für eine Bakterienart. Die Anzahl von OTUs kann als Maß für die Diversität innerhalb dieser Probe verstanden werden. Der Vergleich von Proben aus der Umgebung des Umlagerungsgebietes und mit denen der Referenz zeigte eine deutlich geringere Anzahl OTUs an der direkten Einbringungsstelle und damit eine geringere Diversität (Abbildung 4A). Neben den bereits erwähnten Vorkommen der *Desulfuromonadaceae* und *Flavobacteriaceae* konnten wir, neun Monate nach der Verbringung, auch einige typische Süßwasser Bakterien an der Einbringungsstelle feststellen. Besonders *Betaproteobakterien* sind typische Vertreter. Die Abbildungen 4B-4C machen deutlich, dass diese Gruppen höchstwahrscheinlich mit dem Sedimenteintrag an die Umlagerungsstelle gelangt sind, da diese Gruppen in nennenswerten Zahlen nur in der Elbe und an der Einbringungsstelle vertreten waren. Die anderen Proben wiesen keine oder nur sehr vereinzelt Sequenzen dieser Bakteriengruppen auf.

Auswirkungen von Baggerguteinbringungen auf bakterielle Sedimentgemeinschaften der Deutschen Bucht

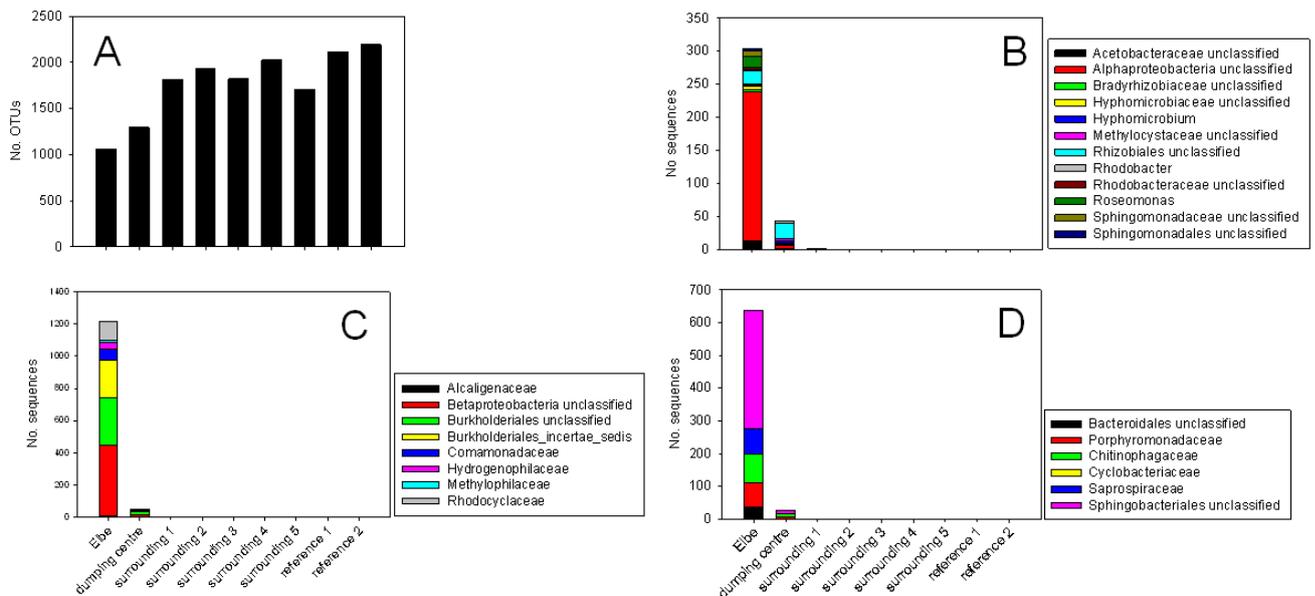


Abbildung 4 Phylogenetische Klassifizierung der DNA-Sequenzen ausgewählter Proben. Gesamtanzahl der beobachteten OTUs (A), Alphaproteobakterien (B), Betaproteobakterien, Bacteroidales und Sphingobacteriales (D).

Funktionale Analysen (Teilprojekt 1)

Im Rahmen dieses Pilotprojektes sollte auch die funktionale Diversität der Bakteriengemeinschaft an der Einbringungsstelle näher auf Unterschiede zum Referenzgebiet untersucht werden. Es galt zu bewerten, ob die Umlagerung zu Veränderungen der funktionalen Diversität (z.B. erhöhtes Auftreten von Schwermetallresistenzgenen oder Genen die auf einen Abbau von organischen Schadstoffen schließen lassen) geführt hat. Hier wurden ausgewählte Proben einer *Microarray* Analyse unterworfen. Prinzipiell werden auf diesen Arrays Gensonden bestimmter Gene (aus Nährstoffkreisläufen, Schwermetallresistenzen, etc.) immobilisiert. Die zu analysierenden Proben werden daraufhin auf den Array appliziert. Befinden sich in der Probe komplementäre Genabschnitte, die zu den Gensonden auf dem Array passen, so hybridisieren diese mit den immobilisierten Gensonden und es wird ein Fluoreszenz-Signal erzeugt welches quantifiziert und ausgewertet werden kann. Diese Daten geben im Rückschluss Informationen



darüber, welche funktionalen Gene, von denen auf dem *Microarray* befindlichen, sich auch in der Probe nachweisen lassen.

In diesem Projekt haben wir uns des sogenannten GeoChips bedient. Dieser zu den *functional gene arrays* gehörende *Micoarray* wurde bereits in vielen Umweltstudien erfolgreich angewandt um die funktionale Diversität von Bakteriengemeinschaften zu untersuchen (He et al 2007, Lu et al 2012, Van Nostrand et al 2009, Waldron et al 2009). Die Version GeoChip 4.2, die hier benutzt wurde umfasst unter anderem funktionale Gene aus den folgenden Kategorien: Schwefel-, Stickstoff- und Kohlenstoffkreislauf, Schwermetallresistenz, Virulenz und Stress. Die Auswertung der *Microarray* Ergebnisse ergab, dass auch die funktionale Diversität der Bakteriengemeinschaft an der Einbringungsstelle im Vergleich zu der Umgebung der Einbringungsstelle und der Referenz signifikant geringer war. Es konnte keine Anreicherung von funktionalen Genen, die auf einen Schadstoffeinfluss hinweisen wie beispielsweise Schwermetallresistenzgene, nachgewiesen werden. Allerdings konnten wir in Clusteranalysen dokumentieren, dass sich die funktionalen Gene der einzelnen Kategorien (z.B. Schadstoffabbau, Schwermetallresistenz) immer in der gleichen Art und Weise gruppierten.

Abbildung 5 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Clusteranalyse für die Kategorie „*organic remediation*“. Im oberen Cluster sind die einzelnen Proben (1-9) und links das Cluster der einzelnen funktionalen Gene der Kategorie „*organic remediation*“ beinhaltet dargestellt. Diese Kategorie beinhaltet beispielsweise Gene die bei der Verwertung folgender Substanzen von Bedeutung sind: Heterozyklische Aromaten, polyzyklische Aromaten, BTEX und verwandte Aromaten. Daraus ergibt sich in der Mitte eine sogenannte *Heatmap*. Aus dieser *Heatmap* kann das Vorhanden und Nichtvorhandensein einzelner Gene abgelesen werden (Rot: Vorhanden, Weiß: Nichtvorhanden). Die Gene gruppierten sich immer in der gleichen Art und Weise: a) Gene die in allen Proben vorhanden waren, b) Gene die nur in der Elbe detektiert wurden, c) Gene die im Umlagerungsgebiet gefunden wurden und d) Gene die vorrangig in Proben aus dem Referenzgebiet detektiert wurden.

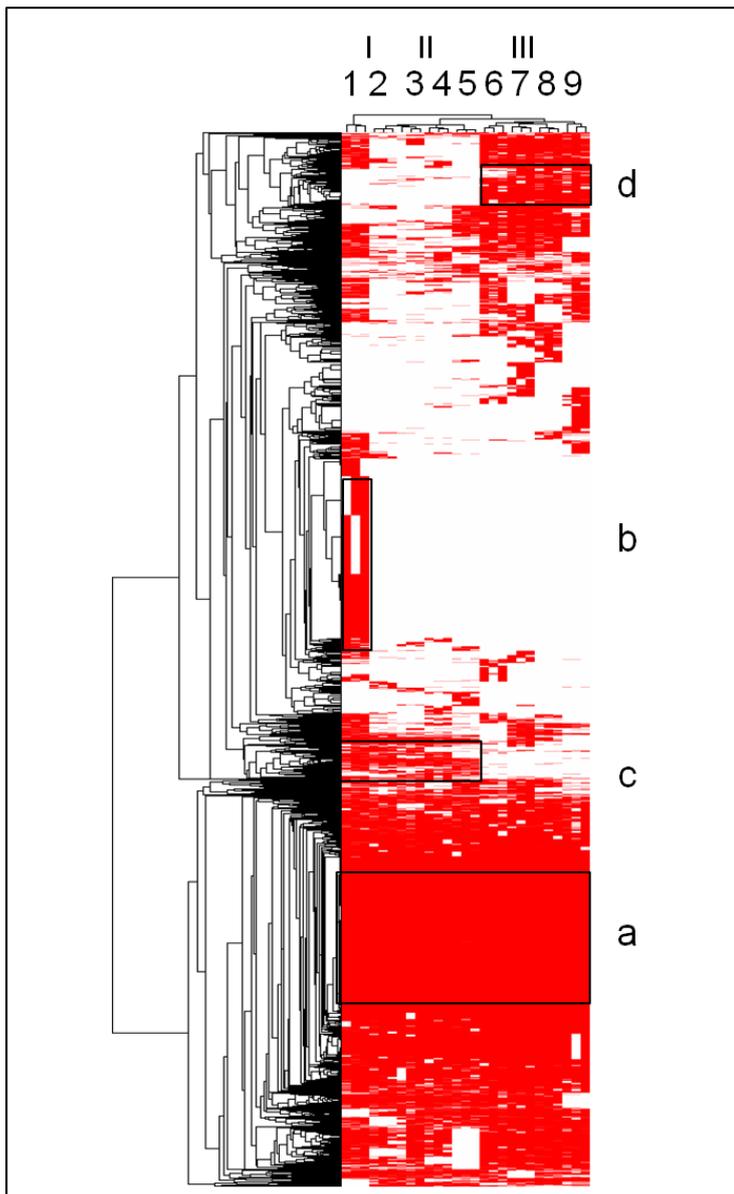


Abbildung 5 Clusteranalyse funktionaler Gene der Kategorie *organic remediation* basierend auf Hybridisierungssignalen und Euklidischer Distanz. 1: Elbe, 2: Zentrum Einbringungsstelle, 3: 1.5 km, 4: 2 km_1, 5: 3 km_2, 6: 3 km_1, 7: Referenz 1, 8: Referenz 2, 9: 2km_2; I) Proben aus der Elbe II) Proben des Zentrums der Einbringungsstelle und Teil der Umgebung (1.5km, 2km_1, 2km_2, 3km_2) III) Proben aus der Referenz und 3km_1. a) Gene die in allen Proben gefunden wurden b) Gene die nur in Elbeproben ermittelt wurden, c) Gene die an der Umlagerungsstelle detektiert wurden und d) Gene die in Proben der Referenz nachgewiesen wurden.



Es konnten keine Unterschiede bezüglich der funktionalen Gene dieser Gruppen nachgewiesen werden. Allerdings konnten phylogenetische Unterschiede herausgestellt werden. Die Gene, beziehungsweise Gensonden, die sich auf dem *Microarray* befinden, stammen aus Isolaten einzelner Organismen und die Gensonde ist daher auch mit einer phylogenetischen Information ausgestattet. Bei Berücksichtigung dieser Information konnte gezeigt werden, dass funktionale Gene der Elbe Gruppe vorrangig von Süßwasserbakterien stammten. Die Gruppe II) beinhaltete Gene die aus Süßwasserbakterien und marinen Bakterien isoliert wurden, während die Gruppe III) fast ausschließlich marine Phylotypen beinhaltete. Dieses Ergebnis stützt unsere Ergebnisse aus der Sequenzanalyse. Auch auf funktionaler Ebene konnten Süßwasserbakterien, neun Monate nach der letzten Verbringung an der Umlagerungsstelle, festgestellt werden.

Sequenzanalyse sowie GeoChip Analyse basieren auf Informationen der DNA der Bakterien. Das bedeutet, dass keinerlei Hinweise darüber gegeben werden können, ob diese Organismen noch aktiv sind. Analysen, die auf Informationen der RNA, aktive Transkripte der DNA, basieren, können Aufschluss darüber geben, inwiefern die Bakteriengemeinschaft metabolisch aktiv ist. Diese Ansätze sind beispielsweise in Metagenomanalysen (Metatranscriptomics) implementiert (Teeling et al 2012).



II. Beprobung Elbmündung bei Cuxhaven und Strand in Duhnen (Teilprojekt 4)

Zur abschließenden mikrobiologischen Bewertung des Einflusses der Sedimentverbringung auf die Verschlickung des Strandes in Duhnen (Cuxhaven) wurden die Bakteriengemeinschaften der Einbringungsstelle E3 (2011) mit denen der Elbe (2010/2011) und dem Duhner Strand (2011) verglichen. Erste Ergebnisse des Vergleichs der Bakteriengemeinschaften der Einbringungsstelle und des Duhner Strandes wurden im Zwischenbericht 2011 präsentiert. Die Bakteriengemeinschaften der Einbringungsstelle unterschieden sich in allen Fällen signifikant von denen des Duhner Strandes. Da ein direkter Vergleich von Gemeinschaften des gleichen Beprobungsjahres (2011) noch ausstand, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Bedingungen in den jeweiligen Beprobungsjahren zu der Ausbildung verschiedener Bakteriengemeinschaften führten.

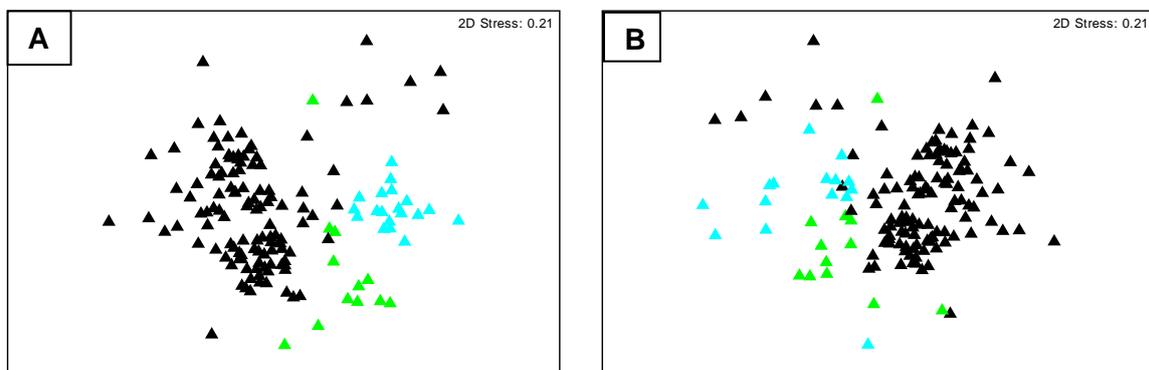


Abbildung 6 NMDS Plots der Bakteriengemeinschaften des Duhner Watts (schwarz) mit denen des Elbsestons (grün) und der Einbringungsstelle E3 (türkis) aus April 2011 (A) und August 2011 (B).

Paarweise Signifikanztests zwischen den Bakteriengemeinschaften des Duhner Watts und denen der Einbringungsstelle E3 in April und August 2011 ergaben in beiden Fällen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Gemeinschaftsstruktur. Wie auch schon in den vorangegangenen Analysen stellen die Bakteriengemeinschaften des Elbsestons eine „Zwischengemeinschaft“ dar (Zwischenbericht 2011). Dieser abschließende Vergleich schließt auch den Einfluss unterschiedlicher Bedingungen



der verschiedenen Beprobungsjahre aus, die zur Ausbildung unterschiedlicher Bakteriengemeinschaften geführt haben könnten. Aus mikrobiologischer Sicht kann daher kein Zusammenhang zwischen dem Verbringen der Elbsedimente an der Einbringungsstelle und der Ausbildung von Bakteriengemeinschaften im Duhner Watt hergestellt werden. Auf eine Redundanzanalyse wurde an dieser Stelle verzichtet, weil keine korrespondierenden biogeochemischen Daten aufgenommen wurden. Es wurden nach unserem Kenntnisstand Daten hinsichtlich Körnung, Chemie und O₂ Zehrung genommen, die aber, soweit wir informiert sind nicht aus dem exakt gleichen Sedimentkörper stammen und daher für diese Art der Analyse nicht herangezogen werden können.

Fazit

Die bakteriellen Gemeinschaften im Umlagerungsgebiet stehen unter dem Einfluss der Umlagerung. Die Verbringung von Elbsediment führte zu einer fundamentalen Veränderung der Sedimentstruktur an der unmittelbaren Einbringungsstelle. Die damit in Zusammenhang stehenden Veränderungen der Korngrößenverteilungen sowie Nährstoffverfügbarkeit im Sediment, aber auch die Einwirkung von Schadstoffen, sind an dieser Entwicklung beteiligt. Um den jeweiligen Anteil der einzelnen Faktoren näher bestimmen zu können sind kontrollierte, experimentelle Ansätze nötig. Die phylogenetische Analyse stellte eine Verschiebung in der Gruppe der sulfatreduzierenden Bakterien und das Vorkommen von Süßwasserbakterien an der Einbringungsstelle im Vergleich zu allen anderen marinen Stationen heraus. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Diversität der vorkommenden Bakterienarten (OTUs) sowie die Funktionalität der Bakteriengemeinschaften an der Einbringungsstelle im Vergleich mit der Umgebung (2km und 3km Entfernung) sowie dem Referenzgebiet verringert war. An der Einbringungsstelle sind somit Veränderungen innerhalb der Gemeinschaftsstruktur basaler Organismen und eventuell auch innerhalb ihrer Funktionalität in der Nahrungskette, zu beobachten. Die Auswirkung ist zu diesem Zeitpunkt nicht abschätzbar, aber einzig auf die Einbringungsstelle begrenzt.



Der abschließende Vergleich von Bakteriengemeinschaften des Duhner Strandes mit denen der Einbringungsstelle aus dem gleichen Beprobungszeitraum bestätigten unsere vorläufigen Ergebnisse aus dem Zwischenbericht 2011. Aufgrund signifikanter Unterschiede der Bakteriengemeinschaften der verglichenen Gebiete kann ein Einfluss der Verbringung von Elbsedimenten auf die Ausbildung der Bakteriengemeinschaften im Duhner Watt aus molekularbiologischer Sicht nicht bestätigt werden. Unsere Ergebnisse legen eher einen Einfluss des partikulären Material (Seston) der Elbe auf das Ausbilden der Bakteriengemeinschaften im Duhner Watt nahe.

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie demonstrieren, dass sich Bakteriengemeinschaftsanalysen nutzen lassen um den Einfluss von Baggerguteinbringungen auf die natürliche bakterielle Benthosgemeinschaft abzuschätzen. Die Artenvielfalt eines Ökosystems gilt immer noch als eine der gängigen Kenngrößen um den Zustand eines Systems zu erfassen. Richtlinien zur Überwachung von Baggerguteinbringungen schreiben die Untersuchung der Artenvielfalt der Makrozoobenthosgemeinschaft vor und dokumentieren hier einen Rückgang der Besiedlungskennwerte an der direkten Einbringungsstelle. Der Rückgang der Artenvielfalt (Diversität) ließ sich anhand der hier durchgeführten Analysen im direkten Vergleich mit dem Referenzgebiet auch bezüglich der benthischen „Mikrobenthosgemeinschaft“ nachweisen. In welchem Ausmaß sich diese Veränderungen auf die höheren Stufen des Nahrungsnetzes auswirken können, kann allerdings anhand der in dieser Studie eingesetzten Methoden nicht abgeschätzt werden. Da Bakterien und insbesondere benthische Bakterien eine essentielle Rolle in der Nährstoffbereitstellung im marinen System spielen kann davon ausgegangen werden, dass die Störung dieser essentiellen Funktionen Auswirkungen auf das gesamte System hat. Die Untersuchung dieser Zusammenhänge bedarf einer Anpassung des Monitoringprogramms an diese Fragestellung. Neben dem Einsatz von kontrollierten Laborexperimenten um unter anderem den Einfluss bzw. die mögliche Umsetzung von organischen Schadstoffen detailliert zu untersuchen würde die korrespondierende Aufnahme zusätzlicher physikochemischer Parameter wie beispielsweise der Sauerstoffgehalt oder der pH Wert der Sedimente Auskunft über die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe an der Einbringungsstelle geben.



Anhang

Stoffgruppen nach Absprache mit HPA

grain size fractions

< 20µm
20-63µm
63-100µm
100-200µm
200-630µm
630-1000µm
1000-2000µm

S, N, P, C

TOC (C)
nitrogen (N)
sulfur (S)
phosphor (P)

Hydrocarbons

Sum Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)

naphthaline
fluorene
phenanthrene
anthracene
fluoranthene
pyrene
benz(a)anthracene
chrysene
benzo(b)fluoranthene
benzo(k)fluoranthene
benzo(a)pyrene
dibenz(ah)anthracene
benzo(ghi)perylene
indeno(1.2.3cd)pyrene

Sum Chlorinated Diphenyls (PCB)

PCB28
PCB52
PCB101
PCB118
PCB138
PCB153
PCB180

Sum Hexachlorocyclohexane (HCH)

alphaHCH
betaHCH
gammaHCH
deltaHCH

Sum Dichlorodiphenyldichloroethane (DDT) and metabolites

ppDDE
opDDD
ppDDD
opDDT
ppDDT

Sum Organotin Compounds

monobutyltin (MBT)
dibutyltin (DBT)
tributyltin (TBT)
tetrabutyltin

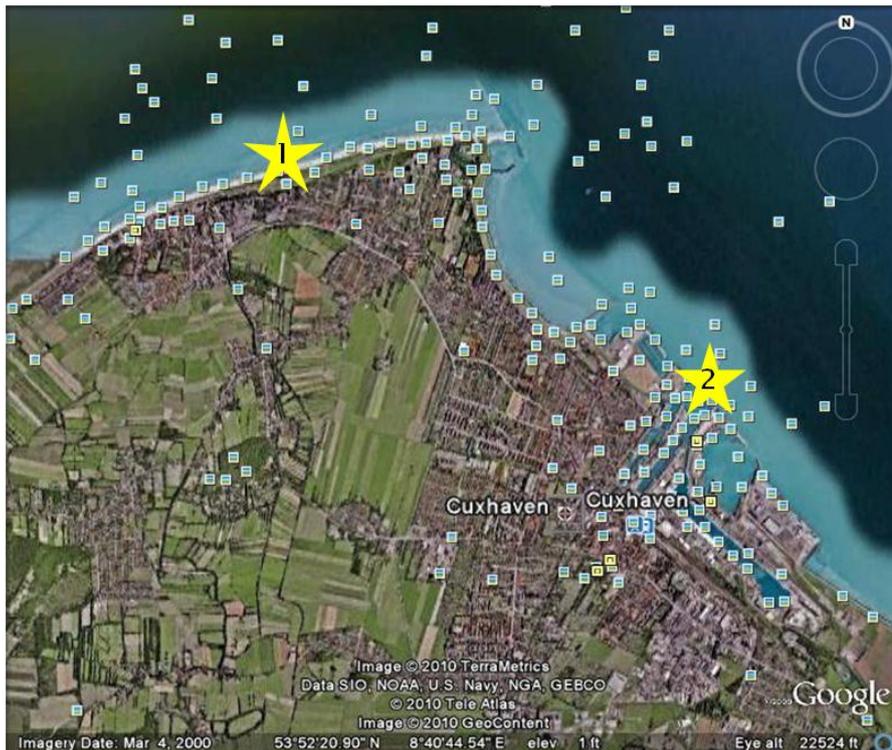
Heavy Metals

arsene
plumb
cadmium
chrome
copper
nickel
mercury
zinc

Auswirkungen von Baggerguteinbringungen auf bakterielle Sedimentgemeinschaften der Deutschen Bucht

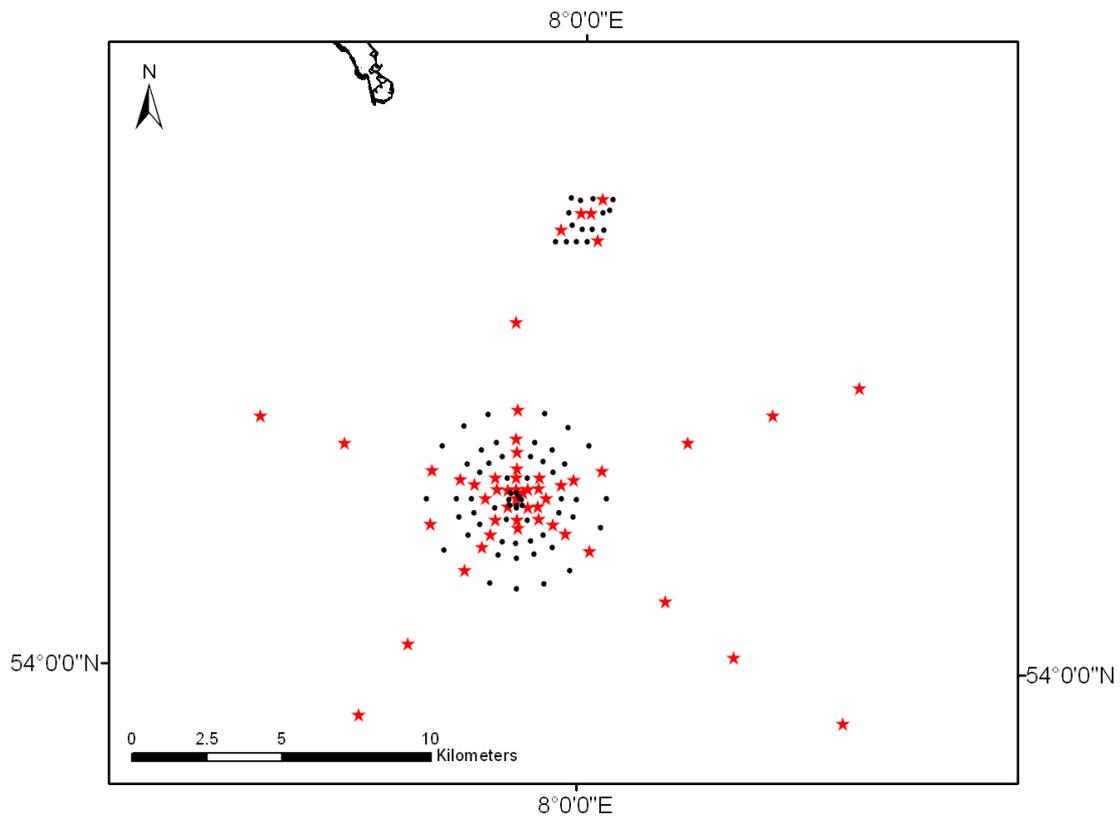


Standort Wasserprobe Elbmündung bei Cuxhaven und Teflontrichter





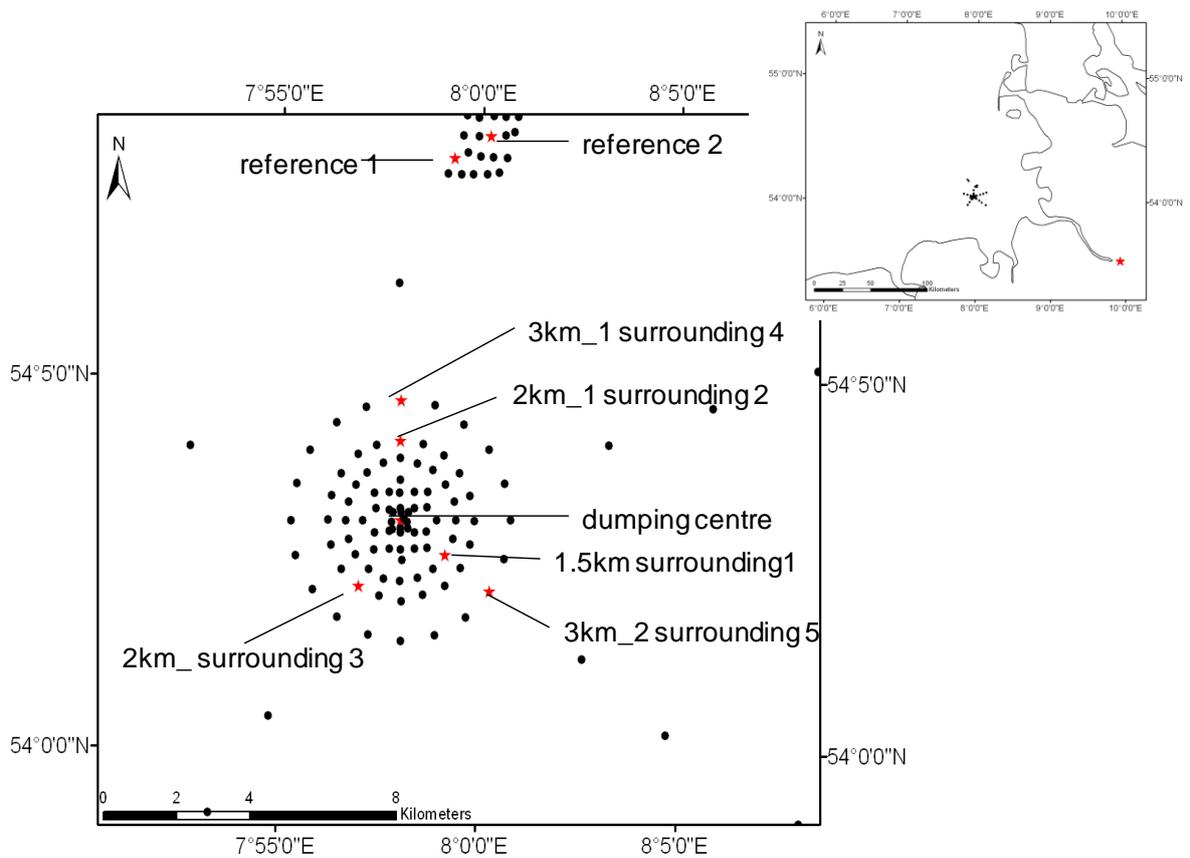
Übersicht der beprobten Stationen der Kampagnen Kampagnen April und August
2011



★ Beprobte Stationen



Übersicht der ausgewählten repräsentativen Proben für die Sequenz- und GeoChip Analyse

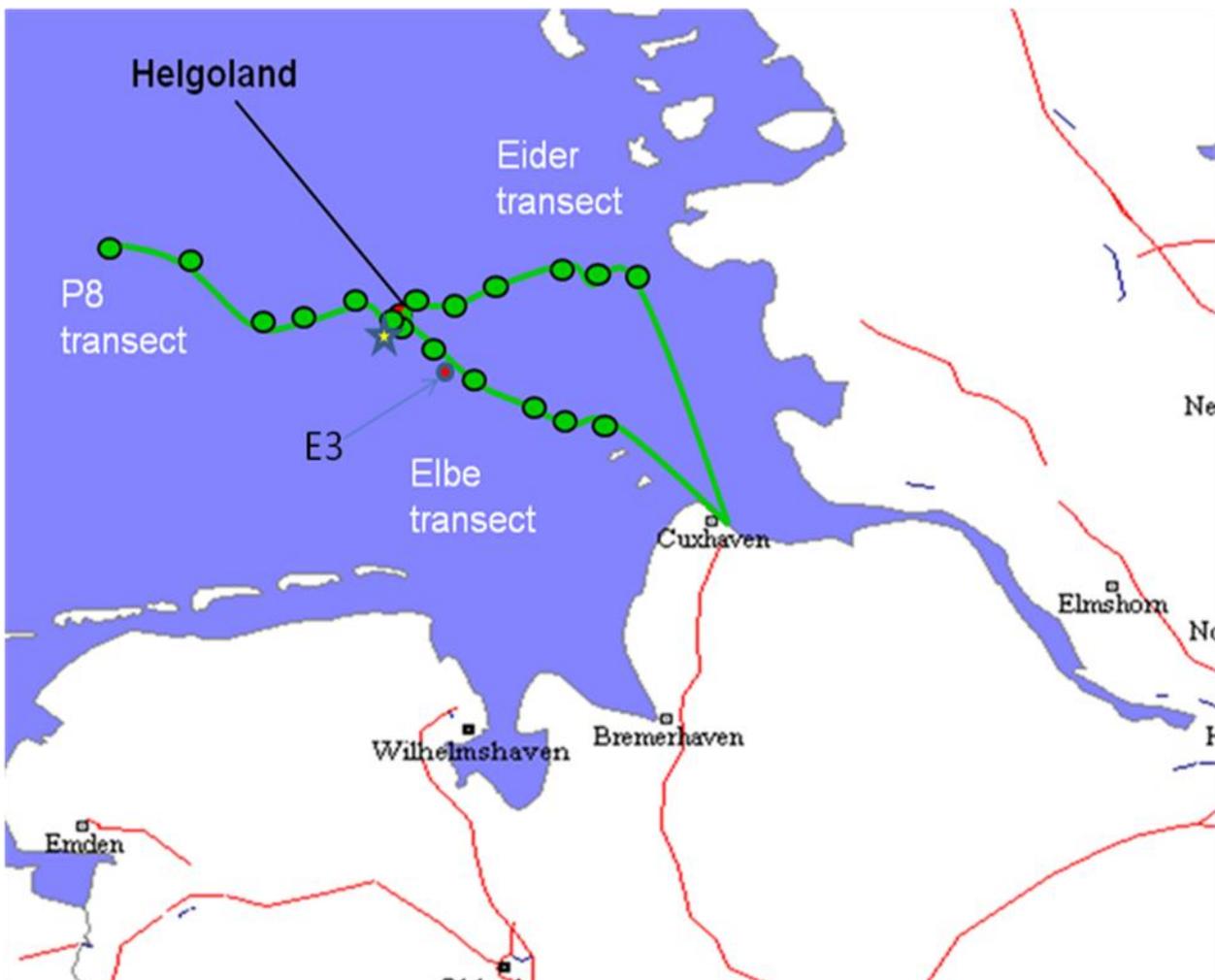


★ ausgewählte Proben



Übersicht Transekte der BAH Schnitffahrten

★ Stationen P8 I und Elbe I können nicht beprobt werden





Referenzen

- Cao Y, Cherr GN, Cordova-Kreylos AL, Fan TWM, Green PG, et al. 2006. Relationships between sediment microbial communities and pollutants in two California salt marshes. *Microbial Ecology* 52: 619-33
- Edlund A, Jansson JK. 2006. Changes in active bacterial communities before and after dredging of highly polluted Baltic Sea sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6800-07
- Findlay RH, Trexler MB, Guckert JB, White DC. 1990. LABORATORY STUDY OF DISTURBANCE IN MARINE-SEDIMENTS - RESPONSE OF A MICROBIAL COMMUNITY. *Marine Ecology-Progress Series* 62: 121-33
- He ZL, Gentry TJ, Schadt CW, Wu LY, Liebich J, et al. 2007. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *Isme Journal* 1: 67-77
- Kniemeyer O, Musat F, Sievert SM, Knittel K, Wilkes H, et al. 2007. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* 449: 898-U10
- Lu ZM, Deng Y, Van Nostrand JD, He ZL, Voordeckers J, et al. 2012. Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. *Isme Journal* 6: 451-60
- Perez-Jimenez JR, Kerkhof LJ. 2005. Phylogeography of sulfate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*). *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1004-11
- Störmer R, Wichels A, Gerds G. 2012. Impact of ocean dumping on bacterial communities I: Fine-scale investigations at a dumping site. Helgoland: Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research
- Suarez-Suarez A, Lopez-Lopez A, Tovar-Sanchez A, Yarza P, Orfila A, et al. 2011. Response of sulfate-reducing bacteria to an artificial oil-spill in a coastal marine sediment. *Environmental Microbiology* 13: 1488-99
- Teeling H, Fuchs BM, Becher D, Klockow C, Gardebrecht A, et al. 2012. Substrate-Controlled Succession of Marine Bacterioplankton Populations Induced by a Phytoplankton Bloom. *Science* 336: 608-11
- Van Nostrand JD, Wu WM, Wu LY, Deng Y, Carley J, et al. 2009. GeoChip-based analysis of functional microbial communities during the reoxidation of a bio-reduced uranium-contaminated aquifer. *Environmental Microbiology* 11: 2611-26
- Vishnivetskaya TA, Mosher JJ, Palumbo AV, Yang ZK, Podar M, et al. 2011. Mercury and Other Heavy Metals Influence Bacterial Community Structure in Contaminated Tennessee Streams. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 302-11
- Waldron PJ, Wu LY, Van Nostrand JD, Schadt CW, He ZL, et al. 2009. Functional Gene Array-Based Analysis of Microbial Community Structure in Groundwaters with a Gradient of Contaminant Levels. *Environmental Science & Technology* 43: 3529-34